

# Resistência de Plantas a Patógenos



UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO

# Resistência de Plantas a Patógenos

**Editores**

Jonas Alberto Rios  
Larissa Cavalcante Almeida  
Elineide Barbosa de Souza



**UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**



**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
**Departamento de Agronomia**

Reitor: *Prof. Marcelo Brito Carneiro Leão*

Vice-Reitor: *Prof. Gabriel Rivas de Melo*

Pró-Reitoria de Ensino de Graduação: *Profa. Maria do Socorro de Lima Oliveira*

Pró-Reitoria de Pós-Graduação: *Profa. Maria Madalena Pessoa Guerra*

Diretor do Departamento de Agronomia: *Prof. José Luiz Sandes de Carvalho Filho*

Coordenador de Agronomia: *Prof. Antônio Francisco de Mendonça Júnior*



**Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

Coordenador: *Prof. Marco Aurélio Siqueira da Gama*

Vice- Coordenador: *Prof. André Angelo Medeiros Gomes*

**Sobre a Obra**

Conselho Editorial: *Prof. Jonas Alberto Rios, Ms. Larissa Cavalcante Almeida e Profa. Elineide Barbosa de Souza*

Projeto Editorial e Diagramação: *@juliana.dias.designer - Juliana Dias*

Imagem da Capa: *Dr. Leonardo Araújo e Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues*

Apoio Financeiro: *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Proc. ARC-0139-5.01/19)*

*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Proc. Nº 88881.471280/2019-01)*

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Resistência de plantas a patógenos [livro eletrônico] / organização Jonas Alberto Rios ,  
Larissa Cavalcante Almeida, Elineide Barbosa de Souza. -- 1. ed. -- Recife, PE :  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2021.e PDF

ISBN 978-65-00-20814-6

1. Agricultura 2. Biotecnologia 3. Fitopatologia 4. Indução de resistência. 5. Nutrição mineral  
6. Resistência de plantas. I. Rios, Jonas Alberto. II. Almeida, Larissa Cavalcante. III. Souza, Elineide  
Barbosa de.

21-62459

CDD-635.9

**Índices para catálogo sistemático:**

1. Fitopatologia : Doenças e pragas : Controle 635.9  
Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

# Apresentação

As doenças de plantas estão entre os principais fatores limitantes para o aumento da produção no cenário agrícola atual. Por isso, se torna fundamental que os profissionais da área de ciências agrárias aprimorem seus conhecimentos para garantir um manejo eficiente e racional, considerando os conceitos de sustentabilidade, segurança alimentar, biotecnologia, manejo integrado entre outros. Inserido nesta temática, a resistência de plantas constitui uma importante ferramenta na redução dos danos causados por patógenos, garantido, via de regra, incrementos em produtividade. O livro, *Resistência de Plantas a Patógenos*, tem como objetivo propiciar aos leitores uma visão geral e avançada sobre diferentes assuntos na área de resistência de plantas, abordando aspectos como a indução de resistência, efeito da nutrição mineral sobre a resistência de plantas, resistência genética, biotecnologia no melhoramento genético de plantas. A presente obra aborda informações relevantes sobre o assunto, organizada em 10 capítulos.

Essa obra, em parte, é resultado das palestras do III Colóquios em Fitopatologia Tropical.

Acreditamos que as informações aqui contidas serão de grande valia para utilização por produtores e técnicos, bem como para os professores e estudantes de Fitopatologia.

Agradecemos sinceramente aos autores deste livro pelo empenho e comprometimento na elaboração dos capítulos, bem como a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento concedido para elaboração desta obra.

**Jonas Alberto Rios**  
**Larissa Cavalcante Almeida**  
**Elineide Barbosa de Souza**  
Editores



# Editores e Colaboradores

## Editores

**Jonas Alberto Rios**, Professor Dr.  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade,  
Recife, PE, Brasil.  
E-mail: jonasufrpe@gmail.com.

**Larissa Cavalcante Almeida**, Doutoranda.  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade,  
Recife, PE, Brasil.  
E-mail: Larissa.cavalcantealmeida@ufrpe.br

**Elineide Barbosa de Souza**, Professora Dra.  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade,  
Recife, PE, Brasil.  
E-mail: elineidebsouza2020@gmail.com

## Autores

**Adriano Ferreira Martins**, Mestrando.  
UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-árido,  
Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Mossoró,  
RN.  
E-mail: adrianomartinsfe@gmail.com.

**Alessandro Nicoli**, Professor Dr.  
UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequi-  
tinhonha e Mucuri, Instituto de Ciências Agrárias,  
Unai, MG, Brasil.  
E-mail: alessandro.nicoli@ufvjm.edu.br.

**Alice Kazuko Inoue-Nagata**, Pesquisadora Dra.  
Embrapa Hortaliças - Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária. Brasília, DF, Brasil.  
E-mail: alice.nagata@embrapa.br.

**Ana Paula Oliveira de Barros**, Dra.  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Reci-  
fe, PE, Brasil.  
E-mail: barros-ana@hotmail.com.

**Antônio Félix da Costa**, Pesquisador Dr.  
IPA - Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife –  
Pernambuco, Brasil.  
E-mail: felix.antonio@ipa.br.

**Ana Maria Benko-Iseppon**, Professora Dra.  
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro  
de Biotecnologia, Departamentos de Genética, Recife,  
Pernambuco, Brasil.  
E-mail: ana.iseppon@ufpe.br.

**Artemisa Nazare Costa Borges**, Ms.  
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro  
de Biotecnologia, Departamentos de Genética, Recife,  
Pernambuco, Brasil.  
E-mail: borges.artemisanc@gmail.com.

**Camila de Moraes Rêgo-Machado**, Dra.  
Instituto Biológico - Departamento de Fitopatologia,  
Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF, Brasil.  
E-mail: camilamoraes.cmr@gmail.com.

**Carolline de Jesús-Pires**, Dra.  
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro  
de Biotecnologia, Departamentos de Genética, Recife,  
Pernambuco, Brasil.  
E-mail: carollinejpires@gmail.com.

**Daniel Debona**, Professor, Dr.  
UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Para-  
ná, Departamento de Agronomia - Área de Fitopato-  
logia, Santa Helena, PR, Brasil.  
E-mail: debona@utfpr.edu.br.

**Dênia Pires de Almeida**, Professor, Dra.  
UEMG - Universidade Estadual de Minas Gerais-Uni-  
dade Frutal, Frutal, MG, Brasil.  
E-mail: denia\_pires@hotmail.com

**Eduardo Chumbinho de Andrade**, Pesquisador Dr.  
Embrapa Mandioca e Fruticultura - Empresa Brasi-  
leira de Pesquisa Agropecuária. Cruz das Almas, BA,  
Brasil.  
E-mail: eduardo.andrade@embrapa.br.

**Elaine Welk Lopes Pereira Nunes**, Dra.  
UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-árido,  
Departamento de Ciências Agrônomicas e Florestais -  
Área de Fitossanidade, Mossoró, RN, Brasil.  
E-mail: elaine.nunes@ufersa.edu.br.

**Eveline Teixeira Caixeta**, Pesquisadora, Dra.  
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agro-  
pecuária, Embrapa Café, Brasília, DF, Brasil. E-mail:  
eveline.caixeta@embrapa.br.

**Fabício Ávila Rodrigues**, Professor Dr.  
UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento  
de Fitopatologia, Viçosa, MG, Brasil.  
E-mail: fabricio@ufv.br.

**Felipe Araújo Sousa**, Mestrando.  
UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Reci-  
fe, PE, Brasil.  
E-mail: sousa.felipea@gmail.com

**Flávia Czekalski de Araújo, Dra.**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamentos de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: flvtaraujo@gmail.com.

**Francisco de Assis dos Santos Diniz, Mestrando.**

UnB - Universidade de Brasília, Instituto Biológico - Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: francisco.diniz@aluno.unb.br.

**Glauber Henrique de Sousa Nunes, Professor.**

UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Departamento de Ciências Agrônomicas e Florestais - Área de Fitossanidade, Mossoró, RN, Brasil.

E-mail: glauber@ufersa.edu.br.

**Jadson Araújo da Silva, Mestrando.**

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, PE, Brasil.

E-mail: jadson.araujosilva@gmail.com.

**José Diogo Cavalcanti Ferreira, Dr.**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamentos de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: jdiogocavalcantif@yahoo.com.br

**José Ribamar Costa Ferreira-Neto, Dr.**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamentos de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: netocostaferreira@gmail.com.

**Kamila Câmara Correia, Professora Dra.**

UFCA - Universidade Federal do Cariri, Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Crato, CE. E-mail: kamila.correia@ufca.edu.br.

**Keilor da Rosa Dorneles, Pesquisador Dr.**

UFPEl - Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - FAEM, Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: keilor.rd@hotmail.com.

**Leandro José Dallagnol, Professor Dr.**

UFPEl - Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - FAEM, Pelotas, RS, Brasil.

E-mail: leandro.dallagnol@ufpel.edu.br.

**Leonardo Corrêa da Silva, Professor Dr.**

IFTO - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus Araguaatins, Araguaatins, TO, Brasil.

E-mail: leocalvino@yahoo.com.br.

**Leonardo Silva Boiteux, Pesquisador Dr.**

Embrapa Hortaliças - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF, Brasil. E-mail: leonardo.boiteux@embrapa.br.

**Lidiane L. Barbosa Amorim, Dra.**

IFPI - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Oeiras, PI, Brasil.

E-mail: lidiane.amorim@ifpi.edu.br.

**Maria Esther de Noronha Fonseca, Pesquisadora Dra.**

Embrapa Hortaliças - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: maria.boiteux@embrapa.br.

**Mitalle Karen da Silva Matos, Dra.**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamentos de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: mitallematos@gmail.com.

**Renata Oliveira Batista, Professora Dra.**

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciências Agrárias, Unai, MG, Brasil.

E-mail: renata.batista@ufvjm.edu.br.

**Risoneide de Cássia Zeferino Silva, Doutoranda.**

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Recife, PE, Brasil.

E-mail: cassiagroufrpe@gmail.com

**Roberta Rocha Ferreira, Ms.**

UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Mossoró, RN, Brasil.

E-mail: robertarochaf@hotmail.com.

**Sami Jorge Michereff, Professor Dr.**

UFCA - Universidade Federal do Cariri - Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Crato, CE. E-mail: sami.michereff@ufca.edu.br.

**Thaís Ribeiro Santiago, Professora Dra.**

UnB - Universidade de Brasília, Instituto Biológico, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, Brasil.

E-mail: thais.santiago@unb.br.

**Wilson Dias de Oliveira, Ms.**

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamentos de Genética, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: wilsondias.wo@gmail.com.

# Sumário

CAPÍTULO 1. <b>RESISTÊNCIA GENÉTICA DA PLANTA A AGENTES PATOGENICOS</b> .....	8
<i>Leandro José Dallagnol e Keilor da Rosa Dorneles</i>	
CAPÍTULO 2. <b>RESISTÊNCIA GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS À DOENÇAS</b> .....	46
<i>Renata Oliveira Batista, Eveline Teixeira Caixeta, Dênia Pires de Almeida, Leonardo Corrêa da Silva e Alessandro Nicoli</i>	
CAPÍTULO 3. <b>A BIOTECNOLOGIA APLICADA AO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS A PATÓGENOS</b>	70
<i>Glauber Henrique de Sousa Nunes, Roberta Rocha Ferreira, Elaine Welk Lopes Pereira Nunes, Adriano Ferreira Martins</i>	
CAPÍTULO 4. <b>NUTRIÇÃO MINERAL E A RESISTÊNCIA A DOENÇAS DE PLANTAS</b> .....	91
<i>Daniel Debona</i>	
CAPÍTULO 5. <b>BIOTECNOLOGIA NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS PARA RESISTÊNCIA A PATÓGENOS: EXEMPLOS DA APLICAÇÃO DE SISTEMAS DE SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES (SAM) NO TOMATEIRO</b> .....	121
<i>Maria Esther de Noronha Fonseca e Leonardo Silva Boiteux</i>	
CAPÍTULO 6. <b>INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO MANEJO DE DOENÇAS DE PLANTAS</b> .....	168
<i>Fabício Ávila Rodrigues</i>	
CAPÍTULO 7. <b>DA COSSUPRESSÃO À TECNOLOGIA DE RNAi: HISTÓRICO, MECANISMO E EXEMPLOS DE APLICAÇÃO TÓPICA DE RNA PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS</b> .....	182
<i>Camila de Moraes Rêgo-Machado, Francisco de Assis dos Santos Diniz, Alice Kazuko Inoue-Nagata, Eduardo Chumbinho de Andrade, Thaís Ribeiro Santiago</i>	
CAPÍTULO 8. <b>VIROSES EM FEIJÃO-CAUPI: FONTES DE RESISTÊNCIA, MARCADORES MOLECULARES, ÔMICAS E BIOTECNOLOGIA</b> .....	211
<i>Lidiane L. Barbosa Amorim, Alessandro Nicoli, José Ribamar Costa Ferreira-Neto, José Diogo Cavalcanti Ferreira, Artemisa Nazare Costa Borges, Carolline de Jesús-Pires, Flávia Czekalski de Araújo, Mitalle Karen da Silva Matos, Wilson Dias de Oliveira, Antonio Félix da Costa, Ana M. Benko-Iseppon</i>	
CAPÍTULO 9. <b>COMPONENTES DE RESISTÊNCIA PARCIAL DE PLANTAS A DOENÇAS</b> .....	242
<i>Jadson Araújo da Silva, Ana Paula Oliveira de Barros, Jonas Alberto Rios, Kamila Câmara Correia, Sami Jorge Michereff</i>	
CAPÍTULO 10. <b>ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA RESISTÊNCIA DE HOSPEDEIRO</b> .....	256
<i>Larissa Cavalcante Almeida, Jadson Araújo da Silva, Felipe Araújo Sousa, Risoneide de Cássia Zeferino Silva e Jonas Alberto Rios</i>	

Leandro José Dallagnol  
Keilor da Rosa Dorneles

## 1. Introdução

A origem e evolução das plantas terrestres transformou a biosfera da Terra (Morris et al., 2018). As plantas têm um papel fundamental na manutenção do equilíbrio em um ecossistema e na condução da maioria dos processos biológicos essenciais para a vida terrestre (Fernando, 2012). Podemos destacar, como mais importante para a vida, o seu papel na liberação de oxigênio no ar, o que constituiu uma força decisiva para a atual forma de vida existente na Terra, e o seu papel no ciclo da água. O que torna as plantas tão valiosas e importantes é que, juntamente com algas, elas são os únicos seres vivos capazes de sintetizar seu próprio alimento a partir da energia proveniente do sol. Entretanto, as plantas sintetizam muito mais alimento do que necessitam utilizar prontamente, e armazenam o excesso como reserva em folhas, caules, raízes, frutos ou sementes, para uso futuro. A capacidade de armazenamento dos fotosintetizados excedentes pelas plantas terrestres (Embryophyta) coloca-as como responsáveis por aproximadamente 80% da biomassa existente no planeta Terra (Bar-On et al., 2018).

Assim, a capacidade das plantas de remover dióxido de carbono do ar para completar o ciclo do carbono, atualmente ajudando a mitigar o efeito estufa e as mudanças climáticas, e convertendo este em fotoassimilados os quais são utilizados pelos seres humanos de diferentes formas torna as plantas um dos recursos de maior relevância para a humanidade. Basicamente, os produtos derivados das plantas são utilizados como: fonte de energia renovável, na produção de fibras, cosméticos e produtos medicinais, e talvez o mais básico e marcante, como fonte de alimento. Essas necessidades humanas básicas estão crescendo rapidamente por causa de uma população mundial crescente, aumento de renda e urbanização.

Embora derivados do petróleo e produtos sintéticos possam suprir algumas das demandas dos seres humanos, as plantas são recursos alimentares insubstituíveis. De fato, quase todos os alimentos humanos são plantas ou organismos que consomem plantas. Os seres humanos obtêm 85% de suas calorias de 20 espécies de plantas e, três espécies, trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*), suprem 60% dessa demanda (Bennett, 2015).

Parafraseando as palavras do Diretor Geral da FAO “*As plantas fornecem a base principal da vida na Terra e são o pilar mais importante da nutrição humana, mas plantas saudáveis não são algo que podemos dar como certo*” (Dongyu, Q, Diretor-geral da FAO, 2019), mostramos que mesmo com grande avanço no desenvolvimento de cultivares com alta capacidade produtiva, incremento na palatabilidade e valor nutricional dos produtos das principais plantas alimentícias, há uma ameaça constante que é o ataque de patógenos. Por exemplo, considerando as cinco principais espécies vege-

tais utilizadas como alimento básico [arroz, batata (*Solanum tuberosum*), milho, trigo e soja (*Glycine max*)], patógenos fúngicos (Fungos e Oomicetos) destacam-se como os principais vilões podendo comprometer significativamente a produção e consequentemente a segurança alimentar ao nível doméstico, nacional e global (Savary et al., 2019).

O emprego de cultivares resistentes no manejo das doenças de plantas é a medida mais eficiente e segura, a que apresenta a melhor relação custo-benefício, o menor impacto ambiental e a maior aceitabilidade pelos consumidores. Assim, neste capítulo, descreveremos os conhecimentos básicos da resistência de plantas a agentes patogênicos, considerando aspectos evolutivos de planta e do agente, como os diferentes tipos de resistência afetam o desenvolvimento de uma epidemia e como podemos trabalhar a ferramenta da resistência genética para torná-la efetiva por maior período tempo, isolada ou associada a outras medidas.




## 2. A resistência de plantas a potenciais patógenos

Plantas são desafiadas continuamente por diferentes **agentes**<sup>1</sup>, desde os menos complexos como os agentes moleculares (ex. vírus e viroides), passando por unicelulares (ex. bactérias) e multicelulares (ex. fungos e oomicetos) até agentes de organização estrutural mais complexa (ex. nematoides). Evidentemente que cada tipo de agente tem locais preferenciais (organela, estrutura, tecidos ou órgãos do hospedeiro) e estratégias distintas de ataque (**BOX 1**). Na **tabela 1** resumimos os principais mecanismos de ataque dos patógenos e os resultados de sua ação no hospedeiro. Como ferramenta de ataque os fitopatógenos como: fungos, bactérias, nematoides, oomycetes e vírus, produzem enzimas, toxinas específicas e não específicas, hormônios e/ou efetores, que agem sobre o metabolismo e funções celulares da planta, resultando na degradação de moléculas, alterações em funções celulares e supressão do sistema de defesa.

1 - **Agente:** bactéria, fungo, nematoide, oomiceto, vírus, viroide, fitoplasma, espiroplasma, etc. que possam tornar-se patógenos de uma espécie vegetal.



**BOX 1.** Estratégias de ataque utilizada por patógenos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos, estruturas formadas e exemplos de doenças de cada grupo.

	<b>Biotrófico</b>	<b>Hemibiotrófico</b>	<b>Necrotrófico</b>
<b>Estratégia de ataque</b>	Íntimo contato intracelular <sup>1</sup> com células do hospedeiro. Utilizam efetores para modular as defesas e processos fisiológicos da planta.	No início da infecção utiliza mecanismos semelhantes aos biotróficos. Fase biotrófica curta (normalmente inferior a 72 horas), seguida de fase necrotrófica com estratégias de ataque semelhante aos patógenos necrotróficos.	Secreta grande quantidade de enzimas degradadores de parede celular e toxinas <sup>2</sup> (específicas e não específicas)
<b>Característica da interação</b>	Dano mínimo a estrutura da célula vegetal a qual permanece viva durante a infecção e colonização pelo patógeno	No início da infecção causa danos mínimos a célula vegetal a qual permanece viva. Em seguida inicia a colonização do tecido vegetal causando danos extensivos a célula hospedeira.	Patógeno causa extensivo dano ao tecido vegetal causando sua morte. Patógeno coloniza e se nutre do tecido vegetal morto.
<b>Gama de hospedeiro</b>	Estreita, frequentemente uma única espécie vegetal é atacada.	Intermediária	Normalmente ampla.
<b>Exemplos de doenças</b>	Carvões, ferrugens, míldios, nematoses, oídios, viroses, entre outras.	Requeima ( <i>Phytophthora infestans</i> ), brusone ( <i>Magnaporthe</i> spp.), algumas antracnoses ( <i>Colletotrichum</i> spp.)	Podridão por bactérias ( <i>Erwinia</i> spp.), podridão por fungos ( <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> spp), mancha foliar ( <i>Bipolaris oryzae</i> )
<b>Sintoma de uma doença</b>			
	Oídio do trigo <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Antracnose do feijoeiro <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Mancha parda do arroz <i>Bipolaris oryzae</i>

1- Para fungos e oomicetos, geralmente não há penetração no citoplasma do hospedeiro, apenas estabelecimento de relação a nível de membrana extra-haustorial.

2- Toxinas específicas, também chamadas de seletivas, apresentam ação somente no hospedeiro do patógeno. Toxinas não específicas ou não seletivas apresentam ação em plantas hospedeiras e também em algumas plantas não hospedeiras.

**Tabela 1.** Exemplos de mecanismos de ataque de agentes patogênicos e sua ação sob o hospedeiro.

Mecanismo de ataque	Definição do mecanismo	Exemplos	Alvos celulares	Efeito fisiológico	Principais agentes
Enzima	Enzimas são proteínas, constituídas por cadeias de aminoácidos, responsáveis pela catálise das reações anabólicas e catabólicas nas células	Cutinases, celulasas, hemicelulasas, pectinases, poligalacturonases, proteases, fosfolipases, ligninases	Estruturas da planta (ex. cutícula, paredes da célula, lamela média, membranas)	Degradação de moléculas constituintes da estrutura da planta comprometendo o seu funcionamento biológico.	Fungos, Bactérias, Nematoides, Oomicetos
Fitotoxina	Produto produzido por patógeno que prejudica diretamente as células vegetais, podendo causar a morte celular, e que influencia o desenvolvimento da doença.	Ácido fusárico, coronatina, ofiobolinas, helmintosporal, tabtoxina	Metabolismo e funções celulares	Desestruturação e alteração de funções celulares	Fungos, Bactérias, Nematoides, Oomicetos
Efetores	Efetores são moléculas (proteínas, RNAs e metabólitos associados à virulência) liberadas ou associadas a um agente que modula a interação entre o patógeno e seu hospedeiro	Efetores de patógenos hemi e biotróficos AvrL567, AvrPiz-t, PgtSR1, Avr1  Efetores de patógenos necrotróficos* ToxA, Tox B, toxina T, toxina Al	Metabolismo e funções celulares	Suprimem as respostas de defesa da planta e modulam a sua fisiologia para adaptar o patógeno e liberar nutrientes	Fungos, Bactérias, Nematoides, Oomicetos, Vírus

\* Também conhecidos como toxinas específicas

Ácido fusárico: *Fusarium oxysporum*; coronatina: *Pseudomonas syringae*; ofiobolinas: *Cochliobolus miyabeanus*; helmintosporal: *Cochliobolus sativum*; tabtoxina: *Pseudomonas syringae* p.v. *tabaci* e *Pseudomonas syringae* p. v. *coronafaciens*; AvrL567: *Melampsora lini*; AvrPiz-t: *Magnaporthe oryzae*; PgtSR1: *Puccinia graminis*; Avr1: *Phytophthora infestans*; ToxA: *Parastagonospora nodorum* e *Pyrenophora tritici-repentis*; Tox B: *Pyrenophora tritici-repentis*; toxina T: *Cochliobolus heterostrophus*; toxina Al: *Alternaria alternata*

Os mecanismos de defesa da planta visam impedir que o **agente desafiador**<sup>2</sup> penetre nos tecidos ou células; impedir que seja estabelecido um sítio de infecção; impedir que do sítio de infecção o agente avance para outras partes sadias e/ou, pelo menos, reduzir a velocidade de avanço para as células sadias. Alguns dos mecanismos de defesa da planta são estruturais e constitutivos, ou seja, estão presentes na planta independente da presença do agente desafiador – estes mecanismos podem também ser chamados de pré-formados. Outros mecanismos são ativados e produzem respostas de defesa que são desencadeadas pela presença do agente desafiador – estes mecanismos são também chamados de pós-formados. Os mecanismos de defesas, pré- e pós-formados, da planta podem atuar como barreiras físicas e químicas. As barreiras físicas impedem e ou dificultam a penetração e colonização do agente desafiador enquanto que as barreiras químicas formam um ambiente tóxico para o agente desafiador, comprometendo suas funções vitais, causando, muitas vezes, a sua morte. Didaticamente, separamos as barreiras de defesa em pré- e pós-formadas, estruturais e (bio)químicas. Entretanto, devemos ter em mente que a resistência de plantas a agentes desafiadores é complexa e que as diferentes barreiras atuam concomitantemente, e evidentemente, que dependendo do agente desafiador podem ter contribuições variáveis, ora uma mais importante ora outra. Outrossim, a resistência de plantas a agentes desafiadores é ordenada e orquestrada, de resposta rápida e intensa, mas dependente do tipo de estímulo recebido.

Neste capítulo, o termo de resistência de planta não hospedeira (RNH) será empregado para definir a resistência presente em uma espécie vegetal que impede o estabelecimento da uma relação parasitária estável por todos os variantes genéticos de determinada espécie de agente desafiador. Quando o agente desafiador consegue vencer a RNH, torna-se patógeno da espécie vegetal, e então atua a **resistência de planta hospedeira**<sup>3</sup>, tratada com mais detalhes a frente, a qual pode ser uma resistência completa, evitando a doença, ou uma resistência parcial, a qual retarda o desenvolvimento da doença.

## 2.1. Mecanismos de defesa pré-formados

A maioria dos agentes desafiadores de plantas, normalmente, não conseguem penetrar na célula vegetal por serem bloqueados pelas barreiras físicas presentes na sua superfície dos tecidos do hospedeiro e que se constituem em mecanismos de resistência pré-invasão (Kamoun, 2001; Pinosa et al., 2013). A primeira linha de defesa quando um agente entra em contato com a planta é a barreira imposta pela cutícula e parede celular.

A cutícula é estruturalmente variável entre espécies vegetais, mas em sua essência é composta por cutina, ceras e hidrocarbonetos, e ela está intimamente associada à parede celular das células da epiderme (Serrano et al., 2014). Em algumas espécies vegetais, metabólitos secundários como flavonoides e triterpenóides, com ação antimicrobiana, também podem ser encontrados na cutícula (Buschhaus & Jetter, 2012; Jetter et al., 2006; Samuels et al., 2008). Assim, a cutícula constitui *per se* uma barreira físico-química para penetração direta do agente desafiador. Neste sentido, para conseguir vencer a barreira

2 - **Agente desafiador:** qualquer agente que tente estabelecer relação parasitária com a planta.

3 - **Resistência de planta hospedeira:** capacidade da planta de evitar ou atrasar os processos de infecção e colonização dos seus tecidos pelo patógeno

imposta pela cutícula o agente necessita utilizar mecanismos que reduzam a resistência da mesma, como, por exemplo, a secreção de enzimas cutinases e ou força mecânica.

Constituintes da cutícula criam um ambiente hidrofóbico o qual pode ser favorável ao agente patogênico atuando como sinal para germinação de esporos fúngicos e formação de estruturas infectivas; ou desfavorável, por reduzir a formação de um filme contínuo de água livre na superfície da planta o qual é essencial para movimentação de certos agentes patogênicos como bactérias e oomicetos. Contudo, a contribuição na resistência da planta pela cutícula vai além da simples ação física. Pesquisa tem demonstrado a existência de uma complexa inter-relação entre lipídeos cuticulares e a resposta imune da planta sugerido que a cutícula também participa das respostas de defesas dinâmicas com circuitos de sinalização e moléculas elicitoras (Reina-Pinto & Yephremov, 2009).

A parede celular atua como uma barreira física aos agentes patogênicos devido a sua constituição complexa englobando celulose, hemicelulose, pectina e lignina. Estes constituintes básicos da parede celular requerem por parte do agente patogênico a presença de enzimas específicas (celulases, xilanases, poligalacturonases, pectato liase, pectina metil esterase, entre outras) para degradação e 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. Contudo, a parede celular das plantas é uma estrutura dinâmica e a sua perturbação induz uma rápida reorganização da mesma, por mecanismos compensatórios, para minimizar os danos (Caño-Delgado et al., 2003; Hamann, 2012). Por exemplo, planta mutante deficiente em celulose exibe aumento na lignificação da parede celular. Esta mudança na parede resultou 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 necrotróficos, quando afetou também a parede secundária (Caño-Delgado et al., 2003; Ellis & Turner, 2001; Hamann, 2012; Hernández-Blanco et al., 2007). Adicionalmente, proteínas quinases associadas à parede funcionam como sensores, monitorando a integridade dos constituintes da parede celular, e sinalizadoras para defesa quando detectam dano aos seus constituintes, por exemplo a ação das poligalacturonases na pectina (Ferrari et al., 2013; Galletti et al., 2009). Entretanto, nosso conhecimento da interação planta e agente patogênico ao nível de parede celular e como isto afeta a sinalização para a expressão das defesas ainda é incipiente. Assim, a expansão no entendimento das modificações na parede celular que ocorrem durante a interação planta - agente desafiador é necessário para melhorar nossa compreensão (Malinovsky et al., 2014).

No citoplasma da célula temos o citoesqueleto composto por 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. O citoesqueleto atua como um componente estrutural das células eucarióticas para suporte as forças de compressão e também como constituinte essencial na resposta da planta contra penetração de agentes desafiadores 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). O citoesqueleto, em especial os filamentos de actina, também contribui para a resistência por desempenhar um importante papel no movimento (fechamento e abertura) estomático (Day et al., 2011; Porter & Day, 2016). O fechamento estomático em resposta a presença de agentes desafiadores na superfície vegetal foi demonstrado ser um importante mecanismo ativo limitando a entrada do agente nos tecidos da planta (Melotto et al., 2006; 2008).

Concomitantemente aos mecanismos físicos, as plantas sintetizam uma ampla gama de metabolitos secundários, muitos dos quais podem atuar como antimicrobianos e assim contribuir para resistência. A maior parte dos compostos com ação antimicrobiana é derivada das rotas dos isoprenóides, fenilpropanóides, alcaloides ou ácidos graxos/policetídeos (Dixon, 2001). Os compostos bioquímicos do metabolismo 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 (González-Lamothe et al., 2009; Grayer & Kokubun, 2001).

As fitoantecipinas são os compostos antimicrobianos produzidos constitutivamente pela planta, sem a necessidade da presença do agente patogênico, sendo as classes mais conhecidas dos fenóis e glicosídeos fenólicos, lactonas insaturadas, compostos sulfúricos, glicosídeos cianogênicos, saponinas e glucosinolatos (Bednarek et al., 2009; González-Lamothe et al., 2009; Osbourn, 1996). Proteínas e peptídeos antimicrobianos como lisozimas,  $\gamma$ -tionin, defensinas, proteínas ligantes de quitina (PLQ), proteínas de transferência de lipídeos (LTPs), inibidores de protease e poligalacturonase, entre outras, também tem recebido atenção nos últimos anos como mecanismos de defesa desta classe (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; Pelegriani & 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). Dois pontos interessantes em compostos antimicrobianos estão relacionados ao local na planta e a forma como são encontrados. Quanto a localização, alguns dos compostos químicos sintetizados são encontrados na sua superfície da planta, enquanto que outros são acumulados em vacúolos ou em organelas das células, principalmente as próximas à superfície do hospedeiro, e liberados por meio de enzimas hidrolíticas após ataque do agente desafiador (González-Lamothe et al., 2009). Quanto à forma que são armazenados, 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 agentes patogênicos (Dixon, 2001; Osbourn, 1996).

Em relação ao modo de ação dos compostos bioquímicos o nosso conhecimento ainda é incipiente. Entre os compostos que foi descrito seu modo de ação sobre agentes desafiadores é verificado que atuam na desestabilizando membranas, comprometem a atividade de proteínas e enzimas, interferem na homeostasis do redox celular, na cadeia de transporte de elétrons, na biossíntese de proteínas, na biossíntese e integridade de constituintes da 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; Pelegriani & Franco, 2005; Piasecka et al., 2015; Pusztahelyi et al., 2015; Sun et



al., 2008; Wang et al., 2005). Como exemplo, a ação da  $\alpha$ -tomatina em tomate (*Solanum lycopersicum*) e da avenacina A-1 em aveia (*Avena* spp.), compromete a bicamada lipídica da membrana de microrganismos levando a 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 agentes patogênicos sendo, portanto, uma importante parte do repertório de defesas das plantas (Ahuja et al., 2012; González-Lamothe et al., 2009; Jeandet et al., 2014; Piasecka et al., 2015). A indução da produção de fitoalexina pode ser desencadeada pelo reconhecimento pela planta da presença de um patógeno adaptado, e também de um agente não patogênico. O modo de ação das fitoalexinas é bastante variável e, semelhantemente as fitoantecipinas, para muitas moléculas ainda desconhecido. Por exemplo, a camalexina – uma das fitoalexinas mais conhecida – causa danos na membrana celular (fungo e bactéria), reduz a permeabilidade da parede celular (fungo), compromete o enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático (fungo) e induz a morte programada da célula (fungo) (Ahuja et al., 2012).

## 2.2. Mecanismos de defesa pós-formados

Na chegada à superfície vegetal, o agente desafiador se depara, além dos obstáculos físicos e químicos descritos anteriormente, com um elaborado sistema de vigilância em cada célula. Esse sistema de vigilância é composto por sentinelas moleculares que sinalizam para ativar respostas de defesa local e com capacidade de sinalização sistêmica a partir do reconhecimento de um potencial patógeno (Jones & Dangl, 2006). O reconhecimento de um agente patogênico pela planta pode ser dar por meio da detecção de moléculas conservadas do agente desafiador ou liberados da própria planta devido a ação do agente desafiador; ou por meio da detecção de fatores, de virulência ou agressividade, produzidos/secretados pelo agente como mecanismo para ataque da planta.

Moléculas conservadas, também chamadas de padrões moleculares associados a microrganismo/patógeno (MAMP/PAMP – *microbe/pathogen-associated molecular patterns*), são uma vasta gama de moléculas essenciais ao agente desafiador e que apresentam estrutura molecular conservada, inclusive entre diferentes espécies, gêneros e famílias. Alguns MAMPs têm função estrutural, como constituinte da parede celular (ex. quitina, glicano, oligoquitosana, peptidoglicano, entre outros), da membrana plasmática de fungos e membrana externa de bactérias gram-negativa (ex. ergosterol e lipopolissacarídeos), do flagelo (ex. flagelina), ou como proteína (capa proteica de vírus) ou apresenta ação enzimática (ex. celulase, cutinase, etc.), atua na biossíntese de proteínas (ex. fator de alongação TU), atua como fator de virulência (ex. Avr2, Avr4, Avr9 de *Cladosporium fulvum*), entre outros (Albert, 2013; Boller & Filex, 2009; Boutrot & Zipfel, 2017; Couto & Zipfel, 2016; Dallagnol & Araújo Filho, 2018; Dodds & Rathjen, 2010; Giraldo & Valent, 2013; Newman et al., 2013; Wirthmueller et al., 2013). Os MAMPs funcionam como elicitores para ativar o sistema de defesa da planta quando reconhecidos pelo seu sistema de vigilância.

Alguns agentes desafiadores, durante a tentativa de penetração no tecido vegetal, causam danos a cutícula, parede celular e membranas, liberando fragmentos destas estruturas atacadas e também componentes citoplasmáticos, que funcionam como elicitores. Estes fragmentos da planta são chamados de padrões moleculares associados a danos (DAMP – *damage-associated molecular patterns*). Alguns exemplos de DAMPs são fragmentos de polissacarídeos da parede celular ou produtos degradantes (ex. oligogalacturonídeos, xiloglicano, metanol), proteínas e peptídeos apoptóticos (ex. sistemina, inceptina, peptídeos elicitores de planta - Peps), nucleotídeos extracelular (ex. eATP, eNAD(P), eDNA), açúcares extracelular (ex. sacarose, glicose, maltose, frutose), aminoácidos extracelular (ex. glutamato, cisteína, histidina, ácido aspártico), glutatião, monômero de cutina, entre outros (Boutrot & Zipfel, 2017; Hou et al., 2019).

Os elicitores (MAMP/PAMP/DAMP) são reconhecidos pela planta por meio de proteínas chamadas de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs – *Pattern recognition receptors*), os quais são sintetizados no retículo endoplasmático e transportados para a membrana plasmática (Frescatada-Rosa et al., 2015). Alguns exemplos de PRRs, seu respectivo elicitor reconhecido e a planta onde foi descrito pela primeira vez pode ser observado na **tabela 2**. O reconhecimento do elicitor pelo receptor inicia modulações fisiológicas na célula que sinalizam para expressão gênica que resulta em resistência (resposta imune / resistência de não hospedeiro - RNH) também chamada de resposta imune desencadeada por padrão/patógeno/PAMP (*Patterns triggered immunity / Pathogen triggered immunity / PAMP triggered immunity* - PTI).

**Tabela 2.** Exemplos de padrões moleculares associados a microrganismo (MAPMs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), da molécula ou fragmento do elicitor reconhecido pelo receptor de reconhecimento de padrão (PRR), o tipo de PRR envolvido, e a planta onde foi originalmente descrito.

MAMPs					
Microrganismo	Fonte	Molécula/fragmento	PRRs	Tipo de PRR	Espécie onde é encontrado
Bactéria	Proteína tipo Nep1	Npl20	RLP23	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	-	eMAX	ReMAX/LRP1	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	raxX	RaxX21	XA21	LRR-RLP	<i>Oryza sativa</i>
	Permease	Xup25	XPS1	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Proteína de choque frio	csp22	CSPR	LRR-RLP	<i>Nicotiana benthamiana</i>
		csp22	CORE	LRR-RLP	<i>Solanum lycopersicum</i>
	Flagelina	Epítipo fgl22	FLS2	LRR-RLP	Plantas superiores
		Epítipo fgIII-28	FLS3	LRR-RLP	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
	Fator de elongação TU (EF-Tu)	Epítipo elf18	EFR	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Componente da parede celular/ Membrana externa	Peptidoglicano	LYM1/LYM3	LysM-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
		Exopolissacarídeo	EPR3	LysM-RLK	<i>Lotus japonicus</i>
		Lipopolissacarídeo	LORE	Lectina-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>

MAMPs					
Microrganismo	Fonte	Molécula/fragmento	PRRs	Tipo de PRR	Espécie onde é encontrado
Fungo	Proteína	Ave1	Ve1	LRR-RLP	<i>Solanum lycopersicum</i>
		Avr3-Six1	I-3	LEC-RLK	<i>Solanum pennellii</i>
		Avr2, Gr-VAP1	Cf-2	LRR-RLP	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
		Avr4	Cf-4	LRR-RLP	<i>Solanum hirsutum</i>
		Avr5	Cf-5	LRR-RLP	<i>Solanum lycopersicum</i>
		Avr9	Cf-9	LRR-RLP	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
		Avr4E	Hcr9-4E	LRR-RLP	<i>Solanum hirsutum</i>
		AvrLm1, AvrLm2	LepR3/RLM	LRR-RLP	<i>Brassica napus</i>
		Avr1/Six4	I	LRR-RLP	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
	Toxina	SnTox1	Snn1	WAK-RLK	<i>Triticum aestivum</i>
	Xilanase	Xilanase indutora de etileno	Eix1/Eix2	LRR-RLP	<i>Solanum lycopersicon</i>
	Pectinase	Endopoligalacturonase	RLP42/RBPG1	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Componente da parede celular	Quitina	CEBiP	LsyM-RLP	<i>Oryza sativa</i>
			LYP4, LYP6*	LsyM-RLP	<i>Oryza sativa</i>
LYM2			LsyM-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
LYK5, CERK1			LsyM-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Componente proteináceo	Sclerotinia culture filtrate elicitor1 – SCFE1	RLP30	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Oomiceto	Elicitina	INF1	ELR/RLP85	LRR-RLP	<i>Solanum microdonatum</i>
	Necrose e peptídeo indutor de etileno	nlp20	RLP23	LRR-RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DAMPs					
Planta	Peptídeo	Peptídeo RALF (fator de rápida alcalinização)	FER	Malectin-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
		Sistemina	SR160	LRR-RLK	<i>Solanum peruvianum</i>
	Componente da parede celular	Oligogalacturonídeos	WAK1	EGF-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Peptídeo elicitor de planta	Pep1-6	PEPR1	LRR-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
		Pep1-2	PEPR2	LRR-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	ATP extracelular	eATP	DORN1	Lectina-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Peptídeos secretados induzidos por PAMP	PIP1	RLK7	LRR-RLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Abreviações: EGF (*epidermal growth factor*): fator de crescimento epidermal; LRR (*leucine-rich repeat*): região rica em leucina; LysM (*lysine motif*): motivo de lisina; 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. \* reconhece também peptidoglicano. Adaptado de Dallagnol & Araújo Filho, (2018), Noman et al., (2019) e Saijo et al., (2018).

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 elicitador, sendo espaço temporal dinâmicas, e continuamente expressas durante horas ou dias. Imediatamente após o reconhecimento do elicitador pela PRR, eventos de sinalização ativam respostas de defesa relacionadas a patógenos, como aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativação de proteínas quinase (quinase dependente de cálcio (CDK) e quinase ativada por mitogêno (MAPK)), fosforilação de proteínas, alterações na regulação de genes para a produção de compostos de defesa, remodelação da actina, restrição da transferência de nutrientes do citosol para o apoplasto e o fechamento estomático.

A PTI desencadeada pelo reconhecimento de elicitador pode resultar em morte localizada de poucas células no local de penetração do agente desafiador (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). Esta morte de células do hospedeiro induzida pelo reconhecimento do potencial patógeno é também chamada de **resposta de hipersensibilidade**<sup>4</sup> (HR). Na PTI com HR é observado o acúmulo de EROs, sinalização envolvendo quinases (CDK e MAPKs), biossíntese de hormônios, especialmente ácido salicílico, ácido jasmônico ou etileno, e reprogramação da expressão 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 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, dos 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 agente desafiador na célula vegetal (Baxter et al., 2014; Dallagnol & Araújo Filho, 2018; Dodds & Rathjen, 2010; Stael et al., 2015; Trdá et al., 2015; Uma et al., 2011).

No caso de PTI 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 agente desafiador 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 RNH e impede que o agente desafiador se estabeleça em seus tecidos, ou não possui a RNH e, neste caso, é hospedeira do agente desafiador, o qual é então chamado de patógeno.

Evidentemente que a PTI exerce pressão seletiva sobre a potencial espécie patogênica. Essa pressão de seleção favorece indivíduos que produzem proteínas ou outras moléculas efetoras as quais interferem ou bloqueiam a ativação ou a expressão das defesas da planta, e assim induzindo suscetibilidade na planta, também chamada de suscetibilidade induzida por efetor (*Effector-triggered susceptibility* – ETS). Assim, o agente desafiador que

**4 - Resposta de hipersensibilidade:** morte celular rápida e localizada no local da infecção em interações resistentes entre plantas e patógenos.

consegue burlar o sistema de defesa de RNH da planta e estabelecer um sítio de infecção é chamado de patógeno. Portanto, os patógenos adaptados à espécie vegetal produzem fatores de virulência, chamados de efetores, os quais são 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 independentemente do tipo de parasitismo (biotrófico, hemibiotrófico ou necrotrófico) que estabelece com o hospedeiro, e atuam suprimindo a RNH e a resistência de hospedeiro, e também modificando a fisiologia celular do hospedeiro para obtenção de nutrientes e favorecer a colonização (Lo Presti et al., 2015). Em contraste com os MAMPs que são conservados, os efetores são altamente variáveis e frequentemente dispensáveis (Dodds & Rathjen, 2010).

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 EROs, organização do citoesqueleto, entre outros alvos) (Deslandes & Rivas, 2012; Lo Presti et al., 2015). A secreção dos efetores pelo patógeno 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).

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). Proteínas dos genes *R* em sua forma inativa (ausência do cognato efector) tipicamente estão localizadas no citoplasma da célula hospedeiras ligadas à membrana plasmática, ao retículo endoplasmático ou tonoplasto, e na presença do cognato efector 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). Assim, a detecção da presença de um efector ou de sua atividade na célula do hospedeiro pela proteína R ativa a resistência desencadeada por efector, chamada de resposta imune desencadeada por efector (ETI- *effector triggered immunity*) (Boller & Felix, 2009; Giraldo & Valent, 2013). A ETI é um dos principais componentes da resistência de hospedeiro.

As respostas de defesa ativadas na ETI são semelhantes àquelas da PTI com HR. Assim, o sistema imune da planta detecta elicitores (MAMP ou efector), e, portanto, a detecção de agentes desafiadores e a ativação da resposta imune da planta são determinadas por qualquer tipo de receptor da planta que reconhece ligantes apropriados para ativar a defesa (Thomma et al., 2011). Do ponto de vista do sistema imune da planta, a natureza e a função intrínseca do elicitor não são relevantes, desde que exponha oportuna e com precisão o potencial invasor para o sistema de vigilância da planta (PTI ou ETI) e assim seja interrompido o processo de infecção (Thomma et al., 2011).



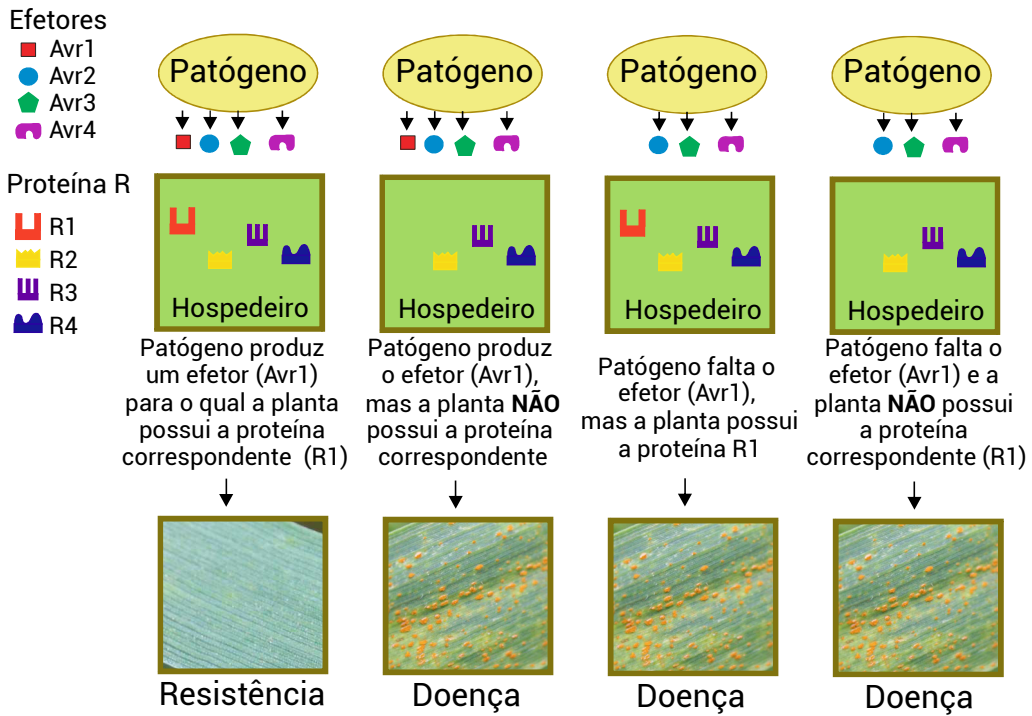
### 3. Resistência de hospedeiro: genes dominantes e recessivos e a resistência quantitativa

Patógenos adaptados a determinada espécie vegetal se deparam com a resistência de hospedeiro. Esta resistência é caracterizada como a habilidade da planta de evitar ou atrasar a infecção, colonização e ou reprodução do patógeno. Na resistência de hospedeiro, a mais conhecida e fácil de ser visualizada no fenótipo da planta é a resistência conferida pelo gene *R* devido à ausência de sintomas da doença na planta que possui um gene *R* efetivo contra o patógeno desafiante. Assim, imediatamente após a detecção do efector pela proteína *R* (produto do gene *R*) é desencadeada uma cascata de sinalização que culmina na expressão de genes de defesa e HR para conter o avanço do patógeno, resultando na resistência. A resistência (ETI) desencadeada pelo reconhecimento do efector é qualitativa (geralmente é resistência completa – sem sintomas da doença), também conhecida como resistência vertical (Boller & Felix, 2009; Giraldo & Valent, 2013). A ETI, muitas vezes, é uma resistência raça específica, ou seja, a proteína *R* presente na planta reconhece determinado efector, dentre os muitos presentes no repertório do patógeno, que está presente apenas em uma ou algumas das **raças**<sup>5</sup> do patógeno.

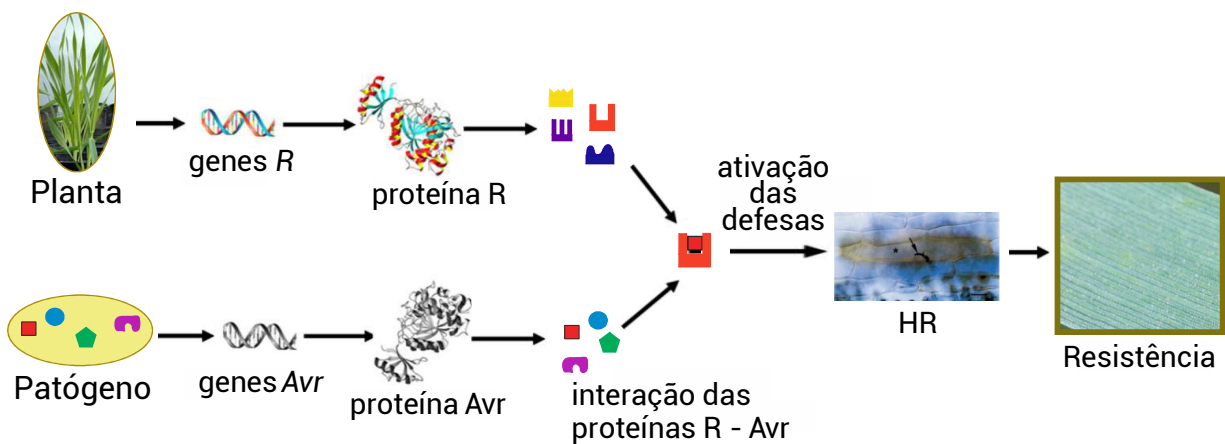
Os genes *R*, por serem genes com elevado efeito no fenótipo, são aqueles comumente utilizados em programas de melhoramento para a obtenção de genótipos com resistência qualitativa. A explícita relação entre o gene *R* da planta e o gene *Avr* do patógeno foi base para o estabelecimento da hipótese da 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* (efector). 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 pareamento entre a proteína *R* e efector (Li et al., 2015). A **figura 1A** demonstra o resultado (resistência ou doença) das diferentes possibilidades de interação entre presença ou ausência de proteína *R* e presença ou ausência da proteína *Avr*. Na **figura 1B** está claro que para termos resistência a planta precisa conter em seu genoma e expressar o gene *R* e sintetizar a proteína *R*, enquanto que o patógeno precisa conter o gene *Avr*, expressar e secretar a proteína *Avr* – especificamente a proteína *Avr* (efector) reconhecido pela proteína *R*. 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 EROs, PR proteínas, fenóis, fitoalexinas, calose, entre outras respostas (Kushalappa et al., 2016). No **BOX 2** está descrito os modelos propostos de como as proteínas *R* reconhecem os efetores.

**5 - Raça:** um subgrupo ou biótipo dentro de uma espécie e que normalmente diferem em patogenicidade (virulência) entre genótipos do hospedeiro, mas não por sua morfologia.

### A - Resultado da interação envolvendo gene de resistência dominante



### B - Interação planta-patógeno e desenvolvimento da resistência

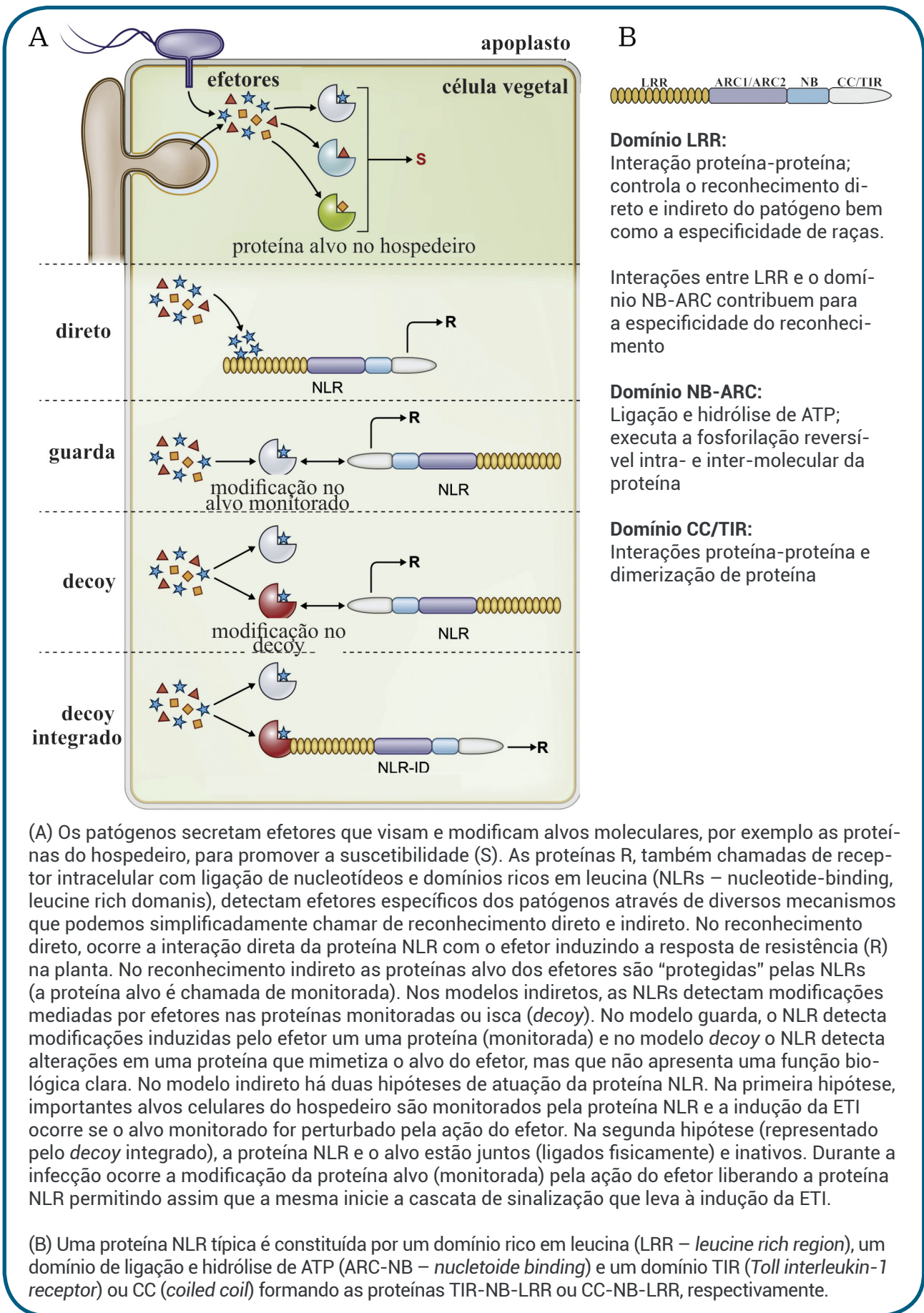


**Figura 1.** O modelo gene-a-gene. (A) Os quatro isolados de um patógeno produzem um vasto e distinto repertório de moléculas efetoras. Dois dos quatro isolados carregam o gene *Avr1* e, portanto, produzem a molécula efetora *Avr1* (vermelha). Cada um dos quatro genótipos do hospedeiro

possui um repertório de genes *R*, e dois dos quatro possuem o gene *R1*, que codifica a proteína R1 que permite que as plantas reconheçam a proteína Avr1 do patógeno. Uma planta é resistente ao patógeno apenas quando um isolado portador do gene *Avr1* interage uma planta portadora do gene *R1*, desencadeando, assim, mecanismos de defesa mediados pelo gene *R* que culmina no impedimento do desenvolvimento da doença (esquerda). Em todos os outros casos, a planta é incapaz de reconhecer o patógeno (devido à ausência no patógeno dos efetores que a planta possuiu genes *R* correspondentes ou pela ausência na planta de genes *R* que reconheçam algum dos efetores do repertório produzido pelo isolado desafiante) e, portanto, é suscetível a infecção e manifesta os sintomas de doenças. As fotografias mostram resultados resistentes e suscetíveis após a inoculação de folhas de trigo (*Triticum aestivum*) com o fungo agente causal da ferrugem da folha (*Puccinia triticina*). (B) Nas relações gene-a-gene, uma planta portadora de um gene de *R* (que é expresso e codifica para a proteína R) resiste ao patógeno portador dos efetores correspondentes (efetores codificados por genes *Avr* e que são reconhecidos pela (s) proteína (s) R da planta), por meio da resposta de hipersensibilidade (HR) que é uma forma de morte celular programada. A HR é o resultado da cascata de sinalização desencadeada pela proteína R quando reconheceu um dos efetores do patógeno e envolve, entre outras repostas, o influxo de íons  $Ca^{2+}$  do espaço extracelular e / ou fluxo de ânions, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e a ativação dos genes de defesa, resultando finalmente no desenvolvimento da resistência ao patógeno invasor. Adaptado de Gururani et al. (2012) e Hammond-Kosack & Jones (2015)

A ETI pode ser considerada resistência completa contra o agente patogênico. Na ausência da ETI funcional ocorre à infecção da planta. Neste 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. 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.

**BOX 2.** Modelos propostos de reconhecimento do efetor pela proteína R e domínios encontrados em uma proteína R típica.



A resistência quantitativa pode ser quantificada com base nos processos monocíclicos (componentes de resistência): como eficiência de infecção (porcentagem de estruturas infectivas do patógeno que entram em contato com o hospedeiro e efetivamente formam lesões), período de incubação (período de tempo entre a chegada do patógeno no hospedeiro e a visualização dos sintomas da doença), período latente (período de tempo entre a chegada do patógeno no hospedeiro e a produção de novas estruturas infectivas), taxa de expansão da lesão (velocidade, expressa em mm por horas ou dias, que o patógeno avança nos tecidos da planta causando danos ao tecido visualizado como lesão), taxa de esporulação por lesão (produção diária de novas estruturas infectivas por unidade de área afetada pela doença), 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).

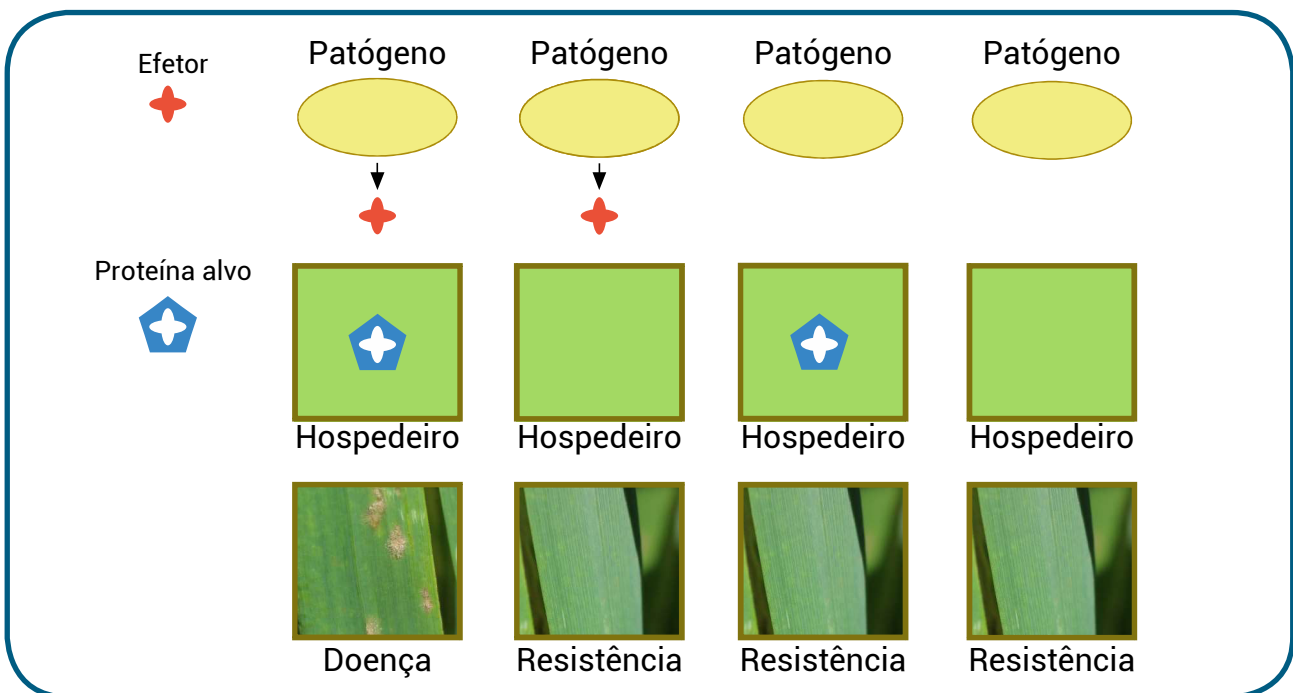
Ainda do ponto de vista fenotípico, a resistência quantitativa exhibe uma distribuição contínua de valores de resistência que não se ajusta nas proporções de segregação Mendeliana. Embora na definição de Parlevliet (1978) não contenha a noção de que a herança seja poligênica, os resultados de pesquisa 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). Ademais, os mecanismos que atuam na resistência quantitativa também podem estar relacionados as características associadas à regulação de crescimento e desenvolvimento, defesa basal, produção de compostos de defesa, tradução de sinal, ou fraça ETI ativada por proteínas “R” defeituosas ou outros mecanismos ainda não identificados (Poland et al., 2009).

Considerando que genes de defesa contribuem para resistência quantitativa, e que patógenos secretam efetores que tem 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 por que eles são expressos em altos níveis ou no momento mais apropriado, ou porque podem ser mais difíceis de serem manipulados 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 a possibilidade que dentro da espécie hospedeira, indivíduos diferem na facilidade pelo qual efetores de um certo patógeno ou raça do patógeno pode suprimir a PTI. Se as diferenças na resistência quantitativa entre genótipos 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 genótipos do hospedeiro.

Seguindo nessa linha de facilidade de acesso e/ou disponibilidade de alvo no hospedeiro, também podemos abordar, embora haja pouco relatos, a resistência completa conferida por genes recessivos. Estes genes, que podemos chamar de genes de suscetibilidade (genes S), de fato são reguladores negativos das defesas, e quando bloqueada sua expressão leva a resistência (Pavan et al., 2010). Alguns exemplos de resistência governada por genes recessivos são: *mlo* em cevada (*Hordeum vulgare*) – confere resistência



a oídio; *xa5* e *xa13* em arroz – confere resistência a certas raças de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; *edr1* em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) – confere resistência a vários patógenos; *elf4* em várias espécies de cereais – confere resistência a vírus de RNA, principalmente da família *Potyviridae* (Hammond-Kosack & Jones, 2015). 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 (*Pisum sativum*), pimentão (*Capsicum annuum*) e trigo (Niks et al., 2015). Nestes casos, diferentemente da resistência governada por genes dominantes, o fenótipo de suscetibilidade ocorre quando há reconhecimento da proteína na planta pelos fatores de virulência do patógeno. Veja o modelo simplificado na **figura 2**. Semelhantemente ao apresentado na **figura 2**, temos também os genes de insensibilidade a toxinas de patógenos necrotróficos, em que a ausência da proteína sensível a toxina, confere insensibilidade a toxina, resultando em redução da doença e em algumas situações até resistência ao patógeno. Como exemplo podemos citar o gene *Tsn1* em trigo. Os patógenos fúngicos do trigo *Parastagonospora nodorum* e *Pyrenophora tritici-repentis*, que produzem toxina seletiva de hospedeiro ToxA a qual induz suscetibilidade apenas em genótipos que possuem o correspondente gene de sensibilidade à toxina *Tsn1*. Interessantemente, a proteína *Tsn1* possui características que lembram uma proteína R o que indica que esses patógenos necrotróficos podem subverter os mecanismos de resistência adquiridos pelas plantas para combater outros tipos de patógenos, como biotróficos, produzindo moléculas que provocam a morte. Não se enquadra no modelo da figura 2, o gene *Hm1* do milho, o qual confere resistência a *Cochliobolus carbonum* como uma característica dominante, pois codifica uma redutase que inativa a toxina HC produzida pelo fungo.



**Figura 2.** Modelo de interação planta-patógeno com resistência governada por gene recessivo. No modelo a planta possui uma molécula alvo, a qual é codificada por um gene de suscetibilidade (gene S), de um efector do patógeno. A ação do efector na molécula alvo é crucial e decisivo para que o patógeno consiga estabelecer a relação parasitária com a planta. Assim, a doença (esquer-

da) somente se manifesta quando o patógeno codifica o efetor e a planta produz a molécula alvo permitindo que uma reação de suscetibilidade seja promovida. Nos demais casos, a ausência do efetor específico no patógeno ou a ausência da molécula alvo na planta, devido ao gene recessivo (gene *s*) evita a infecção e conseqüentemente o fenótipo será de resistência. As fotografias mostram resultados resistentes e suscetíveis após a inoculação de folhas de cevada (*Hordeum vulgare*) com o fungo agente causal do oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*).

Em se tratando de genes de resistência com mecanismos diversos, ainda podemos destacar genes que codificam proteínas diversas e com mecanismos de funcionamento diferente das típicas proteínas R. Por exemplo os loci *Lr34* em trigo e *Rhg1* em soja (Dallagnol & Araújo Filho, 2018). No caso do loci *Lr34* o qual confere resistência durável em plantas adultas de trigo, sendo expressa especialmente na folha durante o enchimento de grãos, 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*)] (Krattinger et al., 2009; Cao et al., 2012). O *Lr34*, por meio de melhoramento de plantas, foi introduzido e está presente na maioria das cultivares de trigo em todo o mundo. O *Lr34* codifica um transportador ABC (*ATP-binding cassette*) que é responsável por translocar compostos tóxicos armazenados em células vegetais (possivelmente no vacúolo) até o ponto de entrada de fungos, impedindo o crescimento.

Em suma, 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). Do ponto de vista de durabilidade da resistência, a resistência conferida pelos genes *R* exerce pressão de seleção na população do patógeno a favor de indivíduos que conseguem evadir da detecção pelas proteínas R, sendo, portanto, a durabilidade desta resistência dependente da essencialidade do efetor para virulência ou adaptabilidade do patógeno e do seu potencial evolucionário. 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. O mesmo pode-se esperar da resistência de herança recessiva, a exemplo da conferida pelo *mlo*, onde o patógeno deve obter um ganho nos mecanismos de patogenicidade – identificação de um novo alvo para induzir suscetibilidade no hospedeiro, o que é menos provável, quando comparado a modificação e ou deleção de um efetor para evadir da detecção da proteína R.

## 4. Coevolução de patógenos e plantas

Coevolução é um processo durante o qual uma característica de uma espécie evolui em resposta a uma característica de outra espécie, que por sua vez evolui em res-

posta a característica da primeira espécie (Janzen, 1980). O elemento fundamental da coevolução é a reciprocidade, na qual uma mudança genética em uma espécie causa uma mudança genética na espécie em coevolução, que por sua vez, causa nova mudança genética na primeira espécie (McDonald, 2004).

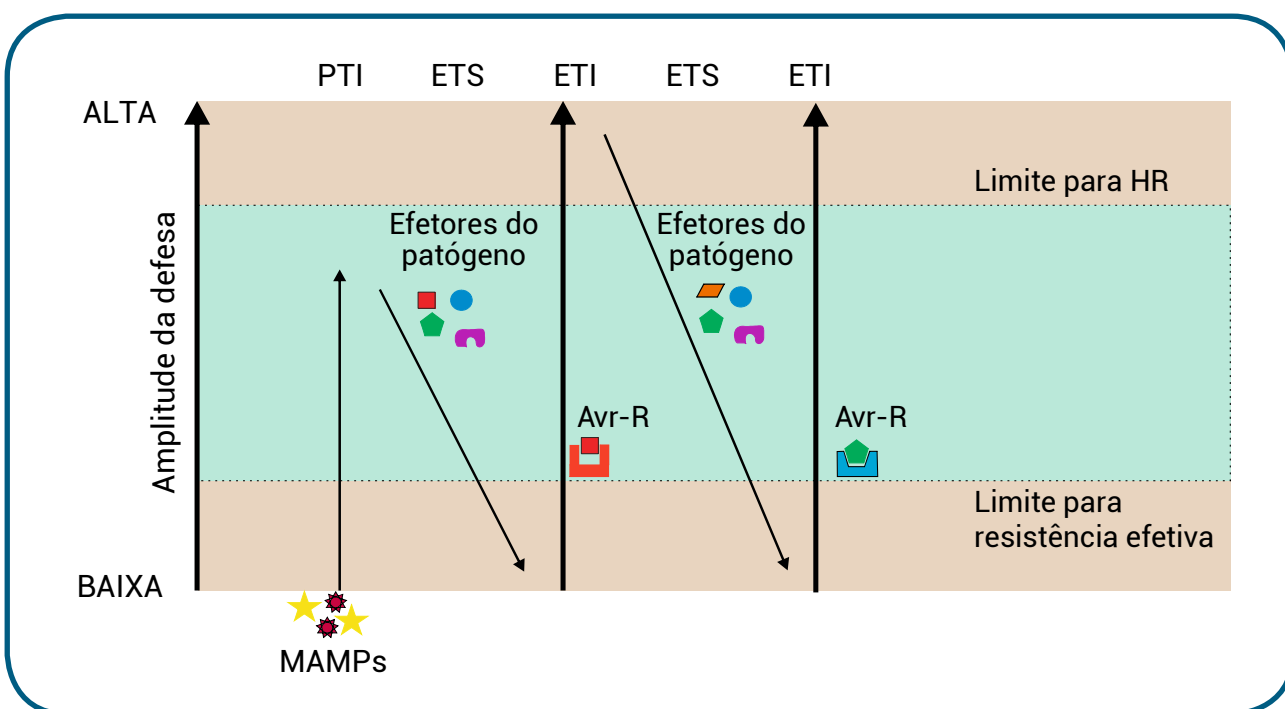
Assim, a evolução de uma planta ou de um patógeno é o resultado de mudanças nas frequências alélicas nas suas populações, e envolve inicialmente um processo que dá origem a variação genética em uma das populações, a exemplo da mutação, passando em seguida por um processo de mudança na frequência de alelos na população, por meio de seleção ou deriva genética (McDonald, 2004). Por exemplo, dentro da população de plantas doentes, ocorre um evento de mutação ou recombinação que produz um novo alelo de um gene que reconhece um elicitador do patógeno. Este evento causa mudança na condição de suscetibilidade para resistência na planta. Na presença de pressão constante da doença que reduz a aptidão das plantas suscetíveis, as plantas resistentes produzirão mais descendentes e, portanto, o alelo da resistência aumentará em frequência. À medida que a resistência na população de plantas aumenta devido ao aumento na frequência de indivíduos resistentes, a capacidade do patógeno de se reproduzir é reduzida e o nível geral da doença também diminui. Nesse ponto, há uma força seletiva no patógeno que favorece a seleção para virulência (capacidade de infectar a planta até então resistente) sobre a avirulência (incapacidade de infectar a planta resistente); o que favorece o alelo de virulência sobre a população de plantas resistentes. Uma vez que a mutação para a virulência ocorre, a frequência do alelo da virulência aumenta, levando a um aumento na quantidade de doença na população de plantas anteriormente resistente (McDonald, 2004).

Assim, a adaptação do patógeno ao seu hospedeiro está intimamente ligada à evolução de seus fatores de virulência – os efetores (proteínas, RNAs e metabólitos associados à virulência). Duas grandes pressões impostas pelo hospedeiro impulsionam a evolução efetiva de alelos de virulência no patógeno: os efetores evoluem para se adaptar aos alvos do hospedeiro ou para evitar a detecção por receptores da planta (Upson, et al., 2018). Portanto, para uma infecção bem-sucedida requer que o patógeno module os processos da planta, por exemplo, suprimindo as respostas de defesa e facilitando a liberação de nutrientes. Nesse sentido, a manutenção de repertórios complexos de efetores e possivelmente redundantes pode ser benéfica para a população do patógeno, uma vez que os efetores restringem ou determinam a gama de hospedeiros e genótipos infectados e sua perda ou modificação pode permitir que o patógeno infecte novos genótipos e até amplie a gama de hospedeiros. Isso é bem ilustrado pelo estudo sobre o surgimento da brusone do trigo no Brasil. Os dados sugerem que o cultivo de trigo carregando recessividade dos genes *Rwt3* e *Rwt4*, permitiu que isolados de *Magnaporthe oryzae* que infectam *Lolium* spp infectassem o trigo, o que foi seguido pela perda do efector PWT3, que resultou na atual conjuntura da doença (Inoue et al., 2017).

Nesta linha, a evolução dos efetores no patógeno é necessária para aumentar virulência ou escapar da detecção pela cognata proteína R, e por outro lado, a planta também evolui seus genes *R* para detectar os novos efetores (Ravensdale et al., 2011). Estudos de coevolução planta-patógeno implicaram na interação gene-por-gene, como uma interface primária na qual os patógenos evoluem para evitar a detecção e as plantas evoluem para melhorar a detecção. As plantas codificam centenas de genes *R* com especificidades dife-

rentes, e os patógenos codificam dezenas a centenas de efetores (Karasov et al., 2014).

Para ilustrar a resposta de defesa quando da interação da planta com um potencial patógeno, Jones & Dangl (2006) propuseram um modelo de resposta imune da planta, conhecido como Zig-Zag (**Fig. 3**). Neste modelo, a resposta imune da planta é composta por duas camadas de defesa que fornecem proteção contra o agente desafiador, incluindo as defesas desencadeada por MAMP e as desencadeadas por efetor. A primeira camada de defesa ocorre quando os receptores de reconhecimento de padrões localizados na membrana (PRR) percebem a presença de MAMPs na superfície celular desencadeando a PTI que se traduz como fechamento estomático, produção de EROs, ativação de MAPK, entre outros. Neste modelo, a ETI desencadeada pela proteína R, comparada a PTI, é mais intensa nas respostas de defesa ativando a HR, um tipo de morte celular programada. Embora críticas tenham sido feitas ao modelo por ser simplista demais, estar limitado a interação biotróficas, desconsiderar que em algumas interação a PTI também causa HR, e não descrever as interações planta-patógeno de uma maneira útil para quantificação ou previsão (Pritchard & Birch, 2014; Kanyuka & Rudd, 2019), ainda assim é um modelo expositivo amplamente utilizado e têm grande valor em conceituar e comunicar didaticamente aspectos das interações hospedeiro-patógeno.



**Figura 3.** Modelo de respostas de defesa da planta em zigue-zague, mostrando a amplitude da resposta de defesa provocada por vários estágios da infecção. MAMPs: padrões moleculares associados a moléculas/microrganismos; PTI: resposta imune desencadeada por reconhecimento de padrão; ETS: suscetibilidade desencadeada por efetor; ETI: resposta imune desencadeada por reconhecimento de efetor; Avr-R, interação do efetor reconhecido (avirulência ou gene Avr) e o proteína de resistência do hospedeiro (gene R); HR, resposta de hipersensibilidade. Adaptado de Jones & Dangl (2006).

No modelo, fica evidente que a ETI (resistência completa) conferida pelos genes *R* leva a uma corrida armamentista entre planta e patógeno. Estes ciclos interativos de adaptações do efetor 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).

A corrida armamentista existente entre plantas e seus agentes patogênicos cria uma interação estreita, com a planta ativando respostas de defesa que impedem o crescimento do patógeno, enquanto estes empregam armas moleculares especializadas que agem dentro da planta para fornecer uma base para infecção. Essa dinâmica cria fortes pressões seletivas e levou a exemplos impressionantes de rápidas mudanças evolutivas adaptativas. As plantas estão continuamente moldando a evolução dos patógenos, promovendo mudanças recorrentes e sustentadas nos genomas microbianos (Raffaele & Kamoun, 2012; Croll & McDonald, 2012; Dong et al., 2015). No balanço coevolucionário entre patógenos e plantas, os patógenos também moldam a evolução de seus hospedeiros, deixando marcas nos genomas vegetais. Para superar alelos de genes *R* individuais, os patógenos podem modificar seus efetores reconhecidos para uma forma que não é detectada; a seleção natural então favorece essas novas raças virulentas. Portanto, as plantas devem desenvolver novas variantes de proteína *R* para detectar o efetor modificado ou outro componente patogênico. Assim, a expansão e neofuncionalização da NLR é um mecanismo que permite que as plantas acompanhem os patógenos. O repertório de efetores altamente adaptáveis dos patógenos moldam o sistema de detecção da planta, levando na maioria dos casos a um repertório de receptores extremamente diversificado. A pista mais informativa sobre a evolução dessa diversidade é a organização genômica dos genes *R*, especialmente os que pertencem a classe de proteínas NLR, que variam consideravelmente em número e estrutura, e estão presentes em todas as plantas terrestres (Xue et al., 2012; Jones et al., 2016). Os genes NLR geralmente estão localizados em aglomerados (*clusters*) de genes e em regiões genômicas que sofrem taxas excepcionais de mutagenese, fatores que atuam como um reservatório de diversidade genética (Zhou et al., 2004; Meyers et al., 2005; Jupe et al., 2012; Karasov et al., 2014; Upson, et al., 2018). O mesmo ocorre com os genes que codificam efetores no patógeno. Como resultado, a diversidade *de novo* é gerada rapidamente, fornecendo material para permitir uma rápida adaptação por parte de cada espécie envolvida na interação.

Na coevolução da planta e seus patógenos podemos considerar dois ambientes: ecossistema natural (onde a natureza é a responsável pela criação do ambiente e pela evolução da comunidade – condição descrita anteriormente) e agroecossistemas (ecossistema com presença de pelo menos uma população agrícola: onde há a interferência humana).

Nos agroecossistemas, a reciprocidade que é uma marca registrada da coevolução não existe verdadeiramente. Na agricultura, os seres humanos controlam a parte da planta na interação, determinando quais genótipos são cultivados no campo. O patógeno evolui em resposta aos alelos de resistência presentes no genótipo cultivado, mas a população de plantas não tem a chance de responder naturalmente às mudanças na frequência dos alelos de virulência que ocorrem na população de patógenos. Quando um gene de resistência é superado, os melhoristas o substituem por outro gene de resistência, criando o ciclo de expansão e retração (também conhecido por ***Boom and Bust***<sup>6</sup>). Assim, podemos dizer que a coevolução realmente não ocorre nos sistemas agrícolas. Pelo contrário, a



evolução do patógeno é dirigida pelos seres humanos (McDonald, 2004).

Na agricultura é amplamente reconhecido que, com raras exceções, a resistência conferida pelo modelo gene-a-gene é efetivo por apenas alguns anos. O reconhecimento das razões pelas quais a coevolução se desestabilizou na agricultura pode apontar maneiras de tornar o controle das doenças das culturas mais durável. Várias abordagens de manejo de culturas que visam reduzir a velocidade com que os patógenos se adaptam têm sido propostas; eles incluem aumentar a diversidade genética das culturas, o que pode retardar o desenvolvimento de epidemias e reduzir a gravidade da doença, incorporando resistência quantitativa, que geralmente é mais durável que a resistência gene-a-gene porque os patógenos geralmente se adaptam mais lentamente, e usando genes de resistência para os quais a virulência do parasita correspondente tem um alto custo. Embora as tentativas de aplicar idéias coevolucionárias aos sistemas agrícolas devam sempre considerar que o objetivo principal da agricultura é produzir alimentos e que o controle de doenças é apenas um meio para atingir esse objetivo, reduzir a velocidade com que os patógenos se adaptam às culturas pode contribuir significativamente para manter a produção de alimentos (Brown & Tellier, 2011).

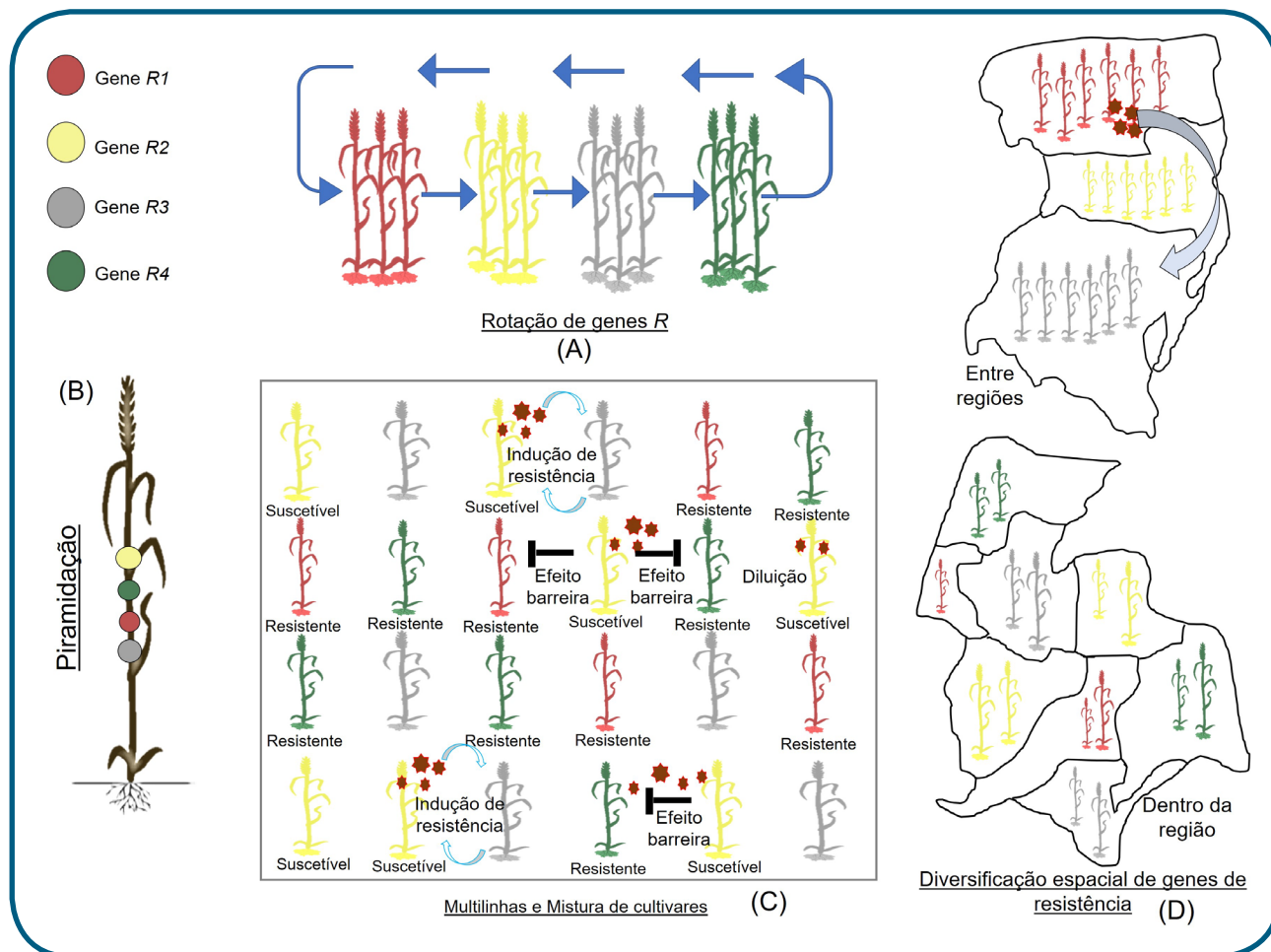
## 5. Estratégias para longevidade de genes *R*

A agricultura, ao longo da história da humanidade, foi tornando-se mais intensa para atender às crescentes necessidades humanas e de animais, porém com número limitado de espécies domesticadas. Assim, a área, a densidade e a uniformidade genética das populações de culturas aumentaram, e atualmente grandes extensões são ocupadas por monoculturas geneticamente idênticas. Patógenos sempre foram agentes limitantes para altas produtividades e para reduzir seus danos foram desenvolvidas cultivares das espécies cultivadas carregando genes de resistência, normalmente, genes *R* tipo NLRs. Porém, a forma de cultivo (monoculturas) e a pressão de seleção na população do patógeno, conforme descrito anteriormente, favorecem a seleção de variantes genéticas do patógeno que podem superar os mecanismos de defesa do genótipo hospedeiro. Quando surge um variante genético do patógeno que pode superar a resistência, o mesmo pode se reproduzir rapidamente e causar enormes danos nas culturas. Não é surpresa recebermos a informação que determinada cultivar teve sua resistência suplantada, poucos anos após seu lançamento. Isso acontece, devido ao fato de realizarmos o cultivo de uma cultivar, contendo um gene *R* em larga escala, acabamos por exercer uma pressão de seleção na população do patógeno de modo a selecionar genótipos com genes de virulência correspondentes ao gene *R*. Assim, para não fundamentarmos ou alimentarmos a possibilidade de se cair em um círculo vicioso de desenvolvimento de

---

**6 - Ciclos Boom and bust:** o conceito refere-se as flutuações, em curto prazo, no uso de determinado gene *R* em genótipos cultivados. Por exemplo, melhoristas lançam nova cultivar resistente (gene *R*) a determinada doença, no entanto, alguns anos após a sua introdução na produção comercial, o gene pode parar de proteger a cultura, e ocorre epidemia grave da doença. O termo boom refere-se ao período (anos) de crescimento do uso da cultivar ou gene *R* porque oferece controle eficaz da doença (quando a população do patógeno consiste inteiramente em raça(s) que expressam o gene *Avr* funcional que é reconhecido pela proteína *R*). O termo bust refere-se ao período de retração do uso da cultivar ou gene *R* devido a falha no controle da doença o que ocorreu pelo surgimento de mutante no *avr* evadindo da detecção pela proteína *R*. A introgressão de outro alelo do gene *R* normalmente inicia outro ciclo de crescimento e retração do uso do gene.

novas cultivares com novas fontes de resistência e a suplantação, da mesma, pelo rápido surgimento de novas raças na população do patógeno, torna-se fundamental a adoção de estratégias que evitem ou retardam o desenvolvimento desta situação (Camargo, 2018; Thurow et al., 2018). Com o intuito de prolongar o tempo que um gene de resistência (gene *R*) permanece **efetivo**<sup>7</sup>, são propostas algumas estratégias para utilização (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Estratégias para longevidade de genes *R*. Rotação de genes (A), cultivo de cultivares com diferentes genes de resistência no mesmo local. Piramidação (B), vários genes de resistência na mesma planta. Multilinhas e mistura de cultivares (C), se resume na utilização no mesmo local, de plantas que diferem em relação aos genes de resistência. A diversificação espacial de genes de *R* (D), visa a desacelerar a dispersão de elevada densidade populacional do patógeno virulento, tanto em escala de lavoura, fazenda, região ou estado.

Dentre estas estratégias, destacam-se o uso da 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). Todas as estratégias supramencionadas, serão abordadas separadamente e de maneira mais detalhada a seguir.

<sup>7</sup> - **Efetivo:** não se refere a capacidade da proteína R detectar a cognata proteína Avr, mas sim a utilização efetiva do gene na(s) cultivar(es) em uso.

## 5.1. Rotação de genes

A fundamentação da rotação de genes *R* é o equivalente ao da rotação de culturas. As cultivares que serão utilizadas na rotação possuem genes de resistência a diferentes raças do patógeno alvo, dessa forma, reduzindo a pressão de seleção sobre o mesmo (Mundt, 2014; Thurow et al., 2018). A limitação dessa estratégia, fica por parte dos agricultores que possuem relutância em trocar as cultivares preferenciais. Outro limitante pode ser o fato do gene *R* que será utilizado em subsequência pode não ser tão efetivo em reduzir a doença, devido a “**seleção por carona**<sup>8</sup>” de genes de virulência pelo gene *R* em uso.

## 5.2. Diversificação espacial de genes de resistência

No sistema agrícola atual, de maneira geral, as culturas presentes são quase que totalmente homogêneas em relação a genética, tornando as condições ideais para que o patógeno infecte, se multiplique e se dissemine rapidamente em grandes extensões de áreas. Neste modelo, ao surgir um indivíduo na população do patógeno que consegue suplantar a resistência do gene *R* em uso, poderá se disseminar rapidamente para todas as áreas cultivadas com a cultura com elevada quantidade de inóculo efetivo em causar doença, gerando danos significativos na produtividade. Assim, a estratégia de diversificação espacial de genes de *R*, visa desacelerar a dispersão de elevada densidade populacional do patógeno virulento, tanto em escala de lavoura, região ou estado. Esta estratégia visa a diversidade entre campos de cultivo e não dentro de campos, como é o caso das misturas, ou seja, cultivares contendo diferentes genes *R* são implantadas de maneira planejada, seguindo um padrão de distribuição geográfica, buscando realizar a descontinuidade da homogeneidade de distribuição do gene *R* (Camargo, 2018; Thurow et al., 2018).

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 por exemplo, os agentes causais das ferrugens, do oídio em cevada e da requeima em batata (Burdon et al., 2014).

---

**8 - Seleção por carona:** O gene *Avr* reconhecido pelo novo gene *R* já foi previamente selecionado na população e aumentou sua frequência por estar ligado (segregando juntamente, ou seja, a seleção de um gene em um locus pode levar ao aumento da frequência de genes em loci ligados) com o gene *Avr* mutado que suplantou a resistência do gene *R* em uso.

### 5.3. Multilinha

Multilinha, pode ser definido, como o cultivo de uma mistura de linhagens, que possuem a mesma aparência e similaridade genética (isogênicas), mas que diferem entre si por possuírem cada qual um gene *R* diferente, que é transferido por retrocruzamento (Matiello et al., 1997). Dessa forma, nas multilinhas, as plantas resistentes ao patógeno, além de não serem infectadas, atuam como uma barreira, interferindo na dispersão do inóculo oriundo da infecção na planta suscetível. Assim, ocorre uma diminuição da multiplicação do patógeno e conseqüentemente no progresso da doença na lavoura. Essa técnica tem sido adotada, principalmente no controle de doenças em plantas autógamas como aveia, trigo e arroz (Ashkani et al., 2015; Thurow et al., 2018). Em arroz, o desenvolvimento de cultivares multilinhas, visa principalmente a resistência à brusone (*Magnaporthe oryzae*) (Ashkani et al., 2015).

Entretanto, vale ressaltar, que a heterogeneidade de genes entre as linhagens que compõem a multilinha, deve ser significativa para aumentar a sua durabilidade no campo, e ao mesmo tempo evitar o surgimento de uma super-raça de um determinado patógeno. No entanto, obter plantas nestas condições torna-se muito custoso e demorado, sendo considerado até desvantajoso em comparação ao método da pirâmide gênica (Camargo, 2018).

### 5.4. Mistura de cultivares

Essa técnica segue os princípios das multilinhas que é aumentar a diversidade genética - referente a resistência a doenças - da cultura, garantindo estabilidade de produção sem grande alteração no sistema de cultivo e em algumas situações com redução no uso de fungicidas (Castro, 2001). Porém, diferentemente das multilinhas onde as linhagens são isogênicas, a mistura, consiste na combinação mecânica de cultivares que diferem em relação aos genes de resistência, mas que possuem os atributos agrônômicos similares, possibilitando seu plantio em conjunto. A mistura de cultivares, semelhante a multilinhas, também atua no controle das doenças, através da redução na densidade de plantas suscetíveis, efeito barreira à disseminação do inóculo, devido a presença das plantas resistentes e por último, a indução de resistência - ativação dos mecanismos de defesa da planta, que ocorre quando a planta é exposta a uma raça avirulenta do patógeno (Mundt, 2002).

A aplicação desse método, demonstrou ser eficaz no manejo de inúmeras doenças como brusone do arroz (Raboin et al., 2012), oídio da cevada (Finckh et al., 1999), antracnose do feijoeiro (Ntahimpera et al., 1996), mancha amarela, ferrugem amarela, ferrugem da folha e oídio do trigo (Cox et al., 2004; Brunetto et al., 2017; Vidal et al., 2020). Brunetto et al. (2017) ressaltam a importância de identificar a proporção adequada de cada cultivar, na mistura e que a eficácia do método é variável de acordo com a doença predominante naquela estação e as condições climáticas do ano. Outro estudo também verificou que variações de duas até oito cultivares na mistura não teve impacto na severidade média da doença e no rendimento das misturas, mas reduziu a variabilidade da severidade da doença e do rendimento na mistura em

relação a plantios puros, sugerindo que pode ser possível aumentar a diversidade dentro do campo combinando mais cultivares contrastantes em misturas (Vidal et al., 2020).

## 5.5. Pirâmide de genes *R*

O uso cultivares resistentes são ferramentas úteis na redução das perdas econômicas provocadas pelas doenças, no entanto, cultivares com um único gene tendem a ter sua resistência rapidamente suplantada. A efetividade da resistência específica, muitas vezes é de curta duração, devido a variabilidade do patógeno e a própria pressão de seleção imposta pelo genótipo portador do gene *R* (Pilet-Nayel et al., 2017). Visando contornar essa problemática, que a estratégia da piramidação de genes *R* torna-se atraente. O método pirâmide consiste na incorporação de múltiplos genes *R* que conferem resistência a um patógeno, em um único genótipo, sendo expressos simultaneamente. Assim, cultivares contendo essa tecnologia, teoricamente, terão sua resistência durável por mais tempo no campo já que há baixa probabilidade do aparecimento de uma “super raça” do patógeno, contendo todos os genes de virulência necessários, para suplantam esta combinação de genes (Pilet-Nayel et al., 2017; Camargo, 2018).

O princípio que fundamenta a teoria da durabilidade da resistência conferida por genes piramidados é baseada na frequência de possíveis mutações no patógeno e sua taxa de multiplicação. A probabilidade de mutação, para a maioria dos organismos é de  $10^{-10}$  por base, o que daria aproximadamente  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  por gene (Drake et al., 1998). No exemplo hipotético utilizado por Stam & McDonald (2018), uma lesão esporulante de oídio produz  $\sim 10^4$  conídios por dia. Em um campo com plantas doentes apresentado severidade de 10%, isso resulta em  $\sim 10^5$  lesões  $m^2$ , portanto,  $\sim 10^9$  esporos  $m^2$  ou  $\sim 10^{13}$  esporos produzidos por hectare por dia. Se a taxa de mutação de avirulência (detecção do efector patógeno pela proteína *R* correspondente) para virulência (evasão de detecção pelo gene *R* correspondente) for de  $\sim 10^{-6}$ , haverá aproximadamente  $10^7$  esporos mutantes virulentos, que podem superar um gene *R*, produzidos em cada hectare durante cada dia, em condições ideais. Se considerarmos os dados do exemplo hipotético acima mencionado, aos utilizarmos dois genes *R* na mesma planta, a probabilidade de duas mutações ocorrerem no mesmo isolado do patógeno é  $10^{-6} + 10^{-6} = 10^{-12}$ , portanto 10 mutantes duplos por hectare por dia. Ao utilizarmos três genes *R*, o modelo prevê que apenas um triplo mutante seria produzido a cada dia em 10.000 hectares, e se for quatro genes *R* seria praticamente invencível para a evolução do patógeno, porque a evasão da detecção exigiria quatro eventos de mutação simultâneos na mesma célula (Stam & McDonald, 2018).

Alguns pesquisadores vem o uso dessa estratégia como uma ferramenta promissora no controle de ferrugens em culturas como trigo, milho e soja (Yamanaka et al., 2015; Pilet-Nayel et al., 2017). Por exemplo, na soja, até o momento seis genes dominantes (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5* e *Rpp6*) já foram identificados conferindo resistência contra o fungo *Phakopsora pachyrhizi* (Li et al., 2012). Esses genes conferem resistência a alguns isolados de *P. pachyrhizi*, mas não são efetivos contra todos os variantes na populações do patógeno (Pham et al., 2009). A piramidação de genes tem



demonstrado resultados promissores, em que os genótipos com dois (*Rpp4* + *Rpp5*) ou três (*Rpp2* + *Rpp3* + *Rpp4*) - (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) genes de resistência, apresentam significativamente maior resistência do que seus ancestrais (genes únicos) (Yamanaka et al., 2015).

Entretanto, apesar do apelo teórico para piramidação de genes *R*, tanto as pirâmides do gene *R* quanto os patógenos associados precisariam atender simultaneamente a vários critérios para obter os benefícios postulados. Por exemplo, o gene *R* deve ser altamente efetivo (independentemente da idade do tecido da planta); que a população do patógeno não tenha sido exposta previamente ao gene *R* e o mesmo não ser suprimido por efetores, não alvos do gene *R*, já presentes no patógeno; que o patógeno raramente recombine o genoma (ausência ou reprodução sexual rara); o patógeno apresente baixo fluxo gênico entre as populações; que a população do patógeno se mantenha baixa, pelo uso de práticas culturais – rotação de culturas e/ou uso de resistência quantitativa (Stam & McDonald, 2018). Ademais, a obtenção de cultivares contendo genes piramidados demanda anos de pesquisa e investimentos significativos, em muitas situações, aprovações por órgãos governamentais. Portanto, a decisão de uso de genes *R* piramidados requer um estudo bastante detalhado do potencial evolucionário do patógeno, para poder estimar a probabilidade da durabilidade efetiva da pirâmide, e a melhor seleção dos genes a serem piramidados.

Considerando que é improvável obter controle durável baseado apenas na dependência exclusiva de uma pirâmide de genes *R*, especialmente para patógenos com grandes populações, sistemas reprodutivos mistos e fluxo genético substancial, a associação de diferentes métodos pode fornecer um manejo sustentável. Assim, a implantação de misturas dos principais genes *R* em um campo e / ou a piramidação de genes *R* associados ao elevado nível de resistência quantitativa, combinados com outras práticas de manejo, como rotações de culturas e aplicações criteriosas de fungicidas, que diminuem o tamanho efetivo da população de patógenos podem contribuir substancialmente na redução da intensidade das doenças e, conseqüentemente, aumentar a durabilidade das tecnologias empregadas (Stam & McDonald, 2018; Lasserre-Zuber et al., 2018).

## 6. Resistência genética de plantas e o controle químico

O uso de cultivares resistentes a doenças representa o método não químico mais eficaz de reduzir a intensidade da doença e a necessidade de aplicação de fungicidas (Loyce et al., 2008). Ao analisarmos a evolução das cultivares, independentemente da espécie vegetal, o melhoramento usando a seleção fenotípica convencional proporcionou boa resistência a muitas doenças, e as técnicas de melhoramento assistido por marcadores melhoraram a seleção, possibilitando que genes, particularmente os de menor efeito (resistência quantitativa), sejam conservados nos germoplasmas o que tem o potencial de reduzir os ciclos de *boom* e *bust* quando os genes *R* são suplantados pela evolução da virulência do patógeno (Jørgensen et al., 2017). Entretanto, 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 útil devido à redução no número nas aplicações requeridas de fungicidas (Naerstad et al., 2007).

Não obstante, mesmo nas cultivares mais resistentes, há situações, que há respostas positivas à aplicação de fungicidas, pois a resistência em uma única cultivar raramente cobre todas as doenças, ou a resistência é apenas parcial ou devido alguns fungicidas poderem aumentar o rendimento por efeitos fisiológicos diretos (Jørgensen et al., 2017). Portanto, o efeito da resistência do hospedeiro, na maioria das vezes é reduzir, em vez de eliminar, a necessidade de fungicidas. Algumas cultivares são altamente resistentes às doenças e podem não requerer tratamento com fungicidas se a pressão da doença for baixa. Entretanto, sob alta pressão da doença, cultivares resistentes podem exigir apenas entrada moderada de fungicida. Na maioria das safras, as cultivares suscetíveis requerem uma alta contribuição do fungicida para atingir seu potencial produtivo. Por exemplo, do Reino Unido, França e Dinamarca, o uso de cultivares resistentes reduziram em até 50% a necessidade de fungicida no trigo (Jørgensen et al., 2017, Loyce et al., 2008). Outros exemplos de uso da resistência do hospedeiro para limitar os danos ou reduzir a dependência de fungicidas incluem a mudança de variedades suscetíveis para moderadamente resistentes para o controle da queima das folhas (*Exserohilum turcicum*) do milho e a diminuição do número de aplicações de fungicidas em variedades de trigo com resistência à mancha amarela (*Pyrenophora tritici-repentis*) (Jørgensen & Olsen, 2007; Debela et al., 2017).

Outros benefícios, como incremento no controle ou no rendimento, podem ser obtidos pela associação dos métodos. Por exemplo, o controle químico de *Pseudoperonospora cubensis* em pepineiro (*Cucumis sativus*) foi influenciada pelo nível de resistência dos genótipos (Call et al., 2013). O genótipo classificado como resistente obteve índices superiores de controle e de produtividade, mesmo associado a fungicidas menos eficazes, enquanto que no genótipo suscetível, independente da eficácia dos fungicidas utilizadas, os índices de controle e de produtividade foram insatisfatórios. Assim, os autores não descartam o uso combinado dos dois métodos de controle, no entanto afirmam que quanto maior o grau de resistência da planta, menor a necessidade de utilização de um programa de manejo químico, composto por misturas de moléculas de maior custo financeiro (Call et al., 2013). Do mesmo modo, estudo em batata demonstrou que dependendo do nível de resistência da cultivar ao patógeno *Phytophthora infestans*, a demanda de aplicação de fungicidas pode ser reduzida em até 50%, para se atingir índices satisfatórios do controle da doença (Naerstad et al., 2007). Para giberela do trigo (*Fusarium graminearum* complexo de espécies), uma metanálise comparando 40 ensaios indicou que a eficiência do controle químico sobre a severidade da doença e o acúmulo de deoxinivalenol (DON) foi influenciado pelo nível de resistência do genótipo, e que aplicação de fungicida no período da antese, associado com cultivares com resistência moderada é a prática mais eficaz e estável para reduzir os problemas com a giberela (Willyerd et al., 2012).

Entretanto, no controle de doenças de plantas os métodos químicos e genéticos são vistos, algumas vezes, como dicotômicos: utilizar controle químico independentemente do nível de resistência da cultivar ou utilizar cultivar resistente para não empregar agroquímicos. Em situações ou nichos de mercado específicos essa dicotomia

pode até ser válida, no entanto, na grande parte das áreas cultivadas o uso de resistência genética associado ao controle químico tem sido estimulado visando proteger as duas tecnologias, bem como ganhos na eficiência de controle de ambas. Teoricamente, para resistência genética, o uso de fungicidas auxilia na redução da população do patógeno, indistintamente da suas raças, o que pode favorecer a maior longevidade de uso do gene *R* por reduzir a população do patógeno e conseqüentemente o número de indivíduos que consegue suplantam o gene *R*. Para o controle químico, a resistência genética reduz a taxa de progresso da doença, conseqüentemente o fungicida será aplicado em um ambiente de menor pressão de doença; ou dependendo da efetividade da resistência genética, o número de pulverizações com fungicida pode ser reduzido, reposicionando-as para os momentos mais críticos da cultura e, assim reduzindo as chances de seleção de indivíduos resistentes ou insensíveis ao ingrediente ativo do fungicida. Ademais, considerando que a vida efetiva (durabilidade) de um modo de ação fungicida é determinada pela taxa de seleção para de indivíduos insensíveis e pelo período de tempo em que a seleção ocorre devido à exposição da população de patógenos ao modo de ação (Van Den Bosch et al., 2014), a diferença entre indivíduos sensíveis e insensíveis a fungicidas pode ser reduzida diminuindo a taxa de aumento de ambos. A resistência parcial do hospedeiro, que é eficaz independentemente da sensibilidade do fungo ao fungicida, também pode retardar a seleção no patógeno para insensibilidade a fungicidas (Jørgensen et al., 2017).

## 7. Considerações finais

Embora muitas lacunas ainda estejam incompletas, considerável progresso tem sido realizado no conhecimento sobre os mecanismos de detecção de agentes patogênicos pelas plantas e os mecanismos de defesa envolvidos. Esse conhecimento dos mecanismos de detecção presente em plantas já está sendo utilizado para obtenção de genótipos de plantas cultivadas com resistência a patógenos. Entretanto é importante enfatizar que a efetiva durabilidade da resistência não está somente na forma que a planta detecta o patógeno, mas dependerá do potencial evolucionário do patógeno, e não menos importante de forma que será utilizada a resistência. O emprego de cultivares resistentes deve ser entendido como uma ferramenta a ser aliada a outras medidas de manejo que envolvem os princípios mais básicos, método cultural, até o emprego do controle químico. Nesse sentido, o manejo de doenças da uma cultura deve ser planejado de forma que grande parte, senão todas, das medidas de manejo possíveis de serem empregadas sejam contempladas, fato que reduzirá a pressão sobre as cultivares resistentes, e por conseguinte, aumentará as chances de maior durabilidade da resistência genética.

## 8. Referências bibliográficas

- ABDALLAH, N.A.; SHAH, D.; ABBAS, D.; MADKOUR, M. 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.
- AN, C.; MOU, 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.
- 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.
- BAR-ON, Y.M.; PHILLIPS, R.; MILO, R. The biomass distribution on Earth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, p. 6506-6511, 2018.
- 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.
- BENNETT, B.C. Plants as Food. In Economic Botany, Brad Bennett, Ed.; In Encyclopedia of Life 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.
- BOUROT, 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.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, p. 233-240, 2013.
- BROWN, J.K.M.; TELLIER, A. Plant-Parasite Coevolution: Bridging the Gap between Genetics and Ecology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 345-367, 2011.
- BRUNETTO, A.E.; MULLER, C.; PAZDIORA, P.C.; DALLAGNOL, L.J. Mistura de cultivares de dois componentes no manejo de múltiplas doenças do trigo. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 12, n. 3, p. 269-276, 2017.
- BURDON, J.J.; BARRETT, L.G.; REBETZKE, G.; THRALL, P.H. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. **Evolutionary Applications**, v. 7, n. 6, p. 609-624, 2014.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating Arabidopsis leaves:  $\beta$ -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier. **Plant Physiology**, v. 160, p. 1120-1129, 2012.

- CALL, A. D.; WEHNER, T. C.; HOLMES, G. J.; OJIAMBO, P. S. Effects of host plant resistance and fungicides on severity of cucumber downy mildew. **Hortscience**, v. 48, n. 1, p. 53-59, 2013.
- CAMARGO, L.E.A. **Controle genético**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (org.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5. ed. Piracicaba: Ceres, 2018. p. 325-341.
- CAÑO-DELGADO, A.; PENFIELD, S.; SMITH, C.; CATLEY, M.; BEVAN, M. Reduced cellulose synthesis invokes lignifications and defense response in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 34, p. 351-362, 2003.
- CAO, X. 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.
- CASTRO, A. Cultivar mixtures. The plant health instructor. St. Paul: American Phytopathological Society, 2001. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2001-1230-01>.
- 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.
- COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Review Immunology**, v. 16, p. 537-552, 2016.
- COX, C.M. et al. Cultivar mixtures for the simultaneous management of multiple diseases: tan spot and leaf rust of wheat. **Phytopathology**, v. 94, n. 9, p. 961-969, 2004.
- CROLL, D.; MCDONALD, B.A. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. **PLoS Pathogens**, v.8, p.8-10, 2012.
- DALLAGNOL, L.J.; ARAUJO FILHO, J.V. Uma visão geral da resistência de plantas a microrganismos. In: Leandro José Dallagnol. (org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas, RS: Editora UFPel, 2018, p. 13-64.
- DAY, B.; HENTU, J.L.; PORTER, K.J.; STAIGER, C.J. The pathogen actin connection: a platform for defense signaling in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 483-506, 2011.
- DEBELA, M.; DEJENE, M.; ABERA, W. Management of *Turicum* leaf blight [*Exserohilum turicum* (Pass.) Leonard & Suggs] of maize (*Zea Mays* L.) through integration of host resistance and fungicide at Bako, Western Ethiopia. **African Journal of Plant Science**, v. 11, p. 6-22, 2017.
- 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.
- 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.
- DONG, S.; RAFFAELE, S.; KAMOUN, S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 57-65, 2015.
- DONGYU, Q. **Plants, the ‘core basis for life on Earth’, under increasing threat, warns UN food agency**. 2019. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2019/12/1052591>. Acesso em 25/06/2020.
- DRAKE, J.W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; CROW, J.K. Rates of spontaneous mutation. **Genetics**, v. 148, p. 1667–1686, 1998.
- DU, J. et al. Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. **Nature Plants**, v. 1, p.15034, 2015.



- 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.
- FERNANDO, W.G. Plants: An international scientific open access journal to publish all facets of plants, their functions and interactions with the environment and other living organisms. **Plants**, v. 1, p. 1-5, 2012.
- 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.
- FINCKH, M.R.; GACEK, E.S.; CAEMBOR, H.J.; WOLFE, M.S. Host frequency and density effects on powdery mildew and yield in mixtures of barley cultivars. **Plant Pathology**, v. 48, n. 6, p. 807-816, 1999.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, p. 275-296, 1971.
- 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.
- GALLETTI, R.; DELORENZO, G.; FERRARI, S. Host-derived signals activate plant innate immunity. **Plant Signaling Behavior**, v. 4, p. 33-34, 2009.
- GIRALDO, M.C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Review Microbiology**, v. 11, p. 800-814, 2013.
- GONZÁLEZ-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.
- GURURANI, M.A. et al. Plant disease resistance genes: current status and future direction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p.51-65, 2012.
- HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, A.77, 2012.
- HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Responses to plant Pathogens. In: Buchanan, B.B.; Griseem, W.; Jones, R.L. (eds) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. John Wiley & Sons, Ltd, UK, 2015, p. 984-1050.
- HERNÁNDEZ-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.
- HOU, S.; LIU, Z.; SHEN, H.; WU, D. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, A.646, 2019.
- INOUE, Y. et al. Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. **Science**, v. 357, p. 80-83, 2017.
- IWAI, T. et al. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic Rice plants overproducing on oat cell-wall-bound thionin. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 15, p. 515-521, 2002.
- JANDA, M.; MATOUŠKOVÁ, J.; BURKETOVÁ, L.; VALENTOVÁ, O. Interconnection between actin cytoskeleton and plant defense signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 9, p. e976486, 2014.
- JANZEN, D.H. When is it coevolution? **Evolution**, v. 34. p.611-612, 1980.
- JEANDET, P. et al. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. **Molecules**, v. 19, p. 18033-18056, 2014.

- JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A.L. Composition of plant cuticular waxes In: RIEDERER, M.; MÜLLER, C. (org) **Biology of the Plant Cuticle**. United Kingdom, Blackwell Publishing Ltd, v. 23, p. 145-181, 2006.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.
- JONES, J. D.G.; VANCE, R.E.; DANGL, J.L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. **Science**, v. 354, p. aaf6395-aaf6395, 2016.
- JØRGENSEN, L.; OLSEN, L. Control of tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. **Crop Protection**, v. 26, p. 1606–1616, 2007.
- JØRGENSEN, L.N.; VAN DEN BOSCH, F.; OLIVER, R.P.; HEICK, T.M.; PAVELEY, N.D. Targeting Fungicide Inputs According to Need. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n.1, p. 181-203, 2017.
- JUPE, F. et al. Identification and localization of the NB-LRR gene family within the potato genome. **BMC Genomics**, v. 13, p. 75, 2012.
- KAMOUN, S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: Novel prospects for a classical problem. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 295-300, 2001.
- KANYUKA, K.; RUDD, J. J. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 50, p. 1–8, 2019.
- KARASOV, T.; HORTON, M.W.; BERGELSON, J. Genomic variability as a driver of plant–pathogen coevolution? **Current Opinion in Plant Biology**, v.18, p. 24-30, 2014.
- 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.
- 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.
- 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.
- LASSERRE-ZUBER, P. et al. Pyramiding quantitative resistance with major resistance gene in apple: from ephemeral to enduring effectiveness in controlling scab. *Plant Disease*, v. 102, p. 2220-2223, 2018.
- 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.
- LI, S.; SMITH, J.R.; RAY, J.D.; FREDERICK, R.D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 133-142, 2012.
- LI, X.; KAPOS, P.; ZHANG, Y. NLRs in plants. **Current opinion in Immunology**, v. 32, p. 114-121, 2015.
- 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.
- LOYCE, C. et al. Interaction between cultivar and crop management effects on winter wheat diseases, lodging, and yield. **Crop Protection**, v. 27, p. 1131–1142, 2008.
- MACHO, A.P.; 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.
- MATIELLO, R.R.; BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p.161-168, 1997.
- MEYERS, B.C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R.S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 129-134, 2005.
- McDONALD, B.A. Population Genetics of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-A-2004-0524-01, 2004.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. 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.
- MORRIS, J.L. et al. The timescale of early land plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 10, p. E2274–E228, 2018.
- 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.
- 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.
- 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.; BJOR, 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.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J.T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 139, 2013.
- 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.
- NOMAN, A.; AQEEL, M.; LOU, Y. PRRs and NB-LRRs: from signal perception to activation of plant innate immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. A. 1882, 2019.
- NTAHIMPERA, N.; DILLARD, H.R.; COBB, A.C.; SEEM, R.C. Anthracnose development in mixtures of resistant and susceptible dry bean cultivars. **Phytopathology**, v. 86, n. 6, p. 668-673, 1996.
- 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.
- 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.

- PAVAN, S.; JACOBSEN, E.; VISSER, R.G.; BAI, Y. 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  $\beta$ -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.
- PHAM, T.A.; MILES, M.R.; FREDERICK, R.D.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. Differential responses of resistant soybean entries to isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant Disease**, v. 93, p. 224-228, 2009.
- 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.
- PILET-NAYEL, M.L. et al. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1838, 2017.
- 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.
- PRITCHARD, L.; BIRCH, P.R.J. The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on? **Molecular Plant Pathology**, v.15, p. 865-870, 2014.
- POLAND, J.A.; BALINT-KURTI, P.J.; WISSER, R.J.; PRATT, R.C.; NELSON, R. J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 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.
- RABOIN, L.M. et al. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. **Plant Pathology**, v. 61, n. 6, p. 1103-1111, 2012.
- RAFFAELE, S.; KAMOUN, S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. **Nature Review in Microbiology**, v.10, p. 417-430, 2012.
- RAVENSDALE, M.; NEMRI, A.; THRALL, P.H.; ELLIS, J.G.; DODDS, P.N. Co- evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 93-102, 2011.
- REINA-PINTO, J.J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 540-549, 2009.
- SAIJO, Y.; LOO, E.P.; YASUDA, S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. **The Plant Journal**, v. 93, p. 592-613, 2018.
- 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.
- SARRIS, P.F. et al. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. **Cell**, v. 161, p. 1089-1100, 2015.
- SAVARY, S. et al. A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, 430-439, 2019.
- SERRANO, M.; COLUCCIA, F.; TORRES, M.; L'HARIDON, F.; MÉTRAUX, J.P. The cuticle and plant defense to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 274, 2014.



- STAEEL, S. et al. Plant innate immunity - sunny side up?. **Trends in Plant Science**, v. 20, p. 3-11, 2015.
- STAM, R.; MCDONALD, B.A. When resistance gene pyramids are not durable-the role of pathogen diversity. **Molecular Plant Pathology**, v.19, p.521-524, 2018.
- 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.
- 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.
- THUROW, L.B.; CASTRO, C.M.; PEREIRA, A.S. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. In: DALLAGNOL, L.J. (org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Ed. UF-Pel, Pelotas, 2018. p. 65-93.
- 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, A. 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.
- UPSON, J.L.; ZESS, E.K.; BIAŁAS, A.; WU, C.H.; KAMOUN, S. The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant-microbe interactions across multiple timescales. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 108-116, 2018.
- VAN DEN BOSCH, F.; OLIVER, R.; VAN DEN BERG, F.; PAVELEY, N. Governing principles can guide fungicide resistance management tactics. **Annual Review Phytopathology**, v. 52, p. 175-95, 2014.
- VANETTEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "phytoanticipins". **Plant Cell**, v. 6, p. 1191-1192, 1994.
- VIDAL, T. et al. Cultivar mixture effects on disease and yield remain despite diversity in wheat height and earliness. **Plant Pathology**, v. 69, p. 1148-1160, 2020.
- 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.
- WILLYERD, K.T. et al. Efficacy and stability of integrating fungicide and cultivar resistance to manage Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat. **Plant Disease**, v. 96, p. 957-967, 2012.
- 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.
- XUE, M. et al. Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLoS Genetics**, v. 8, p. e1002869, 2012.



- YAMANAKA, N. et al. Multiple *Rpp*-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 283–290, 2015.
- 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.
- 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-TIRNBS-LRR genes. **Molecular and Genetics Genomics**, v. 271, p. 402-15, 2004.

Renata Oliveira Batista  
Eveline Teixeira Caixeta  
Dênia Pires de Almeida  
Leonardo Corrêa da Silva  
Alessandro Nicoli

## 1. Introdução

A resistência genética de plantas é uma das medidas de grande importância no manejo integrado de doenças, sendo hereditária na natureza e controlada por um ou mais genes que expressam esse controle genético. Em um programa de melhoramento, o primeiro trabalho a ser realizado é a identificação de genótipos resistentes, normalmente por meio de inoculações com diferentes isolados ou raças do patógeno em condições controladas, além das avaliações do banco de germoplasma em plantios conduzidos no campo. Em seguida, a natureza genética da resistência encontrada é investigada por meio de estudos de herança, envolvendo cruzamentos entre um genitor resistente e outro contrastante suscetível. A herança da característica pode orientar o método de melhoramento a ser usado. Como exemplo, se a herança observada for monogênica, para desenvolvimento de cultivar resistente, o método do retrocruzamento tem sido largamente utilizado, enquanto para herança poligênica um dos métodos mais utilizados é a seleção recorrente.

Visando dar suporte ao melhoramento genético, após o estudo da herança da resistência, marcadores moleculares associados aos genes caracterizados são localizados em mapas genéticos de ligação. A localização permite conhecimento da região física do cromossomo a qual os marcadores flanqueiam os genes de resistência, possibilitando a seleção de plantas assistida por marcadores moleculares. Dessa forma, o melhoramento genético realizado atualmente tem sido resultado da aplicação dos métodos tradicionais e moleculares. Essa estratégia apresenta as vantagens de ser aplicada nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas, reduzir o tempo para obter o genótipo desejado, permitir a piramidação de genes de resistência, além de eliminar testes de progênie no método do retrocruzamento quando o gene desejado é recessivo. O uso da seleção assistida por marcadores para obtenção de cultivares resistentes tem sido eficientemente aplicado nos patossistemas como trigo x *Puccinia* sp. e nematoides, arroz x *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Magnaporthe oryzae*, soja x *Soybean mosaic virus* e *Phakopsora pachyrhizi*, café x *Hemileia vastatrix*, entre outros.

Além desses trabalhos, para o desenvolvimento e lançamento de cultivares resistentes a doenças, o melhorista deve considerar a variabilidade do patógeno e adotar diferentes estratégias visando a maior durabilidade da resistência no campo. Dentre as estratégias adotadas estão a rotação de genes de resistência no tempo e espaço, piramidação dos genes, multilinhas e ou misturas de cultivares contendo diferentes genes de resistência ao patógeno.

## 2. Etapas do programa de melhoramento de plantas visando resistência a doenças

### 2.1. Seleção de genótipos resistentes

Os primeiros trabalhos na área de resistência genética estão relacionados com as identificações de genótipos com genes de resistência, podendo ocorrer principalmente em inoculações com o patógeno em condições controladas e por meio de observações em campo (Caixeta & Zambolim, 2014). Nesse sentido, a variabilidade genética presente nos diferentes bancos de germoplasma são avaliadas frente aos diferentes patógenos de cada cultura, podendo ser identificadas em genótipos crioulos ou selvagens, linhagens e variedades. Esses genótipos também podem ser caracterizados em plantios no campo e sendo observados como resistentes após ocorrência da doença. Nesse caso, é importante considerar a pressão de inóculo do patógeno e o efeito ambiental. Além disso, deve-se considerar a identificação e incorporação de gene de resistência que não pertence a mesma espécie vegetal (transgênicos), como no caso do transgene *CcRpp1* identificado no feijão-guandu e transferido para soja para o controle genético da ferrugem asiática (Kawashima et al., 2016).

A resistência de plantas pode ser do tipo qualitativa (distribuição fenotípica descontínua) ou quantitativa (distribuição fenotípica contínua). A resistência qualitativa é caracterizada pela fácil visualização da diferença entre plantas suscetíveis e resistentes, não sendo preciso quantificar os sintomas da doença. Na resistência quantitativa são observados diferentes níveis de resistência nas plantas, sendo necessária a quantificação da severidade da doença por meio de escalas diagramáticas e avaliando os diferentes componentes de resistência (Camargo, 2011; Azzimont et al., 2013; Corwin & Kliebenstein, 2017).

Os genótipos que possuem genes de resistência também podem ser identificados com auxílios de marcadores moleculares (Yang et al., 2017) e vários genes de resistência em diferentes patossistemas têm sido listados (Gururani et al., 2012). Apesar da existência dos genes de resistência, é preciso considerar a variabilidade do patógeno pois esse pode suplantar essa resistência ao mudar sua proteína de avirulência/efetores, sendo, portanto, de grande importância a identificação contínua de novos genes de resistência na espécie hospedeira (Jones & Dangl, 2006).

### 2.2. Herança da resistência

A herança genética da resistência de plantas à doença pode ser classificada como monogênica (único gene), oligogênica (poucos genes) e poligênica (vários genes), sendo normalmente a primeira e a segunda com distribuição fenotípica descontínua ou discreta (resposta qualitativa) e a terceira com distribuição fenotípica contínua (resposta quantitativa). O estudo de herança é aplicado nos programas de melhoramento

de plantas, visando a incorporação da resistência em variedades comerciais. A resistência monogênica é mais fácil de ser trabalhada devido ser um gene com efeito maior, no entanto, pode ser suplantada quando o patógeno apresentar alto risco de evolução e não se utilizar estratégias de manejo da resistência no campo. Na resistência poligênica a manipulação simultânea de vários genes de efeito menor torna o melhoramento mais complexo, mas a resistência tem maior durabilidade no campo. Portanto, anteriormente ao uso do método de melhoramento, deve ser estudada a herança no genótipo resistente a determinada doença (Mcdonald & Linde, 2002; Caixeta & Zambolim, 2014).

Para o estudo da herança, é realizado o cruzamento entre genitores contrastantes resistente e suscetível a doença, gerando população F<sub>1</sub>, a qual é autofecundada para obter a geração F<sub>2</sub> e também retrocruzada com os respectivos genitores. Plantas dessas gerações são inoculadas com o patógeno e realizada as avaliações da doença. Exemplos de herança com um ou dois genes de resistência podem ser interpretadas geneticamente por meio de cruzamento entre genitores contrastantes (Tabela 1). Algumas análises estatísticas como a do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e os testes de modelos genéticos utilizando a função de máxima verossimilhança são aplicadas em estudos de herança (Batista et al., 2017). Quando a segregação fenotípica da população F<sub>2</sub> apresentar, como exemplo, 03 plantas resistentes e 01 planta suscetível, a herança é monogênica dominante (Tabela 2).

**Tabela 1.** Exemplos de cruzamento entre genitores resistente e suscetível e herança da resistência controlada por um ou dois genes com sua respectiva proporção na geração F<sub>2</sub> (resistentes em negrito e itálico).

01 gene dominante AA					01 gene recessivo aa				
Parental Resistente		AA			Parental Resistente		aa		
Parental Suscetível		aa			Parental Suscetível		AA		
F1		Aa			F1		Aa		
F2 (3 R : 1 S)	<b>AA</b>	<b>Aa</b>	<b>Aa</b>	aa	F2 (1 R : 3 S)	AA	Aa	Aa	<b>aa</b>
02 genes dominantes AABB					02 genes recessivos aabb				
Parental Resistente		AABB			Parental Resistente		aabb		
Parental Suscetível		aabb			Parental Suscetível		AABB		
F1		AaBb			F1		AaBb		
F2 (15 R : 1 S)	<b>AABB</b>	<b>AABb</b>	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	F2 (7 R : 9 S)	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	<b>AABb</b>	<b>AAbb</b>	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>		AABb	<b>AAbb</b>	AaBb	<b>Aabb</b>
	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	<b>aaBB</b>	<b>aaBb</b>		AaBB	AaBb	<b>aaBB</b>	<b>aaBb</b>
	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>	<b>aaBb</b>	aabb		AaBb	<b>Aabb</b>	<b>aaBb</b>	<b>aabb</b>
02 genes dominantes complementar AABB					02 genes recessivos complementar aabb				
Parental Resistente		AABB			Parental Resistente		aabb		
Parental Suscetível		aabb			Parental Suscetível		AABB		
F <sub>1</sub>		AaBb			F <sub>1</sub>		AaBb		
F <sub>2</sub> (9 R : 7 S)	<b>AABB</b>	<b>AABb</b>	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	F <sub>2</sub> (1 R : 15 S)	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	<b>AABb</b>	AAbb	<b>AaBb</b>	Aabb		AABb	AAbb	AaBb	Aabb

	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	aaBB	aaBb		AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
	<b>AaBb</b>	Aabb	aaBb	aabb		AaBb	Aabb	aaBb	<b>aabb</b>
<b>01 gene dominante e 01 recessivo AAbb</b>					<b>01 gene dominante e 01 recessivo complementar AAbb</b>				
Parental Resistente		AAbb			Parental Resistente		AAbb		
Parental Suscetível		aaBB			Parental Suscetível		aaBB		
F <sub>1</sub>		AaBb			F <sub>1</sub>		AaBb		
F <sub>2</sub> (13 R : 3 S)	<b>AABB</b>	<b>AABb</b>	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	F <sub>2</sub> (3 R : 13 S)	AABB	AABb	AaBB	AaBb
	<b>AABb</b>	<b>AAbb</b>	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>		AABb	<b>AAbb</b>	AaBb	<b>Aabb</b>
	<b>AaBB</b>	<b>AaBb</b>	aaBB	aaBb		AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
	<b>AaBb</b>	<b>Aabb</b>	aaBb	<b>aabb</b>		AaBb	<b>Aabb</b>	aaBb	aabb

**Tabela 2.** Herança da resistência em populações segregantes do cruzamento entre genitores resistente e suscetível a doença.

População *	Plantas R	Plantas S	Esperado R:S	$\chi^2$	P (%) **
Parental Resistente	100	0	1:0	-	-
Parental Suscetível	0	100	0:1	-	-
F <sub>1</sub>	100	0	1:0	-	-
F <sub>2</sub>	302	98	3:1	0,05	81,73
RCR	100	0	1:0	-	-
RCS	52	48	1:1	0,16	68,91

\* RCR (retrocruzamento entre plantas F<sub>1</sub> e parental resistente), RCS (retrocruzamento entre plantas F<sub>1</sub> e parental suscetível); \*\* Probabilidade relacionada ao qui-quadrado ( $\chi^2$ ), não rejeitando a proporção esperada R:S quando o valor P  $\geq$  5%.

## 2.3. Mapeamento e associação de marcadores moleculares com a resistência genética

Um mapa genético de ligação consiste na representação da ordem dos genes ou marcadores genéticos em um cromossomo, assim como a distância relativa entre eles (Lander & Botstein, 1989). Uma das várias vantagens de se obter o mapa de ligação de uma espécie é a disponibilidade de um referencial para a localização dos genes de interesse agrônomico e elucidar as relações de ligação desses genes. As ligações ou a independência dos genes detectadas por meio do mapa irão refletir nas estratégias de melhoramento. Mapas genéticos, além de fornecer informações importantes a respeito da organização e localização de genes, servem de estrutura para identificação de regiões cromossômicas que interferem em características quantitativas de impor-



tância econômica, os chamados QTL – *Quantitative Trait Loci* (Crittenden et al., 1993). Assim, os resultados de ligação entre marcador e gene\QTL e também entre os próprios marcadores são essenciais no contexto da seleção genética no melhoramento genético de plantas.

Os mapas genéticos de ligação tem sido fundamentais para estudos de genética populacional e estrutura e evolução genômica. Na resistência de plantas a doenças, os mapas têm contribuído principalmente para estudo da arquitetura genética da resistência (Dodia et al., 2019) e localização de locos associados à resistência (Wen et al., 2018; Sapkota et al., 2019). Marcadores ligados aos locos identificados são utilizados na seleção assistida para obtenção de cultivares resistentes. Esses trabalhos não apenas fornecem informações e ferramentas importantes para a transferência do gene da resistência para materiais genéticos de interesse, mas também servem como base para a clonagem dos genes e ampliam o conhecimento da interação planta-patógeno (Pandey et al., 2016; Agarwal et al., 2018; Dodia et al., 2019; Neelam et al., 2020).

A obtenção dos mapas genéticos de ligação é baseada na taxa de recombinação de segmentos de DNA de cromossomos homólogos durante a meiose. Essas trocas de segmentos são denominadas de *crossing-over* ou recombinação. Esse fenômeno foi observado por Thomas Morgan em 1910, e, em 1913, o pesquisador A.H. Sturtevant sugeriu o uso da porcentagem de recombinantes entre genes ligados como indicador quantitativo da distância linear entre os dois genes na construção de mapas genéticos. Como os eventos de *crossing-over* ocorrem ao acaso, a probabilidade de recombinação é maior para locos mais distantes. Com base nessa taxa de recombinação entre os locos gênicos, são calculados a distância e ordenamento dos genes e marcadores moleculares nos cromossomos (Schuster & Cruz, 2004).

O cálculo da distância entre os genes/marcadores deve ser estimada adequadamente para que ocorra o ordenamento correto e sejam estabelecidos os grupos de ligação (GL) que representem o número básico de cromossomos da espécie. Para isso, é necessário definir a frequência máxima de recombinação e o LOD (*logarithm of the odds*) mínimo para inferir se dois locos estão ligados (Liu, 1998; Schuster & Cruz, 2004). Atualmente, diferentes métodos estatísticos estão disponíveis e incorporados em *softwares* (Xu et al., 2017).

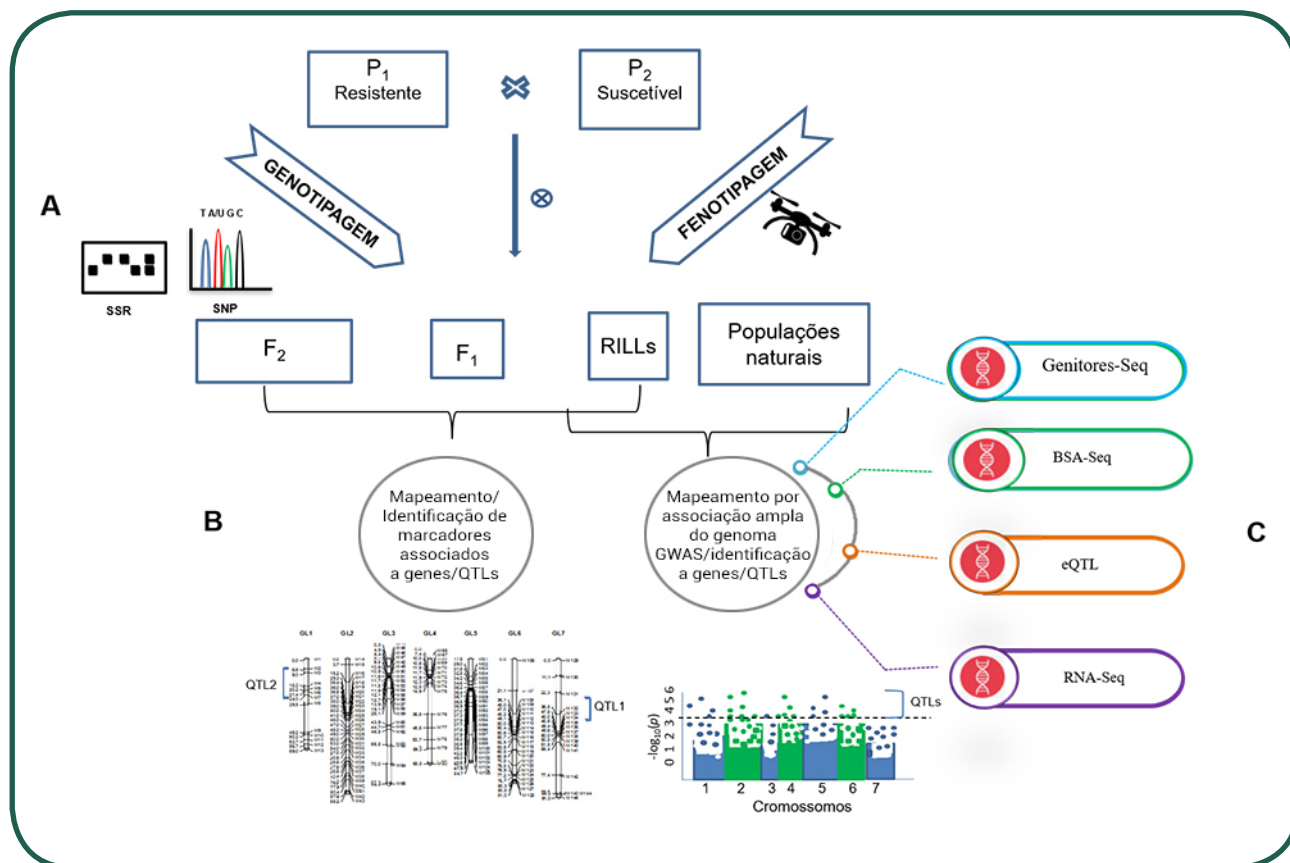
Inicialmente os mapas genéticos eram formados por marcadores morfológicos e citológicos, mas tinham baixa abrangência das espécies. Posteriormente, surgiram os marcadores bioquímicos e os mapas genéticos passaram a ser construídos a partir desses marcadores, permitindo a obtenção de mapas genéticos, potencialmente, em todas as espécies de plantas. Contudo, foi devido ao advento dos marcadores moleculares baseados em DNA que o mapeamento genético abrangeu inúmeras espécies de plantas de interesse agrônômico. Os mapas genéticos são fundamentados principalmente em marcadores do tipo *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeats* (SSR). Mais recentemente, com os avanços das técnicas de sequenciamento e análise de bioinformática, os marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) estão sendo incorporados aos mapas, permitindo a obtenção de mapas genéticos de alta densidade. Entretanto, a disponibilidade de um mapa genético confiável depende de vários fatores como o tipo de marcador utilizado, o tipo de população analisada e o tamanho da população, além de

outros. A partir da formação de mapas genéticos é possível associar os marcadores ou locos/QTL de determinado GL à resistência a determinado patógeno.

Além do uso de mapa genético de ligação para identificação de marcadores associados as características de interesse, outra estratégia comumente usada é o mapeamento por associação (Purcel et al. 2003). O mapeamento por associação é uma estratégia relativamente recente e tem sido utilizado com eficiência, principalmente, para localizar regiões genômicas associadas a características complexas (Zhu et al., 2008). O mapeamento por associação ou o estudo de associação ampla do genoma (GWAS), usado como complemento do mapeamento de ligação, considera os eventos históricos de *crossing-over* acumulados ao longo de centenas de gerações, proporcionando maior resolução e incluindo maior número de alelos. A principal distinção entre o mapeamento de ligação e mapeamento por associação é que na ligação são consideradas as recombinações em progênies estruturadas e formadas para o mapeamento, normalmente populações segregantes biparentais como  $F_2$ , retrocruzamentos, duplo-haplóides, RILs (*Recombinant inbred lines*) e NIL (*Near-Isogenic Lines*). No mapeamento por associação, são utilizadas populações naturais, o que aumenta a resolução do mapa, o número de alelos e não necessita do desenvolvimento da população de mapeamento (Xu et al., 2017; Scott et al., 2020).

A análise conjunta do mapa de ligação de alta densidade e GWAS consiste em estratégia poderosa para testar um grande número de marcadores e várias características ao mesmo tempo. Como resultado, grandes números de regiões gênicas podem ser associadas, permitindo identificar vários genes/QTL que controlam uma doença e até mesmo diferentes doenças (Drake-Stowe et al., 2017; Agarwal et al., 2018; Dodia et al., 2019; Cheng et al., 2019; Gonçalves-Vidigal et al., 2020; Neelam et al., 2020). Atualmente, essas estratégias de mapeamentos estão sendo enriquecidas com as informações obtidas na genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e fenômica. Um exemplo da integração de técnicas como sequenciamento de RNA (eQTL), sequenciamento dos genitores, análise segregante em massa por sequenciamento (BSA-Seq) e meta-análise de sequenciamento de RNA (mQTL) está esquematizado na Figura 1. Essas análises conjuntas permitem o mapeamento mais rápido e eficiente de genes candidatos para características complexas (Shen et al., 2019). As abordagens ômicas e mapeamento em larga escala geram grande quantidade de dados e, portanto, sua eficiência está associada ao desenvolvimento de diferentes metodologias de estatística genômica e bioinformática que aumentam o poder preditivo da análise (Murphy, 2012).

Dessa forma, por meio das análises de mapeamento aliadas a diferentes estratégias de biotecnologia, os genes ou QTL associados a resistência das plantas a doenças estão sendo identificados e caracterizados, facilitando a introgressão dos mesmos em diferentes materiais genéticos nos programas de melhoramento. Esses estudos contribuem para o aumento da disponibilidade de genes de resistência para serem trabalhados no melhoramento, bem como auxiliam na combinação de diferentes genes nas cultivares para obtenção de resistência durável (Kin & Reinke, 2019; Lin et al., 2019; Branham et al., 2020; Nvsvrot et al., 2020).



**Figura 1.** Esquema de identificação de genes, QTL e marcadores moleculares associados a resistência a doenças, por meio da análise conjunta de mapeamento e outras estratégias de biotecnologia. **A.** populações de melhoramento utilizadas no mapeamento convencional e em GWAS genotipadas com marcadores SSR e SNPs e fenotipadas. **B.** mapeamento convencional representando 7 grupos de ligação e dois QTL. **C.** técnicas integradas de ômicas e gráfico de Manhattan usado no estudo GWAS, que mostram diferentes SNPs em diferentes cromossomos. Exibe valores-  $p$  na escala  $-\log_{10}(p)$  versus a posição genômica dos SNPs e seus números cromossômicos. Picos mais altos correspondem a pequenos valores de  $p$  e indicam que a região genômica correspondente tem forte associação com a característica.

## 2.4. Incorporação dos genes de resistência por métodos de melhoramento

Os genes e QTL associados a resistência a doenças, uma vez identificados e caracterizados, podem ser incorporados em genótipos de plantas, visando a obtenção de cultivares resistentes. Diferentes métodos de melhoramento, que auxiliam a introgressão desses genes, estão atualmente disponíveis.

### 2.4.1. Resistência monogênica: retrocruzamento dominante e recessivo

O método de retrocruzamento tem sido utilizado quando se deseja transferir um ou poucos genes de genótipos não adaptados ou de espécies selvagens para genótipos elite. Os genótipos elite apresentam um grande número de características desejáveis, mas podem apresentar deficiência em algumas poucas características (Priyadarshan, 2019). Esse método deve ser utilizado, por exemplo, quando se tem uma cultivar muito plantada em uma região, mas que, no entanto, apresenta suscetibilidade a um patógeno importante, e que pode colocar em risco o seu plantio. Nesse caso, o genótipo resistente ao patógeno é denominado de genitor doador ou não-recorrente e o genótipo elite, de genitor recorrente. A principal característica do método de retrocruzamento é a contribuição genética desigual dos dois genitores para a obtenção da cultivar melhorada, ou seja, o genótipo do genitor recorrente é recuperado por repetidos cruzamentos, exceto por poucos genes desejáveis que são introgrididos do genitor doador (Singh, 1982).

Como a estratégia de retrocruzamento no melhoramento genético envolve a introgressão de um alelo em uma região específica do genoma do genitor recorrente, sua eficiência está condicionada a redução do segmento de DNA que flanqueia o alelo de interesse do genitor doador e a recuperação do genoma do genitor recorrente. Os segmentos de DNA que flanqueiam o alelo de interesse, denominado de *linkage drag*, pode ser responsável por algumas características não desejáveis do genitor doador (Pukalenty et al., 2019). No processo de melhoramento, deve-se, portanto, eliminar ao máximo o *linkage drag*.

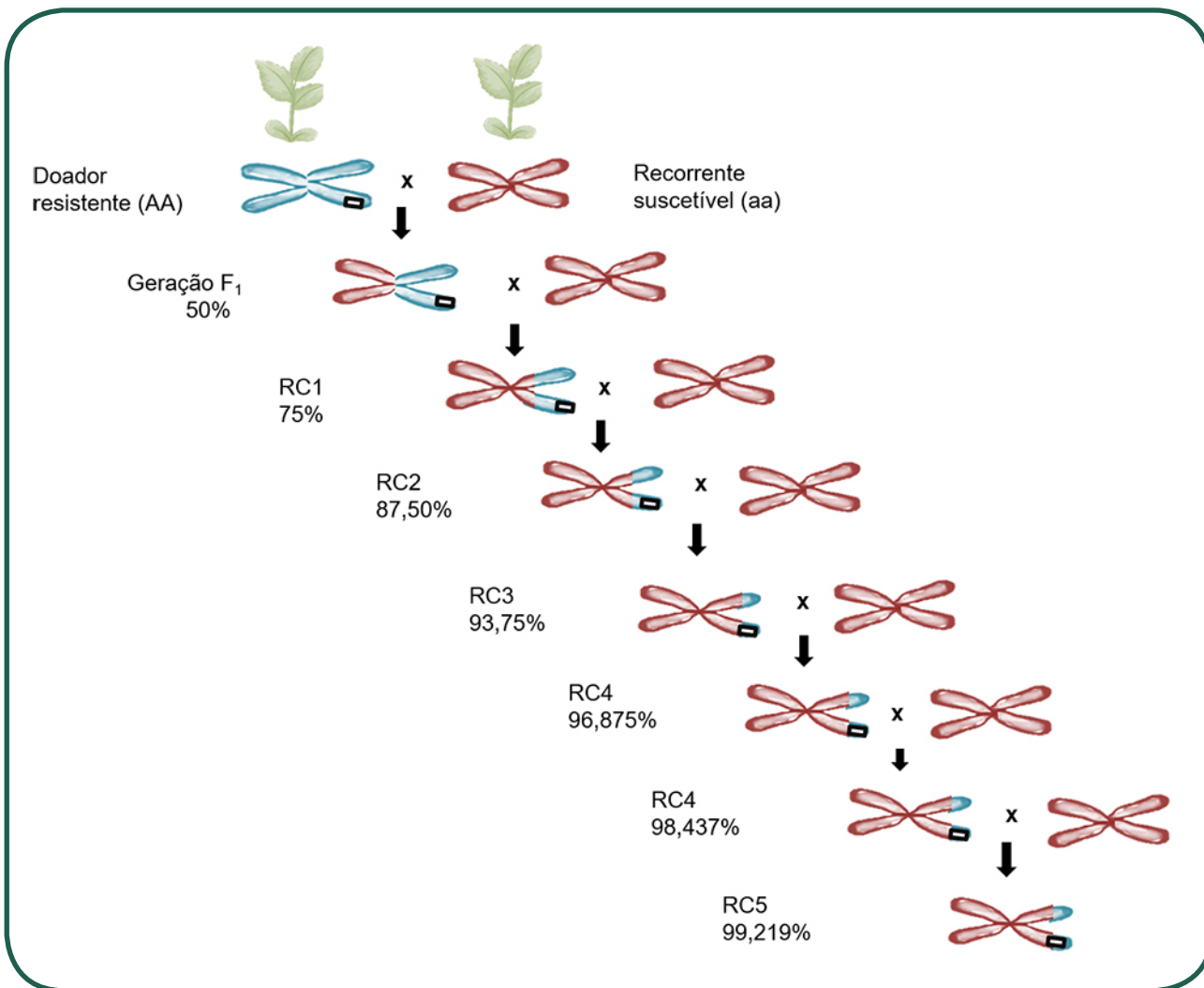
O processo de retrocruzamento inicia-se com o cruzamento entre o genitor doador e o recorrente, obtendo-se o híbrido F<sub>1</sub>. Indivíduos que possuem a resistência do genitor doador são repetidamente cruzados (retrocruzado) com o genitor recorrente (Figura 2). Essa etapa é tipicamente repetida cinco a seis vezes adicionais, seguida de autofecundação para estabelecer homozigose do alelo de resistência (Lewis & Kernodle, 2009). Após vários ciclos, espera-se que a planta resultante contenha as características desejáveis do genótipo elite e a resistência do doador e que contenha o mínimo de *linkage drag*.

A cada geração de retrocruzamento, a proporção do genoma do doador é reduzida, em média, pela metade (Figura 2). O cálculo da recuperação do genoma recorrente pode ser feito pela fórmula:

$$\% \text{ genoma do genitor recorrente (em média)} = 100[1-(0,5)^{n+1}], \text{ onde } n = \text{número de gerações de retrocruzamento (Fehr, 1987).}$$

O termo médio foi utilizado porque a progênie formada em cada geração de retrocruzamento é variável, tendo indivíduos com maior proporção do recorrente e outros com menor. Outro aspecto importante é que na progênie de cada retrocruzamento existem indivíduos contendo o gene de resistência e outros que não apresentam o gene. Portanto, deve-se fazer seleção em todas as gerações, de forma a utilizar nos cruzamentos apenas os indivíduos contendo o gene, para formar a próxima geração.

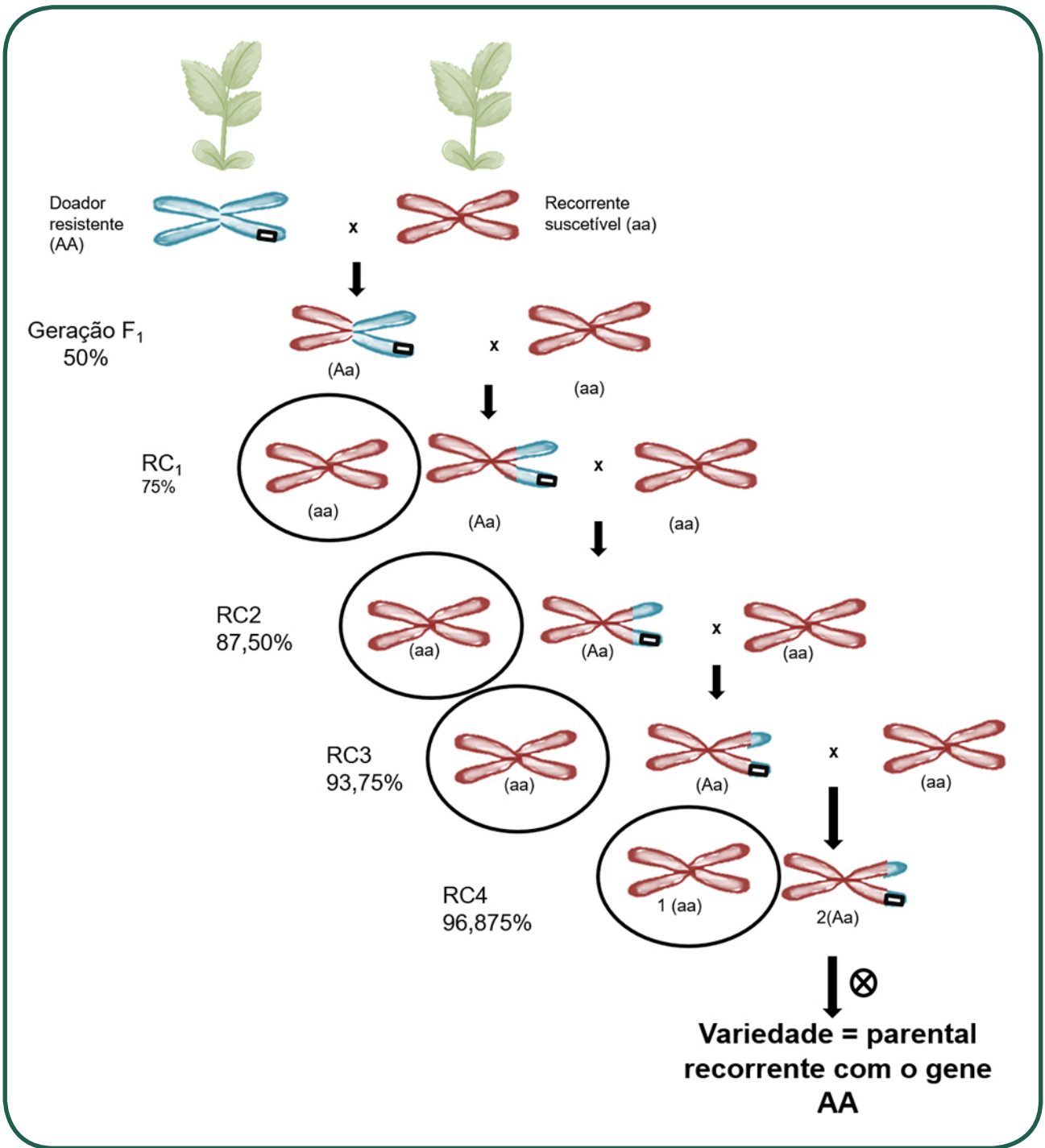
O objetivo do método de retrocruzamento é recuperar mais de 98% do genoma do genitor recorrente (genitor elite) em genótipos que contenham o gene de resistência desejado (Lewis & Kernodle, 2009).



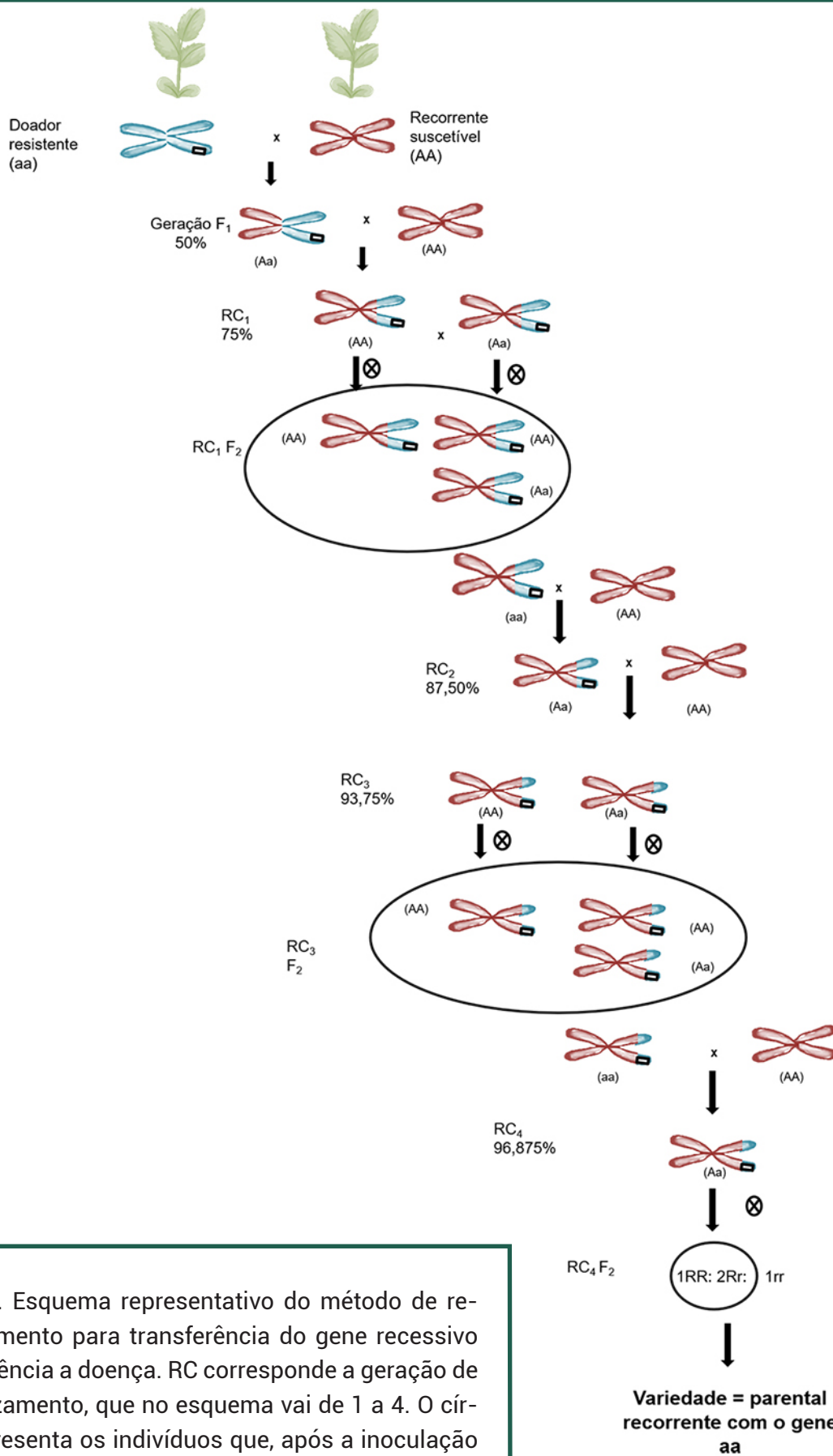
**Figura 2.** Esquema do método de retrocruzamento. O retângulo preto representa o gene de resistência que se deseja transferir.

O retrocruzamento pode ser realizado tanto para característica controlada por gene em dominância quanto para recessivo. O esquema do retrocruzamento para resistência da planta controlado por genes dominantes está apresentado no Figura 3 e para gene recessivo na Figura 4.





**Figura 3.** Esquema representativo do método de retrocruzamento para transferência do gene dominante de resistência a doença. RC corresponde a geração de retrocruzamento, que no esquema vai de 1 a 4. O círculo representa os indivíduos que, após a inoculação com o patógeno, apresentaram-se como suscetíveis e, por isso, foram descartados. O cruzamento é realizado apenas com os indivíduos resistentes. A última etapa consiste na autofecundação das progênies para obtenção de plantas com o gene em homozigose.

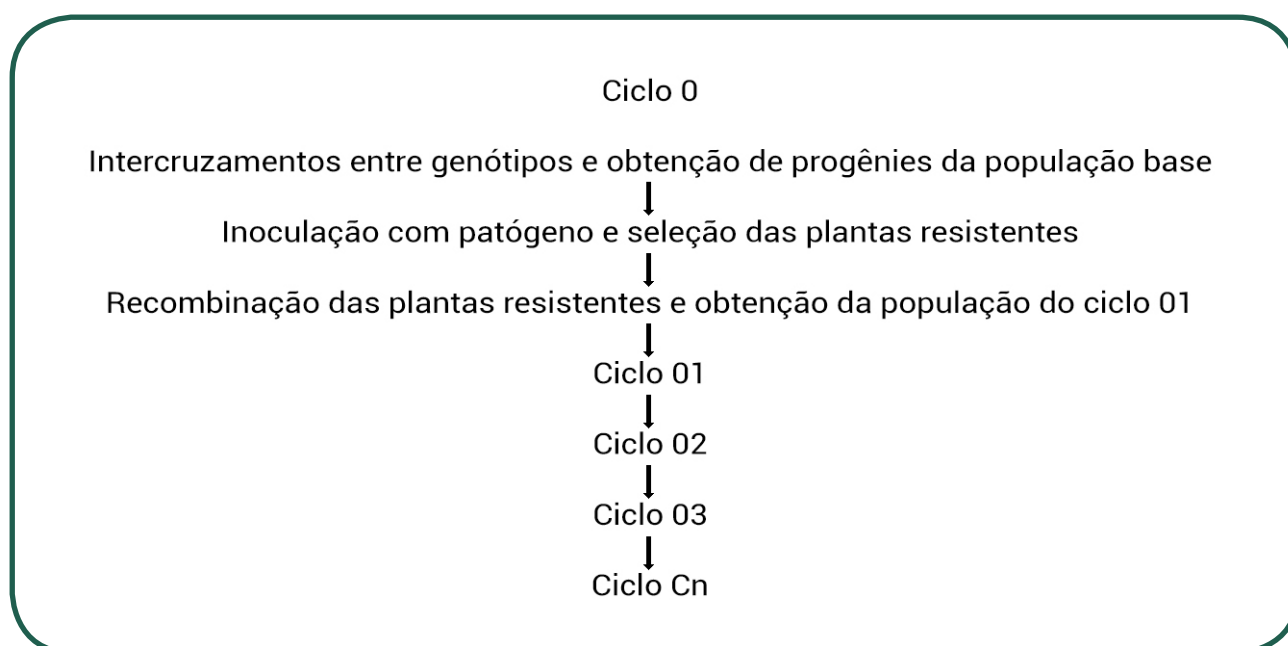


**Figura 4.** Esquema representativo do método de retrocruzamento para transferência do gene recessivo de resistência a doença. RC corresponde a geração de retrocruzamento, que no esquema vai de 1 a 4. O círculo representa os indivíduos que, após a inoculação com o patógeno, apresentaram-se como suscetíveis e, portanto, foram descartados.

## 2.4.2. Resistência poligênica

A resistência poligênica, conhecida por seu efeito quantitativo é muito importante no manejo de doenças de plantas, existindo vários exemplos de genótipos com esse tipo de resistência nas culturas. Uma de suas vantagens é a maior durabilidade, pois para que seja suplantada serão necessárias mudanças genéticas em vários genes de avirulência do patógeno. O melhoramento genético de plantas explora a resistência poligênica de forma que ocorra o acúmulo gradual dos alelos de resistência desejáveis por meio de cruzamentos em métodos utilizados com esse objetivo. Entre esses métodos, um dos mais explorados é a seleção recorrente, a qual é representada por meio de um processo cíclico de seleção e recombinação visando o aumento de forma contínua na frequência de alelos de resistência (Borém & Miranda, 2009; Caixeta & Zambolim, 2014).

Na seleção recorrente, primeiramente, ocorre o intercruzamento entre genótipos com e sem fontes de resistência a doença, obtendo as progênies da população base a ser melhorada, também conhecida como população de ciclo C0. Em seguida, essas plantas são avaliadas e os indivíduos superiores resistentes são selecionados e recombinados. Após essa etapa, o ciclo de seleção é finalizado e o processo é reiniciado no ciclo C1, podendo ser repetido o quanto for necessário até o ciclo Cn para que a elevação na frequência de alelos resistentes a doença na população seja atingida (Figura 5). As plantas obtidas na população podem ser usadas diretamente como nova cultivar ou como fonte de linhagens superiores (Borém & Miranda, 2009; Caixeta & Zambolim, 2014). Dentro deste contexto, existem vários métodos de seleção recorrente que diferem principalmente nas recombinações (Borém & Miranda, 2009) e exemplos de aplicação da seleção recorrente no melhoramento de plantas visando resistência à doenças podem ser explorados em publicações científicas (Diaz-Lago et al., 2002; Thabuis et al., 2004; Amaro et al., 2007; Arantes et al., 2010).



**Figura 5.** Ciclos representativos da seleção recorrente para resistência a doenças em plantas.

A hibridação artificial de plantas, ou simplesmente cruzamento de plantas, é um importante método de melhoramento usado pelo homem desde os séculos passados com o objetivo de combinar características diferentes de dois ou mais genitores contrastantes nos seus descendentes. Pode-se, por exemplo, cruzar um genitor muito produtivo, mas que é suscetível a uma nova raça de patógeno, com outro genitor pouco produtivo, porém resistente a nova raça do patógeno. Os híbridos ( $F_1$ ) obtidos são submetidos à autofecundação, formando uma população de plantas  $F_2$  segregantes, assim chamada por apresentar indivíduos com as mais variadas constituições genotípicas e fenotípicas, em que pode-se selecionar indivíduos produtivos e resistentes, combinando características desejáveis de ambos os genitores conforme era de interesse no cruzamento inicial.

A próxima etapa é conduzir esta população segregante à homozigose, obtendo-se linhagens, seja para comercialização direta das mesmas, no caso de espécies autógamas, ou para a hibridação destas linhagens a fim de se obterem híbridos heteróticos para também serem comercializados, no caso de espécies alógamas. Assim, para a obtenção do novo cultivar, seja uma linhagem ou um híbrido, vários métodos podem ser usados para conduzir esses indivíduos  $F_2$  segregantes à homozigose, como o método da população (ou *bulk*), o genealógico (ou *pedigree*), o método do descendente de uma única semente (ou *single seed descent* – SSD), dentre outros, com maior ou menor uso em espécies autógamas e alógamas (Borém & Miranda, 2009).

Como exemplo, será abordado o método do *bulk*, muito usado em espécies autógamas. Inicialmente, os indivíduos  $F_1$  são plantados em qualquer ambiente para obtenção das sementes  $F_2$ , sendo estas, bem como as demais gerações, plantadas no local ou em ambiente similar ao qual o novo cultivar se destina. Na próxima etapa, é feita a colheita conjunta, ou em *bulk*, como é dito no meio técnico, de todas as plantas da geração  $F_2$ , propiciando a mistura das sementes de todas as plantas colhidas. Em seguida, é feita a amostragem ao acaso e representativa das sementes para formação da geração de plantas  $F_3$ , com número de sementes variando de acordo com o interesse e as condições do programa. Este processo de colheita de todas as plantas em *bulk*, amostragem e plantio das sementes para formar a nova geração de plantas é repetido até que o grau de homozigose desejado seja alcançado na geração  $F_n$  (Figura 6).

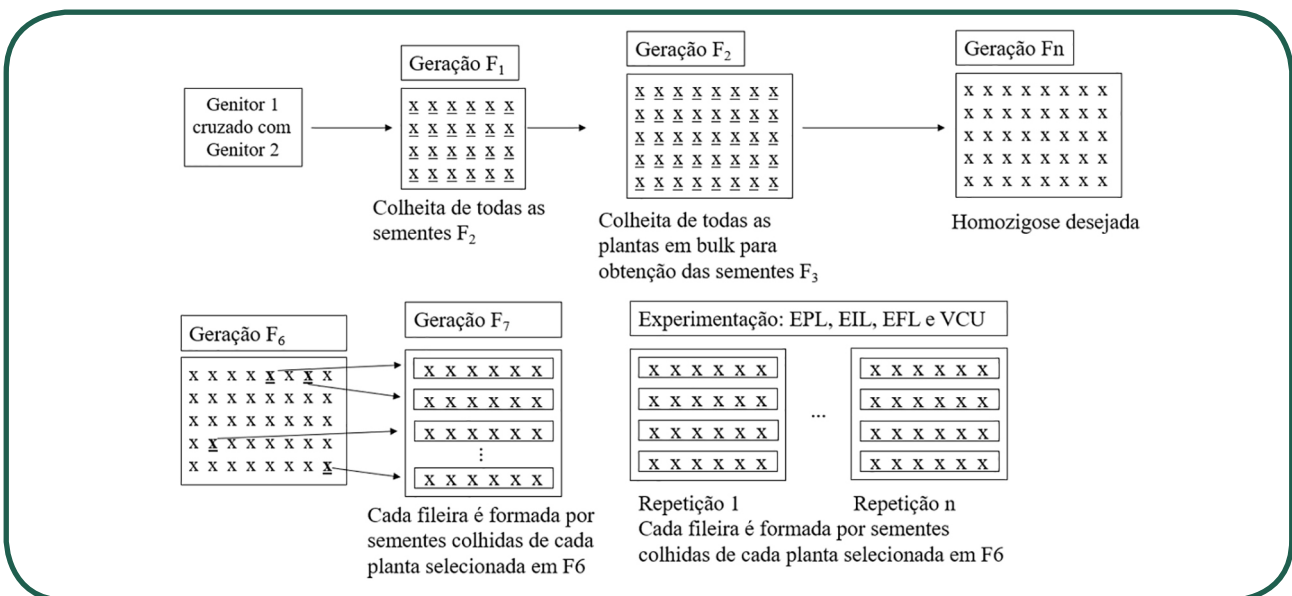


Figura 6. Esquema do método *bulk*, da hibridação à experimentação.

Nesta geração, a colheita em *bulk* é substituída pela seleção e trilha individual das plantas agronomicamente superiores e as sementes de cada planta selecionada em  $F_n$  formarão uma fileira de plantas, ou famílias, da geração  $F_{n+1}$ . Esta etapa é chamada de abertura do *bulk*. Deve ficar claro ao leitor que, plantas de uma geração  $n$  qualquer ( $F_n$ ), quando sofrem autofecundação, formam sementes  $F_{n+1}$  e, estas, quando plantadas, formam a geração de plantas também chamadas de  $F_{n+1}$ . Para fins de ilustração, foi assumido que o grau de homozigose desejado foi alcançado na sexta geração ( $F_6$ ). O melhorista selecionará as melhores plantas  $F_6$  que serão colhidas e trilhadas individualmente para não haver mistura das sementes. As sementes  $F_7$  de cada uma das plantas selecionadas anteriormente serão semeadas em fileiras diferentes, garantindo que cada fileira contenha apenas sementes de uma única planta. Assim, se forem selecionadas 200 plantas individuais em  $F_6$ , por exemplo, serão plantadas 200 fileiras em  $F_7$ , tendo cada fileira as sementes de uma única planta  $F_6$  anteriormente selecionada.

Em  $F_{n+1}$ , no exemplo  $F_7$ , a seleção de plantas dentro de cada fileira é pouco eficiente dado ao maior grau de homozigose das plantas dentro, propiciado pelas sucessivas gerações de autofecundação nas gerações anteriores. Entretanto, o melhorista ainda faz a seleção entre as melhores fileiras, ocasião em que todas as plantas de uma mesma fileira selecionada são colhidas em *bulk*, suas sementes misturadas e amostradas aleatoriamente para o plantio das novas gerações que serão avaliadas no ensaio preliminar de linhagem (EPL), ensaio intermediário de linhagem (EIL) e ensaio final de linhagem (EFL), sendo  $F_8$ ,  $F_9$  e  $F_{10}$ , respectivamente. Nesses ensaios são usados delineamento experimental e testes de médias apropriado para comprovação estatística da superioridade das médias para as características agrônômicas de interesse do programa de melhoramento.

Deve ser observado no método que uma vez que o melhorista só faz seleção após a população de plantas atingir certo grau de homozigose,  $F_6$  neste exemplo, antes disso as plantas ficam submetidas apenas à seleção natural. Consequentemente, aquelas plantas que mais se adaptam ao meio e apresentam maior produção de grãos têm maior chance de serem amostradas para o plantio em cada geração. Algumas variações no método podem ser realizadas de acordo com o interesse do programa. A inoculação artificial de patógenos pode ser usada nas gerações iniciais a fim de serem eliminadas plantas suscetíveis (Costa et al., 2006). Faria et al., 2003; Peloso et al., 2003; Peloso et al., 2004; Faria et al., 2004) utilizaram do método do *bulk* para o desenvolvimento de importantes cultivares de feijão-comum, inclusive resistentes a algumas doenças causadas por vírus e fungos. O método foi usado durante a seleção de famílias resistentes ao mofo branco no feijoeiro por Ferreira et al. (2018).

### 2.4.3. Uso de SSD (*Single Seed Descendente*), RILs (*Recombinant Inbred Lines*) e NILs (*Near Isogenic Lines*) em programa de melhoramento visando resistência a doenças.

No método do SSD (*Single Seed Descent*, ou descendente de uma única semente), também se realiza a hibridação de indivíduos contrastantes para as características de



interesse. Como feito no método do *bulk*, pode-se cruzar um genitor muito produtivo, mas que é suscetível a uma nova raça de patógeno, com outro genitor pouco produtivo, porém resistente à nova raça do patógeno, obtendo os indivíduos  $F_1$ . A partir desta geração, as plantas sofrem autofecundação naturalmente, no caso das autógamas, ou são autofecundadas artificialmente, no caso das alógamas. Para fins didáticos, as nomenclaturas das gerações de autofecundação serão aquelas designadas para plantas autógamas ( $F_n$ ).

Após o plantio das sementes  $F_1$  e maturação dessas plantas, as sementes  $F_2$  são colhidas em conjunto, mas semeadas individualmente, de tal forma que cada uma poderá originar uma linhagem no final do processo. O número de sementes  $F_2$  semeadas deve representar a máxima variabilidade possível do cruzamento, de acordo com o interesse e a capacidade do programa de melhoramento. Em seguida, o objetivo é garantir o avanço de cada planta  $F_2$  até a geração  $F_n$ , em que o grau de homozigose de interesse é obtido. Assim, se foram plantadas, por exemplo, 400 sementes  $F_2$ , espera-se que este número seja mantido a cada geração.

Em seguida, uma semente  $F_3$  é colhida de cada planta  $F_2$ , em ocasião da maturação, e semeada individualmente. Semelhantemente, uma semente  $F_4$  é colhida de cada planta  $F_3$ , e semeada individualmente. Este processo de colheita de semente individual e plantio é repetido até  $F_5$  ou  $F_6$ , quando o grau de homozigose para cada loco individualmente é elevado. Agora em homozigose, não apenas uma semente, mas todas as sementes  $F_7$  de cada planta  $F_6$  serão usadas para formar uma fileira de plantas na geração  $F_7$ , etapa chamada de abertura de linhagens ou famílias. Cada fileira de plantas agora é uma RIL (*Recombinant Inbred Line*, ou linhagem endogâmica recombinante). Somente a partir desta etapa é que as melhores fileiras/RILs são selecionadas e colhidas individualmente em *bulk* para compor os diversos ensaios de avaliação de linhagens, como feito no método do *bulk*, até o lançamento do novo cultivar (Borém & Miranda, 2009).

Para garantir a manutenção do número de plantas em cada geração, recomenda-se que sejam plantadas duas a três sementes de cada planta por cova e, após a germinação, seja feito o desbaste mantendo apenas uma planta. É comum a morte de plantas, ainda que esta estratégia seja adotada. Assim, nem todas as plantas  $F_2$  serão representadas na população de RILs, mas toda RIL obtida representa uma planta  $F_2$ , de tal forma que toda a variabilidade existente na população  $F_2$  está representada nas RILs, desde que um tamanho de população adequado tenha sido inicialmente utilizado e mantido. Essa população de RILs pode, alternativamente aos ensaios de competição para lançamento de um novo cultivar, ser genotipada e fenotipada para estudos de detecção de marcadores moleculares associado a genes qualitativos e/ou QTLs de resistência as doenças e as outras características agrônômicas, como produtividade de grãos, permitindo a seleção de genótipos de interesse assistida por marcadores moleculares.

Agarwal et al. (2018) detectaram 35 QTLs associados a mancha-castanha (*Cercospora arachidicola*), mancha-preta (*Cercosporidium personatum*) e ao *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) em uma população formada por 91 RILs de amendoim (*Arachis hypogaea*) derivadas de um genitor resistente e outro suscetível para essas doenças. Quatro QTLs relacionados a resistência à canela preta (*Phytophthora nicotianae*) e três relacionados

à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) foram detectados em uma população de 180 RILs de tabaco (*Nicotiana tabacum*), inclusive alguns desses QTLs podem estar atuando conjuntamente na resistência a ambas as doenças, simultaneamente (Drake-Stowe et al, 2017).

No feijão comum, 110 RILs foram usadas para o mapeamento de importantes genes de resistência à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e à mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) no cromossomo 1 do feijoeiro. Ambos os genes são promissores para a obtenção de linhagens resistentes a essas doenças por meio da seleção assistida por marcadores moleculares (Gonçalves-Vidigal et al., 2020). Ainda no feijão comum, Silva (2017) realizou estudo de herança em 393 RILs e verificou que a resistência da linhagem AND 277 à raça 65 de *C. lindemuthianum* é conferida por dois genes dominantes duplicados independentes, enquanto que a resistência à raça 89 é monogênica, com dois alelos e dominância completa entre os alelos.

Para a obtenção de populações de NILs (*Nearly Isogenic Lines*, ou linhagens quase isogênicas) realiza-se a hibridação assim como feito para a população de RILs. Entretanto, os indivíduos  $F_1$  são retrocruzados com o genitor recorrente, no caso o comercial e suscetível, obtendo a população de plantas  $RC_1F_1$ . Esta última pode ser inoculada artificialmente com o patógeno ou submetida a seleção assistida com marcadores moleculares ligado ao gene de interesse para que apenas os indivíduos  $RC_1F_1$  resistentes sejam novamente retrocruzados com o genitor recorrente. Este processo é repetido até a terceira geração de retrocruzamento, obtendo  $RC_3F_1$ , ou mais gerações ( $RC_nF_1$ ), até que a porcentagem ideal do genoma do genitor recorrente seja recuperada, de acordo com os interesses do programa de melhoramento. Finalmente, as plantas  $RC_3F_1$  resistentes são autofecundadas até  $RC_3F_5$ , por exemplo, quando são consideradas linhagens quase isogênicas (NILs) (Semagn et al., 2006; Jena et al., 2017; Jain et al., 2019).

Jain et al. (2019) desenvolveram três NILs de arroz contendo diferentes genes para resistência a brusone (*Magnaporthe oryzae*) e, por meio de estudos do transcriptoma destas NILs, sugeriram que o desenvolvimento de cultivares com amplo espectro de resistência ao patógeno era possível com a piramidação de dois importantes genes de resistência (Pi9 e Pi54). Na cultura da soja, foram obtidos conjuntos de NILs com foco no estudo do loco quantitativo de resistência a *Phytophthora sojae*, já mapeado no cromossomo 18 da soja, de extrema importância para a resistência ao patógeno (Karhoff et al., 2019). Oito NILs de milho contendo QTLs de resistência a vários patógenos de origem fúngica foram usadas para avaliar o efeito destes QTLs no desenvolvimento de fungos e bactérias não patogênicas na folha do milho. De acordo com os autores, os QTLs propiciaram resistência de amplo espectro aos patógenos, sem prejudicar o desenvolvimento do microbioma foliar (Wagner et al, 2019).

#### 2.4.4. Seleção assistida por marcadores moleculares

Com o objetivo de aumentar a eficiência e rapidez na obtenção de cultivares com resistência a doenças, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas e incorporadas nos programas de melhoramento genético de plantas. Dentre essas metodologias, destaca-se o uso de marcadores moleculares, os quais tem sido rotineiramente utilizados

no melhoramento das principais espécies de plantas.

Marcadores de DNA permitem a detecção de variações nas sequências do DNA entre indivíduos de uma mesma espécie. Por identificarem variações no DNA, são estáveis e não são afetados pelo ambiente e pelos efeitos pleiotrópicos e epistáticos (Adhikari et al., 2017). Dessa forma, marcadores moleculares tem sido usados no melhoramento como ferramenta eficiente para a análise da variabilidade genética, uma vez que consiste em estratégia precisa de associação da variabilidade fenotípica e genotípica. No entanto, a eficiência do uso desses marcadores está associado aos seguintes critérios: (1) o marcador deve estar fisicamente próximo ou inserido no (s) gene (s) de interesse; (2) ser altamente polimórfico, permitindo a discriminação dos diferentes genótipos; e (3) consistir em metodologia rápida, simples e de custo baixo (Garrido-Cardenas et al., 2017).

Além dos marcadores moleculares, diferentes ferramentas moleculares estão sendo continuamente desenvolvidas e incorporadas no melhoramento genético de plantas (Savadi et al., 2017). Os avanços das técnicas moleculares, da bioinformática, do sequenciamento, bem como da genotipagem e fenotipagem de alto rendimento resultaram em uma nova era do melhoramento genético. A utilização dessas ferramentas tem permitido a obtenção mais rápida de cultivares que atendam às necessidades dos produtores, das indústrias e do mercado tanto nacional quanto internacional. As abordagens mais comumente usadas são a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM), seleção genômica ampla (GS) e a genética de associação (GWAS).

A SAM é baseada no conceito de que é possível inferir a presença de um gene pela presença de uma marca genética que está estreitamente ligada ao gene. Portanto, a SAM consiste na seleção indireta de uma característica de interesse por meio de associação genética com marcadores moleculares (Sharma & Sharma, 2018). O uso de marcadores ligados a genes de interesse é de grande importância na seleção de genótipos, principalmente quando o programa de melhoramento tem como objetivo introduzir dois ou mais genes, quando o fenótipo é de determinação complexa, quando o processo de avaliação requer destruição da planta ou quando a avaliação fenotípica é menos eficiente e requer mais tempo e recurso. Para melhoramento visando resistência a doenças, a SAM é particularmente importante, pois permite a seleção na ausência do patógeno ou da raça do patógeno.

A SAM pode ser aplicada nos diferentes métodos de melhoramento de plantas. Em programas de retrocruzamento, um dos mais utilizados para resistência a doenças, a aplicação dos marcadores permite a recuperação mais rápida do genoma do genitor recorrente, permitindo a incorporação do gene de resistência que estava presente no parental doador. Nesse método, geralmente, recomenda-se de seis a oito gerações para a recuperação do genoma do parental recorrente. Com o uso de marcadores moleculares pode-se reduzir o número de gerações pela metade, além de monitorar a presença do gene de resistência sem necessidade de inoculação com o patógeno. Em cada geração de retrocruzamento, indivíduos contendo os genes de resistência são selecionados com base nos marcadores moleculares, enquanto marcadores distribuídos no genoma do genitor recorrente são usados para eliminar o *linkage drag* e recuperar o genoma do recorrente (Sharma & Sharma, 2018).

O retrocruzamento pode ser usado como um método isolado para incorporar um gene de resistência em uma cultivar de interesse ou pode ser usado em outro método,

chamado piramidação. Pode-se definir piramidação como o acúmulo de genes em uma linhagem ou variedade, ou ainda, como a introgressão de vários genes de resistência em uma única variedade. A piramidação de genes tem sido sugerida como uma estratégia potencial para conferir amplo espectro de resistência e manter a resistência a doenças por um longo período, ou seja, para aumentar a durabilidade da resistência.

Para a resistência a doenças, a presença de um gene de maior efeito pode mascarar outros genes, exigindo, portanto, o uso de marcadores moleculares associados aos diferentes genes para garantir que sejam combinados. Dessa forma, marcadores moleculares têm contribuído substancialmente para o melhoramento para resistência a doenças e acúmulo dos genes em um genótipo (Mundt, 2018).

As principais etapas executadas durante o desenvolvimento de um programa de piramidação de genes de resistência a doenças, assistido por marcadores moleculares, são: (1) identificação dos patótipos mais virulentos e prevalentes dos patógenos, e com isso, a caracterização das fontes de resistência promissoras para a região a qual se destinam as novas cultivares; (2) estudo da herança genética da resistência, a partir de cruzamentos entre as fontes de resistência selecionadas e a cultivar suscetível de interesse; (3) identificação de marcadores moleculares ligados aos diferentes alelos de resistência; (4) obtenção de linhagens contendo os genes de resistência e as marcas moleculares correspondentes, via retrocruzamentos; e (5) piramidação dos alelos de resistência a partir de intercruzamentos entre as linhagens obtidas (Alzate-Marin et al., 2005).

Os marcadores podem também ser utilizados em outros métodos de desenvolvimento de genótipos superiores como é o caso da seleção recorrente. Os mesmos podem ser utilizados desde a formação de uma população base, como também, em cada ciclo da seleção recorrente. Por exemplo, após a etapa de avaliação dos genótipos, as distâncias genéticas entre os genótipos selecionados podem ser determinada, permitindo promover a recombinação apenas do conjunto de genótipos mais divergentes. Essa estratégia assegura a preservação da variabilidade genética na população recombinada e, consequentemente, propiciando maiores ganhos genéticos nos ciclos futuros. Isto faz com que a seleção recorrente, uma estratégia clássica de melhoramento de elevado potencial de ganhos genéticos, seja ainda mais promissora.

O uso de marcadores moleculares em larga escala tem permitido incorporar, além da SAM, outras metodologias inovadoras no melhoramento, como seleção genômica ampla (GS), e a genética de associação (GWAS). A GS, proposta por Meuwissen et al. (2001), enfatiza a predição simultânea dos efeitos genéticos de milhares de marcadores genéticos de DNA dispersos em todo o genoma de um organismo, de forma a capturar os efeitos de todos os locos (tanto de pequenos quanto de grandes efeitos) e explicar toda a variação genética de um caráter quantitativo. A condição fundamental para isso é que haja desequilíbrio de ligação, em nível populacional, entre alelos dos marcadores e alelos dos genes que controlam o caráter. A predição dos efeitos genéticos é realizada com base em dados genotípicos e fenotípicos de indivíduos pertencentes a uma amostra da população de seleção. Esses efeitos genéticos dos marcadores sobre fenótipos são somados e usados na predição de valores genéticos de indivíduos apenas genotipados, candidatos à seleção em programas de melhoramento genético. A predição e a seleção podem ser realizadas em fases muito juvenis de plantas, acelerando assim o processo de melhoramento genético (Resende, 2007).

A GWAS possibilita inferir sobre as relações das variações genéticas com características fenotípicas de importância econômica, em nível populacional, por meio de testes de hipóteses e objetivando detectar efeitos significativos (Huang & Han, 2014). Dessa forma, essa ferramenta demonstra grande relevância nos programas de melhoramento, tendo como principal objetivo identificar regiões genômicas e genes candidatos para o controle genético de determinada característica (Yang et al., 2011), como as várias regiões associadas a resistência a doenças.

A incorporação de novas tecnologias tem permitido incrementar a dinâmica e a capacidade de resposta dos programas de melhoramento. Os avanços da biotecnologia, ocorrido nos últimos anos, certamente concorrerão para dinamizar esse processo. O potencial do uso de marcadores moleculares no melhoramento está, não só na redução do tempo de condução do programa, mas também na base científica sólida que pode explicar a genética e a bioquímica das mudanças que ocorreram ou que poderão ocorrer no processo de melhoramento genético. Mesmo não conhecendo todos os componentes genéticos envolvidos em uma característica, marcadores moleculares podem ser importantes para manipular genes ou blocos gênicos desejáveis com maior precisão e rapidez. As novas tecnologias, com destaque ao uso de marcadores moleculares, vêm então associar aos procedimentos de melhoramento denominados tradicionais, dotando os mesmos de maior versatilidade na solução dos mais variados problemas agrônômicos, incluindo a resistência de plantas a diversas doenças.

### 3. Manejo da resistência: rotação de genes de resistência, piramidação e multilinhas/misturas de cultivares

Vários fitopatógenos apresentam riscos de evolução na natureza frente aos diferentes fatores ou forças evolutivas existentes como as mutações, tamanho da população, fluxo gênico e genotípico, reprodução sexual e uso de genes de resistência de forma contínua. A mutação é o principal evento de variação genética, podendo influenciar em novas estirpes ou raças virulentas e agressivas do patógeno, suplantando assim a resistência do hospedeiro. O tamanho da população influencia na probabilidade de mutantes estarem presentes e grandes populações possuem mais mutantes devido a taxa de mutação. O fluxo de genes é um processo em que alelos específicos ou indivíduos são trocados entre populações geograficamente separadas e a forma de dispersão como o vento é importante para esse fluxo. A reprodução sexual envolve a troca de material genético resultando em maior diversidade. Além desses, o uso contínuo do mesmo gene de resistência como forma de monocultivo e uniformidade genética também aumenta a frequência do mutante virulento e o gene de resistência passa ser suplantado pelo patógeno (McDonald & Linde, 2002).

Portanto, estratégias como a rotação de genes de resistência, piramidação, multilinhas ou mistura de cultivares e diversificação espacial devem ser exploradas no manejo da resistência do hospedeiro com objetivo de reduzir ou retardar a taxa de aumento na frequência de mutantes virulentos e obter uma maior durabilidade da resistência no campo (McDonald & Linde, 2002; Camargo, 2011; McDonald, 2014; Caixeta & Zambolim, 2014).



A rotação de genes de resistência no tempo e no espaço reduz a pressão de seleção direcional do patógeno, baseando na alteração de cultivares com genes de resistência diferentes, onde uma é substituída por outra para evitar que a frequência de alelos para virulência na população do patógeno aumente na área de plantio (McDonald & Linde, 2002; Camargo, 2011). Na cultura do sorgo, a cultivar BR 304 suscetível a antracnose foi utilizada em um sistema de rotação com duas cultivares resistentes e mostrou uma redução na severidade da doença em aproximadamente 42 e 70% quando rotacionada com a cultivar resistente 1G150 e DAS740, respectivamente, além da maior produtividade quando comparado ao sistema de plantio contínuo (Silva et al., 2015).

Na piramidação é realizada a incorporação de ao menos dois genes de resistência por meio do retrocruzamento em uma única variedade e o maior número de genes resistentes piramidados permitirá maior estabilidade e durabilidade da resistência frente as diferentes raças do patógeno (McDonald & Linde, 2002; Caixeta & Zambolim, 2014; Camargo, 2011). Existem vários exemplos de piramidação de genes de resistência usando a seleção assistida por marcadores moleculares e facilitando o tempo de obtenção dos cultivares resistentes (Maroof et al., 2008; Rajpurohit et al., 2011; Yamana et al., 2015).

A multilinha e a mistura de cultivares são representadas por uma composição de linhagens agronomicamente semelhantes ou cultivares com características agrônomicas similares ou não, respectivamente. No entanto, essas linhagens ou cultivares possuem genes de resistência diferentes com o objetivo de controlar o maior número de raças do patógeno. Portanto, as sementes das linhagens ou cultivares são distribuídas no plantio em mistura e a pressão de seleção ao patógeno será menor, pois poderá existir genótipo suscetível a uma determinada raça do patógeno. As plantas resistentes a determinada raça apresenta o efeito na redução do inóculo inicial, e o efeito barreira física na distribuição do inóculo também afeta a taxa de progresso da doença (McDonald & Linde, 2002; Camargo, 2011).

Várias pesquisas desenvolvidas mostraram resultados eficientes do uso de multilinhas ou misturas de cultivares (Zhu et al., 2000; Costa et al., 2012; Raboin et al., 2012). Na cultura do arroz foram obtidos excelentes resultados, onde a severidade da doença brusone nas variedades suscetíveis foi 94% menor quando cultivadas em misturas com genótipos resistentes. Além disso, apresentaram maior rendimento de produtividade (89%) quando comparado ao monocultivo apenas com material suscetível e não foi necessário aplicação de fungicidas (Zhu et al., 2000). Resultados satisfatórios no manejo da brusone também foi relato principalmente quando utilizou aproximadamente 17% da cultivar suscetível em mistura com cultivar resistente, aumentando o rendimento do arroz (Raboin et al., 2012). A mistura de cultivares possui maior capacidade de adaptação em diferentes ambientes, no entanto, a variação nas características agrônomicas pode dificultar o seu uso na prática. Para contornar esse fator, uma alternativa é adotar o plantio dessas cultivares resistentes em campos vizinhos como uma diversificação espacial (McDonald & Linde, 2002; Camargo, 2011).

As estratégias de manejo que podem ser mais apropriadas em diferentes sistemas de produção agrícola têm sido relatada, considerando por exemplo o tipo de cultura, agricultura familiar ou industrial, nível tecnológico, além dos riscos de evolução

dos fitopatógenos (McDonald & Linde, 2002; McDonald, 2014). Portanto, a coevolução patógeno-hospedeiro deve ser considerada pelo grupo de fitopatologistas e melhoristas, e fontes de resistência precisam ser exploradas na identificação e incorporação em materiais comerciais, buscando inserir essas estratégias de manejo para maior durabilidade da resistência no campo.

## 4. Referências bibliográficas

- ADHIKARI, S. et al. Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. **Nucleus**, v. 60, p. 283-297, 2017.
- AGARWAL, G. et al. High-density genetic map using whole-genome resequencing for fine mapping and candidate gene discovery for disease resistance in peanut. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, p. 1954-1967, 2018.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Marker assisted selection in the development of disease resistant plants, with emphasis on common bean and soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 333-342, 2005.
- AMARO, G.B.; ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P.; SILVA, F.B. Phenotypic recurrent selection in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with carioca-type grains for resistance to the fungi *Phaeoisariopsis griseola*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 584-588, 2007.
- ARANTES, L.O.; ABREU, A.F.B.; RAMALHO, M.A.P. Eight cycles of recurrent selection for resistance to angular leaf spot in common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 232-237, 2010.
- AZZIMONT, G.; LANNOU, C.; SACHE, I.; GOYEAU, H. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. **Plant Pathology**, v. 62, p. 970-981, 2013.
- BATISTA, R.O. et al. Inheritance of resistance to fusarium wilt in common bean. **Euphytica**, v. 213, p. 133-144, 2017.
- BRANHAM, S.E. et al. QTL mapping of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 and Papaya ringspot virus in *Citrullus amarus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, p. 677-687, 2020.
- BOREM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.
- CAMARGO, L.E.A. Controle genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A. (eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 2011. p. 325-341.
- CAIXETA, E.T.; ZAMBOLIM, E.M. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS-JÚNIOR, W.C.; RODRIGUES, F.A. (eds.). **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2014. p. 553-576.
- CHENG, L. et al. High-density SNP genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping for resistance to cucumber mosaic virus in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **The Crop Journal**, v. 7, n. 4, p. 539-547, 2019.
- CRITTENDEN, L.B. et al. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn backcross reference population for molecular mapping of the chicken genome. **Poultry Science**, v. 72, n. 2, p. 334-348, 1993.

- CORWIN, J.A.; KLIEBENSTEIN, D.J. Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. **The Plant Cell**, v. 29, p. 655-665, 2017.
- COSTA, J. G. C. et al. BRS 7762 Supremo – a black common bean cultivar with erect plant type. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, p. 182-184, 2006.
- COSTA, R.V.; ZAMBOLIM, L.; SILVA, D.D.; COTA, L.V.; CASELA, C.R. Utilização de multilinhas dinâmicas para o manejo da antracnose do sorgo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 173-180, 2012.
- DÍAZ-LAGO, J.E.; STUTHMAN, D.D.; ABADIE, T.E. Recurrent selection for partial resistance to crown rust in oat. **Crop Science**, v. 42, p. 1475-1482, 2002.
- DODIA, S.M. et al. Genotyping-by-sequencing based genetic mapping reveals large number of epistatic interactions for stem rot resistance in groundnut. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, p. 1001–1016, 2019.
- DRAKE-STOWE, K. et al. Multiple disease resistance loci affect soilborne disease resistance in tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Phytopathology**, v. 107, p. 1055-1061, 2017.
- FEHR, W.R. Principles of cultivar development. Vol. 1 – theory and technique. Macmillian Publishing Company, New York, NY, 1987.
- FARIA, L.C. et al. ‘BRS Radiante’ – sugar common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, p. 307-310, 2003.
- FARIA, L. C. et al. ‘BRS Requite’: new common bean Carioca cultivar with delayed grain darkness. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 366-368, 2004.
- FERREIRA, L.U. et al. Combining ability as a strategy for selecting common bean parents and populations resistant to white mold. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 276-283, 2018.
- GARRIDO-CARDENAS, J.A.; MESA-VALLE, C.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Trends in plant research using molecular markers. **Planta**, v. 247, p. 543–557, 2018.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M.C. et al. New Andean source of resistance to anthracnose and angular leaf spot: Fine-mapping of disease-resistance genes in California Dark Red Kidney common bean cultivar **Plos One**, v. 15, n. 6, p. e0235215, 2020.
- 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.
- HUANG, X.; HAN, B. Natural Variations and Genome-Wide Association Studies in Crop Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 531–551, 2014.
- JAIN, P. et al. Deciphering signalling network in broad spectrum Near Isogenic Lines of rice resistant to *Magnaporthe oryzae*. **Scientifica report**, v. 9, p. 16939, 2019.
- JENA, K.K.; HECHANOVA, S.L.; VERDEPRADO, H.; PRAHALADA G.D.; KIM, S.R. Development of 25 near-isogenic lines (NILs) with ten BPH resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.): production, resistance spectrum, and molecular analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, p. 2345–2360, 2017.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006.
- KARHOFF, S. et al. Phenotypic characterization of a major quantitative disease resistance locus for partial resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, v. 59, p. 968–980, 2019.
- KAWASHIMA et al. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 661-665, 2016.

- KIM, S.M.; REINKE, R.F. A novel resistance gene for bacterial blight in rice, Xa43(t) identified by GWAS, confirmed by QTL mapping using a bi-parental population. **Plos One**, v. 14, n. 2, p. e0211775, 2019.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.
- LEWIS, R.S.; KERNODLE, S.P. A method for accelerated trait conversion in plant breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, v.118, p. 1499-1508, 2009.
- LIN, H. et al. QTLs and candidate genes for downy mildew resistance conferred by interspecific grape (*V. vinifera* L. × *V. amurensis* Rupr.) crossing. **Scientia Horticulturae**, v. 244, p. 200-207, 2019.
- LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611p.
- MAROOOF, M.A.S. et al. Pyramiding of soybean mosaic virus resistance genes by marker-assisted selection. **Crop Science**, v. 48, p. 517-526, 2008.
- MCDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MCDONALD, B.A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 191-196, 2014.
- MEUWISSEN, T.H.E.; HAYES, B.J.; GODDARD, M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, p. 1819-1829, 2001.
- MUNDT, C.C. Pyramiding for resistance durability: theory and practice. **Phytopathology**, v. 108, p. 792-802, 2018.
- NEELAM, K. et al. High-resolution genetic mapping of a novel bacterial blight resistance gene xa-45(t) identified from *Oryza glaberrima* and transferred to *Oryza sativa*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 133, p. 689-705, 2020.
- NVSVROT, T. et al. Combining QTL Mapping with Genome Resequencing Identifies an Indel in an R Gene that is Associated with Variation in Leaf Rust Disease Resistance in Poplar. **Phytopathology**, v. 110, 900-906, 2020.
- PANDEY, M.K. et al. Genetic dissection of novel QTLs for resistance to leaf spots and tomato spotted wilt virus in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Front Plant Science**, v. 8, p. 25, 2017.
- PELOSO, M.J.D. et al. 'BRS Valente' – black common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, p. 311-314, 2003.
- PELOSO, M.J.D. et al. 'BRS – Pontal': new common bean cultivar with Carioca grain type. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 369-371, 2004.
- PRIYADARSHAN, P.M. Backcross Breeding. In: *Plant Breeding: Classical to Modern*. Springer, Singapore, 2019.
- PUKALENTHY, B. et al. Incorporation of opaque-2 into 'UMI 1200', an elite maize inbred line, through marker-assisted backcross breeding. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.33, n. 1, p. 144-153, 2019.
- PURCELL, S.; CHERNY, S.S.; SHAM, P. C. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. **Bioinformatics**, v. 19, p. 149-150, 2003.
- RABOIN, L.M. et al. Two-component cultivar mixtures reduce rice blast epidemics in an upland agrosystem. **Plant Pathology**, v. 61, p. 1103-1111, 2012.

- RAJPUROHIT, D. et al. Pyramiding of two bacterial blight resistance and a semidwarfing gene in Type 3 Basmati using marker-assisted selection. **Euphytica**, v. 178, p. 111-126, 2011.
- RESENDE, M.D.V. **Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no Melhoramento Genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 561 p.
- SAPKOTA, S. et al. Genetic mapping of a major gene for leaf rust resistance in soft red winter wheat cultivar AGS 2000. **Molecular Breeding**, v.39, A. 8, 2019.
- SAVADI, S.; PRASAD, P.; KASHYAP, P. L.; BHARDWAJ, S.C. Molecular breeding technologies and strategies for rust resistance in wheat (*Triticum aestivum*) for sustained food security. **Plant Pathology**, v. 67, p. 771-791, 2017.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV, 2004. 568p.
- SCOTT, M.F. et al. Multi-parent populations in crops: a toolbox integrating genomics and genetic mapping with breeding. **Heredity**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0336->
- SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 2569-2587, 2006.
- SILVA, L.C. **Caracterização fenotípica de RIL's de feijão derivadas da população Rudá x And 277**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 2017.
- SHEN, F. et al. Mapping gene markers for apple fruit ring rot disease resistance using a multi-omics approach. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1663-1678, 2019.
- SILVA, D.D. et al. Genotype rotation for leaf anthracnose disease management in sorghum. **Crop Protection**, v. 67, p. 145-150, 2015.
- SING, S.P. Alternative methods to backcross breeding. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, v. 25, p. 11-12. 1982.
- THABUIS, A. et al. Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 342-351, 2004.
- WEN, A. et al. Genetic mapping of a major gene in triticale conferring resistance to bacterial leaf streak. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, p. 649-658, 2018.
- XU, Y.; LI, P.; YANG, Z.; XU, C. Genetic mapping of quantitative trait loci in crops. **The Crop Journal**, v. 5, p. 175-184, 2017.
- YAMANAKA, N. et al. Multiple Rpp-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 283-290, 2015.
- YANG, J.; LEE, S. H.; GODDARD, M. E.; VISCHER, P. M. GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. **The American Journal of Human Genetics**, v.88, n.1, p. 76-82, 2011.
- YANG, Y. et al. Identification of blast resistance genes in 358 rice germplasms (*Oryza sativa* L.) using functional molecular markers. **European Journal Plant Pathology**, v. 148, p. 567-576, 2017.
- ZHU, Y. et al. Genetic diversity and disease control in rice. **Nature**, v. 406, p. 718-722, 2000.
- ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **Plant Genome**, v. 1, p. 5-20, 2008.



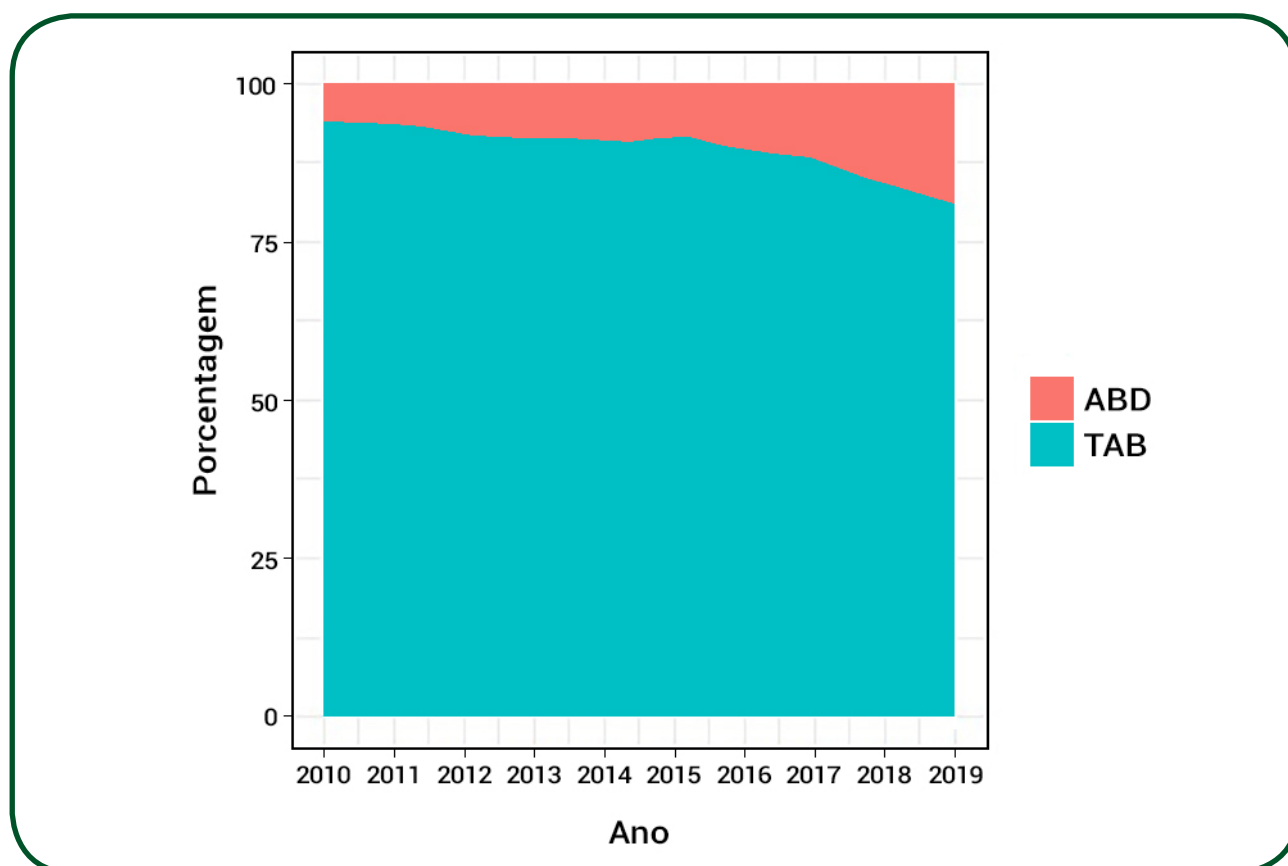
Glauber Henrique de Sousa Nunes  
Roberta Rocha Ferreira  
Eláine Welk Lopes Pereira Nunes  
Adriano Ferreira Martins

## 1. Introdução

Toda e qualquer cultivar, mesmo com elevada produtividade e qualidade de produção, pode ser afetada por estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses bióticos, aqueles provocados por patógenos de diversas naturezas são responsáveis, historicamente, pela redução de produtividades em lavouras de todas as partes do mundo. Em casos mais extremos, a perda no rendimento pode ser total. Um dos casos mais dramáticos da humanidade ocorreu no período de 1845 a 1849 na Irlanda. Nessa ocasião houve uma redução de 80% da produção de batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) ocasionada pelo fungo oomiceto *Phytophthora infestans*, agente causal da requeima da batata. A doença trouxe consequências como a redução da população do país e a imigração de um grande contingente de irlandeses, em especial para os Estados Unidos e Canadá. No Brasil, também há exemplos de doenças causadas por agentes de diversas natureza como fungos, bactérias, vírus e nematoides, que acarretaram muitos prejuízos a agricultura nacional, tais como a tristeza dos citros, ferrugem asiática da soja, vassoura de bruxa no cacauzeiro, mancha-aquosa em meloeiro, nematoides de galhas em frutíferas, dentre outras.

Uma das alternativas para o controle de patógenos é o uso de cultivares resistentes. Os programas de melhoramento genético de uma determinada espécie utilizam, basicamente, os conceitos da genética e métodos tradicionais para promover a seleção e obtenção dos cultivares resistentes aos principais patógenos das culturas. No entanto, nas últimas décadas, tem sido observada a aplicação cada vez maior de técnicas biotecnológicas que permitem melhor eficiência em termos de tempo, recursos e resultados. Em algumas situações, quando há ausência de alelos que conferem resistência à determinados patógenos, apenas o uso de ferramentas biotecnológicas pode gerar cultivares resistentes.

O avanço do melhoramento genético e o aumento da produtividade e qualidade dos produtos passam pelo desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas. Uma das fortes evidências está no incremento do número de cultivares geneticamente modificadas nas últimas duas décadas. Mais especificamente no fitomelhoramento voltado ao combate de patógenos, também há uma ampliação nos esforços científicos envolvendo técnicas biotecnológicas. Isso pode ser visualizado na Figura 1. Percebe-se uma tendência de aumento do número de artigos científicos que abordam alguma ferramenta biotecnológica em atividades de melhoramento visando resistência a patógenos nos últimos dez anos.



**Figura 1.** Porcentagem de trabalhos publicados com biotecnologia na Web of Science que abordam o tema resistência de plantas a patógenos (ABD) em relação ao total de artigos publicados (TAB) com biotecnologia no período de 2010 a 2019. Fonte: Web of Science.

Feitas essas considerações, o presente capítulo abordará, sucintamente, algumas técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento genético visando a obtenção de cultivares resistentes a patógenos.

## 2. Conceitos

O melhoramento genético pode ser definido como a arte e ciência, com métodos definidos, para exploração do potencial de plantas em benefício da humanidade. São muitos os objetivos dos programas de melhoramento genético como aumento de produtividade, qualidade nutricional, biofortificação, aumento pós-colheita, tolerância a estresses abióticos como salinidade, déficit hídrico e eficiência do uso de nutrientes como fósforo e nitrogênio. Além dos referidos objetivos, um dos principais intentos dos melhoristas é a obtenção de cultivares resistentes aos principais patógenos.

A Biotecnologia é definida pela Organização das Nações Unidas (ONU) como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica (ONU, Convenção de Biodiversidade 1992, Art. 2). No contexto do melhoramento de plantas a biotecnologia envolve métodos e técnicas que visam a seleção e a obtenção de novas cultivares.

### 3. Melhoramento Genético para Doenças

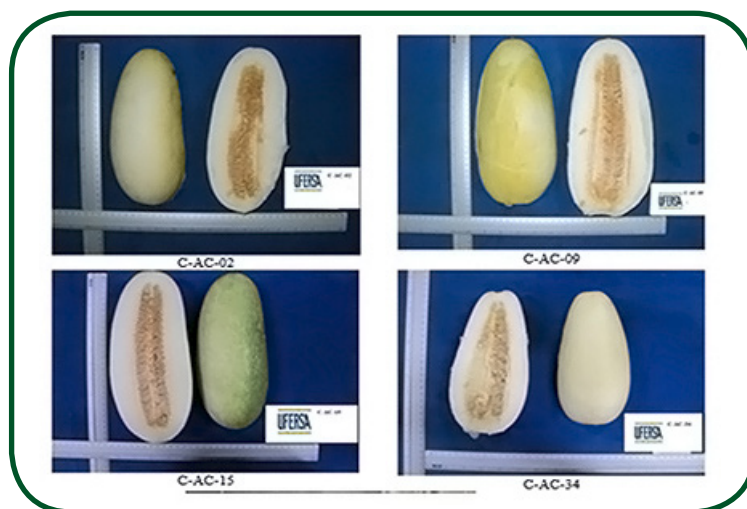
O melhoramento genético para patógenos é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético em qualquer cultura. O uso de cultivares resistentes à patógenos tem uma série de vantagens como a facilidade de uso pelo produtor, segurança ambiental e complementariedade com os outros métodos de controle. No que concerne ao aspecto ambiental ressalta-se que o uso de cultivares resistentes reduz a aplicação de defensivos o que proporciona redução dos custos de produção. Além disso, com a pressão cada vez maior por parte dos consumidores, a demanda por produtos com a menor quantidade de resíduos tem se ampliado, em especial do mercado externo. Ressalta-se que em algumas situações o controle de importantes patógenos só é feito através da utilização de cultivares resistentes.

O melhoramento genético visando obter cultivares resistentes contempla quatro etapas básicas: 3.1) identificação de fontes de resistência, 3.2) estudo a herança da resistência e introgressão ou acúmulo dos alelos de resistência e 3.3) avaliação dos candidatos a cultivares em diferentes condições edafoclimáticas da região de cultivo. Outro aspecto que merece destaque é qual estratégia deve ser utilizada para tornar a resistência mais durável.

#### 3.1. Identificação de fontes de resistência

Um dos primeiros esforços por parte do melhorista é a identificação de fontes de resistência para determinado patógeno no germoplasma disponível da cultura. O questionamento inicial está relacionado à qual tipo de fonte de resistência mais adequada. Considerando que o novo cultivar, além de resistente, precisa ter outras características importantes como produtividade e qualidade do produto, as fontes ideais seriam as cultivares comerciais resistentes. Na ausência desse tipo de fonte, seria interessante prospectar alelos de resistência em variedades crioulas (*landraces*) mantidas por pequenos agricultores (Nunes et al., 2017).

Ressalta-se que esse tipo de germoplasma geralmente não apresenta grande potencial produtivo e reduzida qualidade ambiental. Um exemplo pode ser citado em algumas fontes de resistência ao fungo *Podosphaera xanthii*, agente causal do oídio no meloeiro. As principais fontes pertencem ao grupo botânico *momordica*, original da Índia. Esse tipo de melão tem baixo teor de sólidos solúveis, baixa conservação pós-colheita e frutos que “explodem” quando maduros (Figura 2).



**Figura 2.** Acessos de melão *momordica* resistente à diferentes raças de *Podosphaera xanthii*. (Adaptado de Nunes et al., 2017)

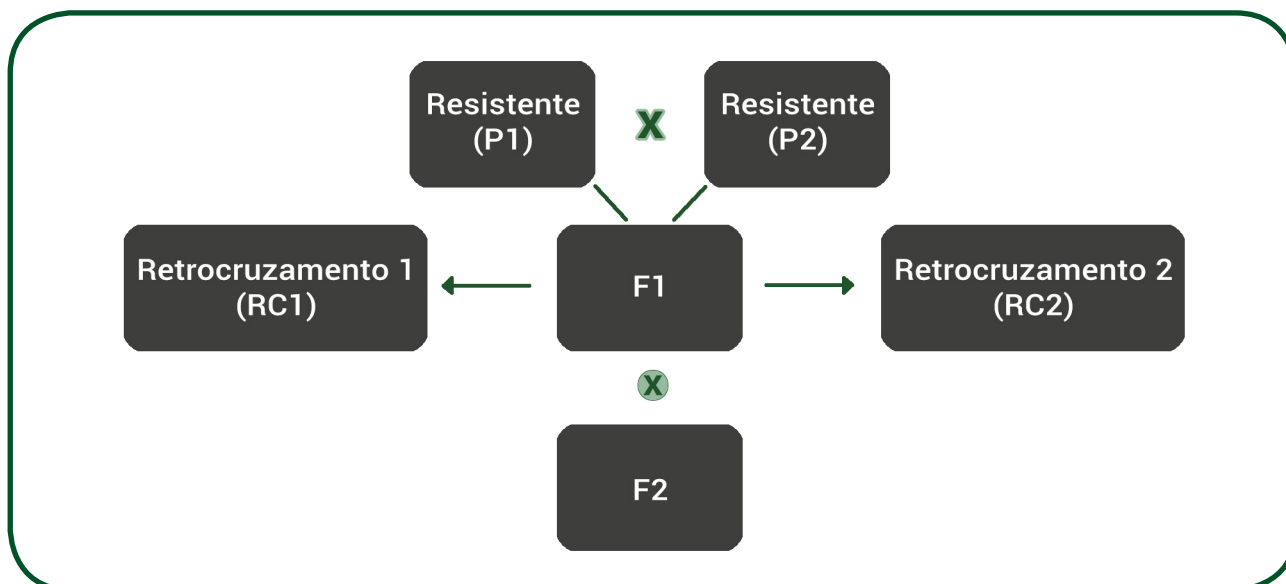
Quando não há fontes de resistência no germoplasma da espécie alvo, os pesquisadores utilizam genes de espécies aparentadas ou silvestres e os incorporam em *backgrounds* da espécie de interesse através de cruzamento interespecífico (Ferreira & Rangel, 2011). Essa prática é muito comum em espécies de tomate (Hanson et al., 2000; Ji et al., 2009), trigo, cevada e centeio (Feuillet et al., 2008), dentre outras. Técnicas biotecnológicas envolvendo cultura de tecidos podem ser utilizadas para permitir a produção de híbridos e a geração de populações segregantes para seleção em etapas subsequentes do programa (Item 5.3 deste capítulo).

## 3.2. Conhecimento da herança da resistência e Introgresão ou acúmulo dos alelos de resistência

Uma vez identificado a fonte de resistência é de fundamental importância obter informações sobre a herança da resistência uma vez que o controle genético depende da própria fonte e do cruzamento utilizado em estudos dessa natureza. Estes estudos permitem elucidar sobre o número de genes, interações alélicas, interações gênicas, variância aditiva, herdabilidade e outras. O conhecimento da herança da resistência orienta sobre a melhor estratégia que deve ser utilizada pelo melhorista para introgresão ou acúmulo dos alelos de resistência.

Nos estudos de herança geralmente são utilizadas as gerações  $F_1$ ,  $F_2$  e dois retrocruzamentos oriundas de pais contrastantes (resistente e suscetível) (Figura 2). A herança da resistência pode ser qualitativa ou quantitativa. Na herança qualitativa, quando estão envolvidos um ou poucos genes, há um pequeno efeito ambiental. Nesse tipo herança, geralmente, está envolvida a resistência vertical. A resistência vertical é raça específica, ou seja, os cultivares possuem uma reação diferencial em relação às raças dos patógenos. Esse tipo de resistência está associado ao modelo gene-a-gene descrito por Flor, em 1956, com seus estudos com a ferrugem do linho (Flor, 1956). Do ponto de vista epidemiológico, a resistência vertical é caracterizada pela redução do inóculo inicial e retardamento da doença.

A herança da resistência quantitativa é controlada por vários genes de pequeno efeito e com elevada influência ambiental. A resistência com esse controle genético é denominada de resistência horizontal. A resistência horizontal está associada à redução da taxa de progresso da doença. O uso de marcadores moleculares de DNA podem ser utilizados para o mapeamento de genes de efeito maior (major gene) ou de genes de efeitos associados a caracteres de herança quantitativa (Item 5.1.1. deste capítulo).



**Figura 3.** Gerações geralmente utilizadas em estudos de herança de um caráter de interesse.

Uma vez determinada a herança da característica os processos de introgressão e seleção são direcionados para a obtenção dos genótipos com as características de interesse, ou seja, resistentes, produtivos e boa qualidade do produto final. Quando a herança é simples, envolvendo um ou poucos genes, o método mais utilizado é o retrocruzamento, enquanto em heranças mais complexas (quantitativas) o uso de seleção recorrente para aumentar a frequência de alelos favoráveis ao longo dos ciclos de seleção. Seja a herança simples ou complexa, os melhoristas podem e devem utilizar ferramentas biotecnológicas nos programas. O uso da Seleção Assistida por Marcadores (SAM) tem sido utilizado por vários melhoristas no sentido de acelerar o processo seletivo e aumentar a sua eficiência.

### 3.3. Avaliação de cultivares

Uma vez obtidos os genótipos resistentes é preciso que sejam avaliados em vários locais e condições edafoclimáticas representativas da região de cultivo de interesse. Nessa última etapa, os genótipos são avaliados nos denominados Ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU). Nos referidos ensaios, são utilizados cultivares testemunhas para comparações com os genótipos resistentes obtidos no programa. Os ensaios são conduzidos em várias localidades e anos em delineamentos definidos, geralmente em blocos casualizados, com três a quatro repetições no mínimo.

## 4. Variabilidade Patogênica

A variabilidade genética na população do fitopatógeno é um dos aspectos mais importantes em um programa de melhoramento genético. As populações de deter-



minados patógenos são formadas de raças fisiológicas que são variantes do patógeno com diferentes combinações de genes de virulência e, por conseguinte, diferentes capacidades para infectar distintos genótipos da espécie hospedeira (Hosoya et al., 1999). Portanto, a identificação de raças é feita a partir da interação diferencial entre isolados e genótipos do hospedeiro denominado de diferenciadoras. A ocorrência de várias raças fisiológicas é um problema para os programas de melhoramento genético, pois a variação na população do patógeno reduz a durabilidade da resistência presente nas cultivares (Hosoya et al., 2000; Kuzuya et al., 2006). Além disso, muitas técnicas moleculares e genômicas têm sido utilizadas para identificação de novas espécies e detecção de variabilidade dentro das espécies, em especial devido aos avanços da genômica e da bioinformática.

## 5. Técnicas Biotecnológicas Aplicadas no Fitomelhoramento

### 5.1. Marcadores moleculares

Os marcadores genéticos têm sido utilizados desde a década de sessenta em estudos básicos de genética e no melhoramento genético de plantas. Um marcador genético é qualquer diferença fenotípica controlada geneticamente capaz caracterizar e diferenciar um indivíduo. Existem vários tipos de marcadores genéticos como morfológicos, isoenzimáticos, bioquímicos e baseados em DNA. O marcador genético ideal precisa ser polimórfico, codominante, não epistático, neutro e pouco influenciado pelo meio ambiente. Com avanço da genética molecular, os novos tipos de marcadores de DNA obtidos estão mais próximos das características de um marcador ideal e por esse motivo têm sido utilizados pelos pesquisadores e melhoristas.

Atualmente existem vários tipos de marcadores moleculares baseados em diferenças no tamanho e sequência de DNA. Esses marcadores são baseados em diferentes metodologias como hibridização molecular, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético do DNA. Cada marcador molecular tem suas características, vantagens e desvantagens limitações de uso e aplicações específicas. Os principais marcadores utilizados são: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphisms of DNA), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), ISSR (Inter SSR Amplification) e SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms).

O marcador RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) é baseado na hibridização molecular. Para esse marcador, uma sonda, isto é, um pedaço de DNA radioativamente marcado, se hibridiza com pedaços de DNA previamente cortados por enzimas de restrição. O polimorfismo é observado quando há diferenças no comprimento entre os fragmentos complementares à sonda. Um fragmento RFLP pode estar ligado

a um gene de interesse econômico como por exemplo um gene que confere resistência a determinado patógeno. Embora muitos populares no início da era de marcadores de DNA, métodos baseados em hibridação, atualmente, perderam sua importância com advento de marcadores baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR).

A criação revolucionária da reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction) permitiu a visualização de fragmentos específicos de DNA após a sua multiplicação em grande quantidade (Mullis & Falona, 1987). Um fragmento específico é amplificado com o auxílio de iniciadores (primers) curtos de dez nucleotídeos de sequência arbitrária. As diferenças no comprimento dos fragmentos amplificados podem ser utilizadas como marcadores da mesma maneira que é feito com marcadores como RFLP. Os marcadores mais utilizados são RAPD (Random Amplified Polymorphisms of DNA) (Williams et al., 1990), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos et al., 1995) e ISSR (Inter SSR Amplification) (Zietkiewics et al., 1994).

Mais recentemente, com os avanços dos métodos de sequenciamento de DNA foi possível a criação do marcador SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Marcadores SNPs são produzidas por variações resultantes da alteração de uma única base na sequência de DNA entre indivíduos. Não é toda variação nucleotídica que é considerada SNP, mas apenas aquelas cuja variação ocorra em 1% da população para ser considerada com SNP (Fita et al., 2008, Caixeta et al., 2006). A redução do preço dos métodos de sequenciamento genético de alto rendimento tem proporcionado a execução de muitas pesquisas na área de genômica para melhorar a eficiência de seleção em programas de melhoramento de várias espécies.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados em diversas aplicações de pré-melhoramento e de seleção. Aqui serão abordados os usos mais comuns na literatura dentro do contexto de resistência de plantas a patógenos. Os principais usos são na identificação de marcadores associados a genes de resistência, introgressão de alelos e seleção genômica ampla.

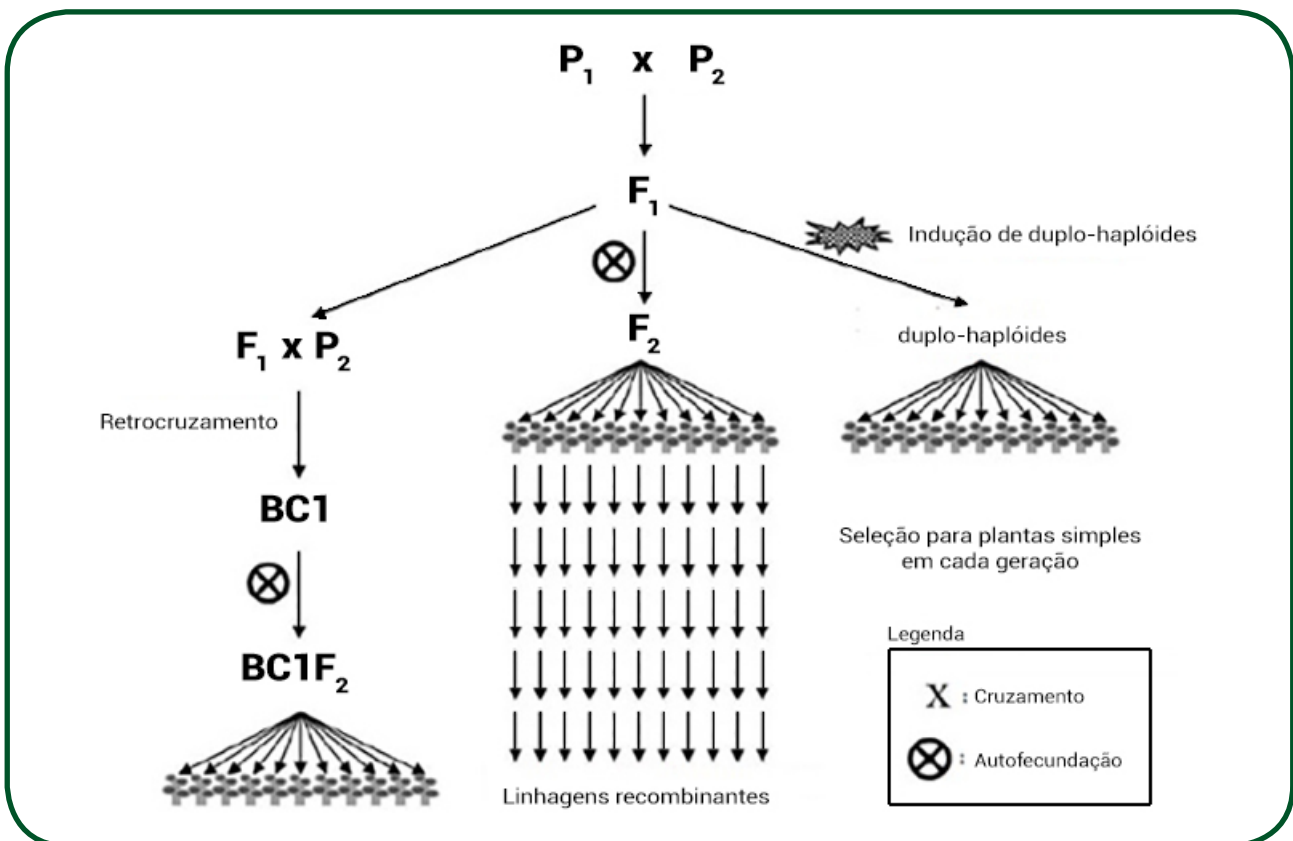
### 5.1.1. Mapas de ligação e Identificação de marcadores ligados a genes de resistência

Um dos principais usos dos marcadores de DNA tem sido na construção de mapas de ligação. O processo de construir mapas de ligação e conduzir análise de QTL para identificar regiões genômicas associadas com caracteres de importância econômica é denominado como mapeamento de QTL. Os mapas de ligação têm sido utilizado para identificar regiões cromossômicas que contêm genes que controlam características simples (controlado por um único gene) e características quantitativas usando QTL. O termo QTL (em inglês Quantitative Trait Loci) corresponde à uma região do genoma relacionada a um caráter de herança quantitativa (Tanksley, 1993, Collard & Mackill, 2008).

Os mapas de ligação indicam a posição e as distâncias genéticas relativas entre marcadores ao longo dos cromossomos. O Mapeamento de QTLs é baseado no princípio que genes e marcadores segregam pela recombinação cromossômica (*crossing-over*) durante a meiose permitindo assim sua análise na descendência. Genes ou mar-

cadres que estão próximos ou fortemente ligados serão transmitidos conjuntamente dos genitores para a descendência em maior frequência do que genes ou marcadores que estão localizados mais distantes ou em cromossomos distintos. Em uma população segregante, existe uma mistura de genótipos parentais e recombinantes. A frequência de genótipos recombinantes podem ser usados para calcular as frações de recombinação que podem ser usadas para inferir a distância genética entre os marcadores. Analisando a população segregante a ordem relativa e as distâncias entre os marcadores podem ser determinadas. Marcadores que têm uma recombinação de frequência de 50% são considerados independentes (Collard et al., 2005).

Um mapa de ligação é construído a partir do cruzamento de genitores contrastantes para um ou mais caracteres de importância. No caso de resistência de plantas, seria um genitor resistente e um suscetível. Uma vez selecionado os genitores contrastantes é obtida a população segregante. Existem vários tipos de populações segregantes utilizadas para em análises de QTLs. As populações mais comuns são  $F_2$ , retrocruzamentos, linhagens recombinantes e linhagens duplo-haplóides (Figura 3). Cada uma dessas populações têm suas vantagens e desvantagens. O uso de populações  $F_2$  e retrocruzamentos tem as vantagens da fácil construção e o menor espaço de tempo requerido, enquanto a principal desvantagem do uso de linhagens recombinantes é o tempo exigido para a sua obtenção que pode ser entre seis a oito gerações. Linhagens duplo-haplóides também poderiam reduzir o tempo para a geração das linhagens. As vantagens das linhagens recombinantes e duplo-haplóides é a possibilidade de avaliar em várias oportunidades e por vários grupos de pesquisa.



**Figura 4.** Principais tipos de populações segregantes utilizadas na análise de QTLs. (Adaptado de Coullard et al., 2005).

A geração de linhas de introgressão também é uma excelente estratégia para estudos de QTLs e introgressão de alelos de interesse em programas de melhoramento modernos. As linhas de introgressão são geradas por sucessivos retrocruzamentos entre um genitor resistente (doador) e o genitor (recorrente). A seleção assistida por marcador (SAM) de linhagens com introgressões do doador-alvo e *background* recorrente é realizada em cada geração. As ferramentas genômicas existentes e o uso de plataformas de genotipagem aumentam muito a eficiência da SAM, reduzindo significativamente o número de gerações de retrocruzamento necessárias para gerar uma coleção de linhas de introgressão (ILs) que possuem introgressões únicas e que representam todo o genoma do doador. Além da introdução de nova variabilidade em safras para fins de reprodução, os ILs também facilitam a detecção de novos QTLs. O uso de linhagens de introgressão tem sido feita várias culturas como melão, tomate, cevada, alface e arroz (Gorka et al., 2016).

### 5.1.2. Seleção assistida por marcadores

Nos programas de melhoramento a seleção para resistência a patógenos é tradicionalmente feita com base no fenótipo. Todavia, esse processo pode ter eficiência reduzida devido a vários fatores como variabilidade do patógeno, método de inoculação e condições ambientais. Além disso, existem dificuldades e custos adicionais relacionadas à conservação dos vários isolados do fungo. Uma alternativa para mitigar os problemas é o uso da Seleção Assistida por Marcadores (SAM).

A SAM é uma forma de seleção indireta onde uma característica de interesse é selecionada com base em um marcador molecular ligado a uma gene de interesse. O princípio fundamental da SAM é a ligação gênica ou desequilíbrio de ligação entre o(s) marcador(s) e os locos envolvidos na herança do caráter. A SAM envolve o uso da informação da presença ou ausência de um marcador como um substituto ou para ajudar na seleção fenotípica. A estratégia SAM pode auxiliar o processo seletivo podendo torná-lo mais eficiente, eficaz, confiável e de baixo custo em comparação com a metodologia de melhoramento de plantas mais convencional (Collard et al., 2005).

A SAM pode ser utilizada tanto para caracteres qualitativos com controle genético simples e pouco influenciados pelo ambiente como para caracteres quantitativos de herança complexa, com vários locos e muito influenciados pelo ambiente. As situações comuns utilizadas no melhoramento para resistência a patógenos envolvem a introgressão de genes em retrocruzamentos, piramidação de genes e seleção genômica (Collard & Mackill, 2008).

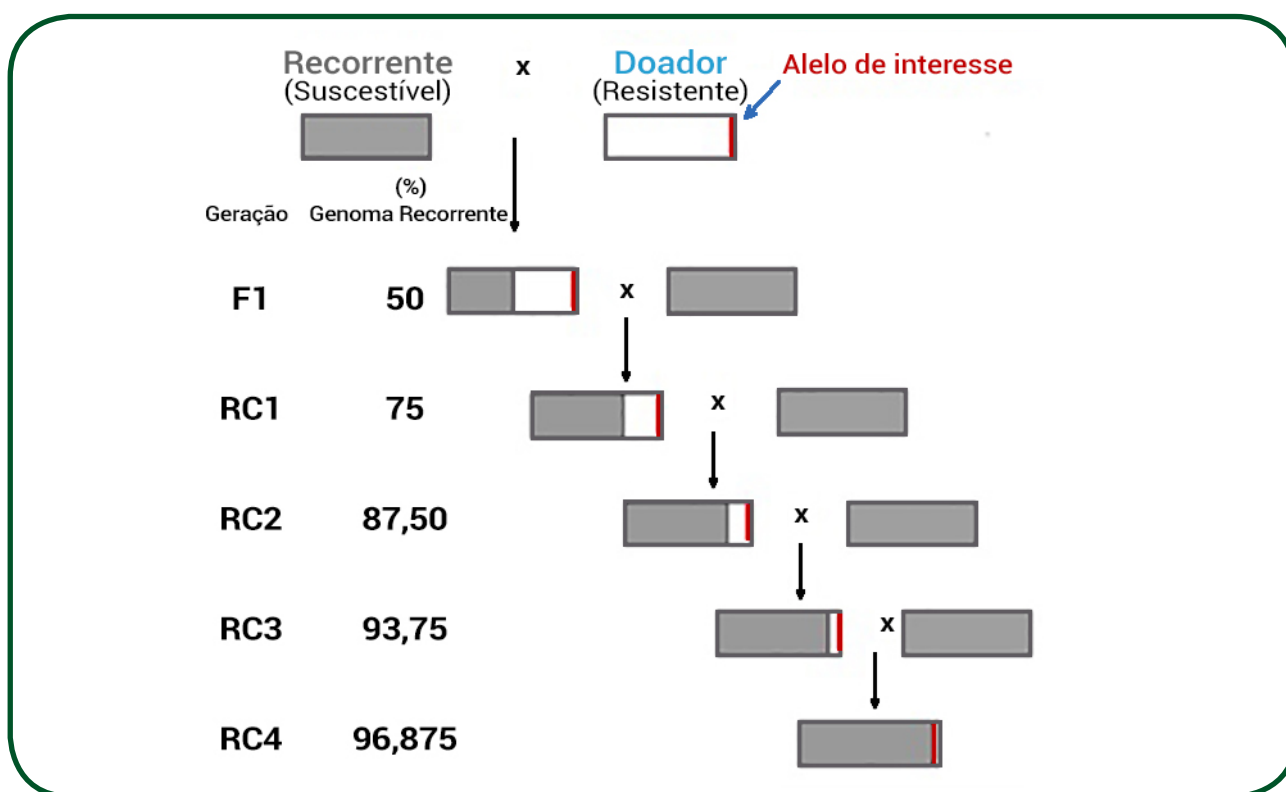
#### 5.1.2.1. A seleção assistida por marcadores em caracteres de fácil controle genético

Em muitas situações os melhoristas possuem um genótipo com boas características agronômicas e outros atributos de interesse, porém suscetível a determinado patógeno. Por outro lado, há um genótipo resistente, mas com baixa produtividade e,

ou, características comerciais não desejáveis. Nesse contexto, o retrocruzamento é um dos métodos mais amplamente empregados no melhoramento genético. Seu objetivo é a introgressão de um ou poucos genes em um genótipo de interesse comercial ou elite.

O genótipo com um ou poucos genes de resistência é denominado de doador enquanto o genótipo em cujo *background* genético será inserido o gene é denominado de recorrente. O único interesse da metodologia é a introgressão do gene ou mesmo um QTL mapeado com precisão que explique uma proporção importante da variação de um caráter. Após a introgressão do gene as ações devem ser focadas na recuperação da maior parte possível do genótipo recorrente com objetivo de manter suas boas características.

A partir de um primeiro cruzamento entre o genótipo recorrente e o genótipo doador se obtém uma planta heterozigota com o gene de interesse e com 50% do genoma de cada parental. O processo se completa com cruzamentos sucessivos com o parental recorrente (Figura 4). Em cada geração se seleciona a planta para cruzar tomando dois critérios: que seja portadora do gene de interesse e que contenha a maior parte do genoma do parental recorrente.



**Figura 5.** Método de retrocruzamento utilizado para introgressão de alelo de resistência.

Neste tipo de programa o emprego de marcadores moleculares pode facilitar a seleção em vários aspectos. Em primeiro lugar, a disponibilidade de um marcador molecular estritamente ligado ao gene que se pretende introduzir evita a necessidade de basear a seleção no fenotipado. Isto supõe uma vantagem para aqueles caracteres com avaliação complexa ou quando a reprodução do fungo é difícil. Uma circunstância de especial interesse é quando o gene de interesse seja recessivo, uma vez que se empregam marcadores codominantes, capazes de detecção de heterozigotos sem necessidade de realizar testes de descendência. A efetividade da seleção neste contexto depende do ligamento entre o gene de interesse e o marcador empregado, dado que unicamente

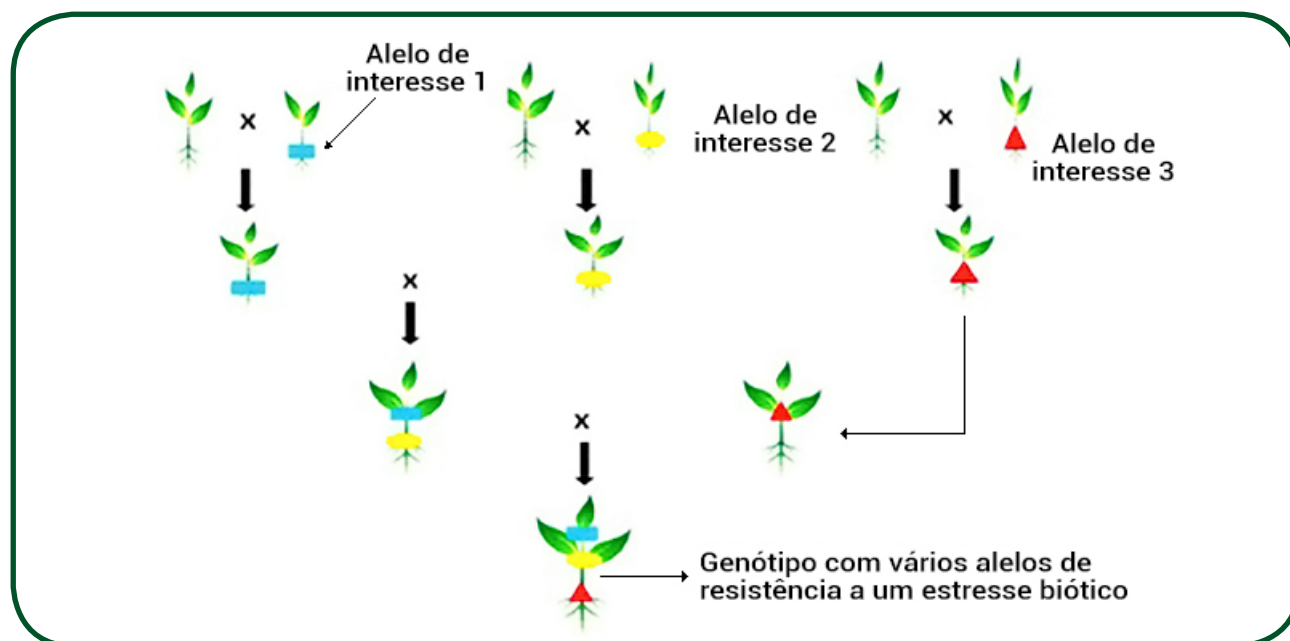


se produzirá um erro no processo se em alguma das gerações se produzir recombinação entre o gene e o marcador. A distância entre o gene de interesse e o marcador deve ser inferior a 1cM para que a probabilidade de recombinação entre eles depois de cinco gerações de retrocruzamentos seja inferior a 0,05.

### 5.1.2.2. Piramidação de genes

A piramidação consiste na acumulação de vários genes de interesse em um único genótipo. O objetivo final do processo de piramidação é a obtenção de um genótipo que combine, em homozigose, os alelos favoráveis para diversos genes. A piramidação de genes é indicada, especialmente, quando se propõe introduzir vários alelos de diferentes genes que conferem resistência às raças de um patógeno a fim de obter resistência durável e de amplo espectro (Servin et al., 2004).

A piramidação de genes baseia-se geralmente em cruzamentos, retrocruzamentos e cruzamentos de testes entre as linhas portadoras dos genes para introgressão no genótipo de interesse, sendo necessário selecionar em gerações segregantes aquelas plantas portadoras dos alelos de interesse para cada um dos genes incluídos no programa. O passo final somente consiste na fixação em homozigose dos alelos de interesse (Figura 5).



**Figura 6.** Processo de piramidação de três alelos de resistência a um patógeno em um genótipo. (Adaptado de Dormatey et al., 2020).

É possível executar a piramidação de genes mediante melhoramento convencional, realizando a seleção a partir de análise fenotípica. Todavia, a utilização de marcadores moleculares auxilia na otimização do tempo e dos recursos dedicados. Ressalta-se que marcadores moleculares é uma ferramenta que acelera e facilita o processo da piramidação de genes, todavia não exclui as técnicas convencionais de melhoramento, sendo, portanto, imprescindível a complementaridade entre as técnicas de melhoramento clássico e as ferramentas biotecnológicas.

A principal vantagem do uso de marcadores está nas situações nas quais o interesse é a introgressão de vários genes que afetam a um mesmo caráter. Nesse caso, a fenotipagem não permite distinguir entre os indivíduos portadores do alelo de interesse para um único gene daqueles que contém alelos favoráveis para mais de um dos genes a introduzir. Uma segunda vantagem é evitar a necessidade de fenotipar os indivíduos para cada uma das características de interesse. Assim sendo, se o método de fenotipagem é destrutivo, seria necessário dispor de descendência de cada planta previamente à sua destruição. Por outro lado, se o fenotipado para mais de um caráter é destrutivo, em determinados casos não seria possível analisar por cada indivíduo para todos os caracteres. Porém, no caso de caracteres dominantes o fenotipado não permite distinguir os indivíduos homozigotos para o alelo de interesse dos heterozigotos, enquanto mediante a utilização de marcadores codominantes é possível esta distinção.

A utilização de marcadores moleculares para a piramidação de genes tem sido explorada em culturas como batata, algodão, trigo, arroz e outras de importância econômica (Dormatey et al., 2020).

### 5.1.2.3. Seleção genômica ampla

Nas aplicações descritas nos itens **5.1.2.1** e **5.1.2.2**, o passo prévio da aplicação de SAM consiste na determinação dos marcadores empregados no processo seletivo, isto é, a determinação dos marcadores moleculares associados a regiões do genoma com efeito sobre o fenótipo. Em um artigo publicado no início do presente século, Meuwissen et al. (2001) apresentaram a seleção genômica (Genome Wide Selection - GWS) que consiste na predição simultânea, sem o uso de testes de significância para marcas individuais, dos efeitos genéticos de grande número de marcadores genéticos dispersos em todo o genoma de um organismo, de forma a capturar os efeitos de todos os locos, de pequenos e grandes efeitos, e explicar grande parte da variação genética de um caráter quantitativo (Collard & Mackill, 2008).

A aplicação de seleção genômica ampla exige informações de um conjunto de indivíduos fenotipados para o caráter ou caracteres de interesse e de que disponha da informação a nível de genótipo para todos os marcadores a empregar no programa. Esta é uma população de referência e permitirá estimar os parâmetros do modelo. Este modelo tratará de explicar as diferenças a nível de fenótipo em função exclusivamente de marcadores moleculares analisados e será empregado na população de melhoramento para estimar o valor genômico dos indivíduos. Por simulação realizada em experimentos em milho, foi observada a superioridade entre 18 e 43% da resposta a seleção empregando a seleção genômica frente ao emprego de seleção recorrente mediante marcadores moleculares (Bernardo & Yu, 2007; 2009).

A vantagem do emprego da seleção genômica ampla é que o modelo inclui informações de todos os marcadores disponíveis, isto é, não é necessário determinar os marcadores que estão relacionados com um caráter (Meuwissen & Goddard, 2010). O principal requisito para executar este tipo de análise é dispor de marcadores suficientes para conseguir uma boa cobertura do genoma, de forma que se possa assumir que todos os QTLs envolvidos em um caráter estejam em desequilíbrio de ligamento com

um marcador ou haplótipo de marcadores. O avanço e a redução do valor das técnicas de sequenciamento de alto rendimento e o incremento dos marcadores SNPs têm permitido o uso cada vez maior da seleção genômica ampla pelos pesquisadores.

## 5.2. Engenharia genética

O uso da engenharia genética permite a obtenção de cultivares com novas características que não seriam possíveis utilizando métodos convencionais de melhoramento e, ou, o próprio germoplasma da espécie a ser melhorada. Assim sendo, a engenharia genética é um dos grandes avanços científicos e tecnológicos que permite a introdução controlada de um gene ou fragmento de DNA exógeno no genoma de uma célula receptora e sua posterior expressão (Diouf, 2003). Organismos submetidos a essa tecnologia são denominados de organismos geneticamente modificados (OGM). Na área vegetal, plantas resultantes desse processo são denominadas plantas transgênicas.

O tomate Flavr-Savr (*Solanum lycopersicum* L.), lançado em 1996 nos Estados Unidos da América, foi o primeiro produto transgênico comercializado no mundo. O referido tomate, obtido via tecnologia do DNA recombinante pela empresa Colgene, possuía maior vida pós-colheita. Atualmente, muitos outros produtos transgênicos têm sido gerados e estão disponíveis no mercado. Além disso, constata-se aumento significativo de áreas plantadas com cultivares transgênicos em países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá, bem como na América do Sul, como Brasil e Argentina, em especial, com grandes culturas como milho, soja e algodão.

A obtenção de plantas transgênicas requer uma série de atividades como: a) identificação, clonagem e isolamento de sequências de genes de interesse; b) construção gênica, integração do gene no genoma de interesse e seleção das plantas transformadas.

Um dos principais desafios na geração de plantas transgênicas é a identificação e o isolamento de genes de interesse na agricultura. A identificação dos genes de interesse é feita por homologia a partir da sequência de aminoácidos que compõe a proteína relacionada ao gene de interesse. Nesse sentido, vários softwares de sequenciamento de genomas de espécies têm sido gerados com o intuito de identificar genes de interesse.

A clonagem gênica consiste basicamente em introduzir o gene dentro de células bacterianas e isolá-las em colônias. Ressalta-se que são necessárias modificações anteriores ao processo de clonagem em vetores adequados. Para isso, utilizam-se técnicas de manipulação de DNA com as enzimas de restrição e DNA ligases que permitem cortar o DNA de diferentes origens e, por meio da união dos fragmentos resultantes gerar moléculas novas, denominadas de DNA recombinante. O gene obtido, geralmente, possui uma sequência promotora, o gene de interesse, uma sequência terminadora e um gene marcador de seleção. Todos esses componentes possuem funções bem definidas. O promotor é necessário para a correta expressão do gene, a sequência terminadora para finalizar o processo de transcrição do gene, enquanto o marcador de seleção, geralmente um gene de resistência a antibióticos ou a herbicidas, auxilia na seleção das células transformadas (Andrade, 2003, Fita et al., 2008).

Uma vez definida a construção gênica, o passo seguinte é a sua introgressão no genoma a ser transformado. Existem duas categorias de métodos de transformação,

quais sejam, transformação indireta por vetores e transformação direta. Com relação ao método indireto existem duas espécies do gênero *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*) capazes de transferir parte de seu material genético para o genoma de vegetais. A maior parte das transformações genéticas pelo método indireto são feitas com base na patogenicidade da *Agrobacterium tumefaciens*. A referida bactéria é o agente causal da galha-da-coroa, doença que se caracteriza pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz (coroa). A formação desses tumores é o resultado de um processo natural de transferência de genes contidos em uma região específica do plasmídeo Ti (*tumor inducing*), denominada T-DNA (*transferred DNA*) (Andrade, 2003).

Dentre os métodos diretos de transformação, o mais comum é a biobalística, descrita por Klein et al. (1987) e Sanford et al. (1987). Esse sistema consiste em quebrar a barreira da parede celular e da membrana plasmática para a livre penetração do DNA na célula. É feito bombardeando células ou tecidos vegetais intactos com microprojéteis de um material inerte recoberto com DNA que se quer transferir. Os microprojéteis de ouro ou tungstênio são impulsionados, em alta velocidade (> 400 m/s), por um aparelho denominado acelerador de partículas ou bombardeador. Há outros métodos diretos como a eletroporação e microinjeção de DNA (Fita et al., 2008; Picó & Díez, 2009).

Convém ressaltar que somente um pequeno número de células-alvo recebem e integram de forma estável o DNA exógeno, sendo necessário o uso de um eficiente sistema de seleção e regeneração para recuperação das células transformadas. Portanto, o passo seguinte é regenerar plantas transformadas inteiras a partir de poucas células transformadas por meio do cultivo *in vitro*. Uma vez regeneradas plantas transgênicas, deve-se comprovar que o gene integrado se expressa corretamente e que possui uma herança mendeliana.

A transformação genética é uma ferramenta extraordinária que tem sido utilizada para introduzir nova variação e possui um grande espectro de utilidades no melhoramento genético. O aperfeiçoamento de técnicas de engenharia genética tem promovido avanços significativos na obtenção de cultivares transgênicos com resistência à patógenos (Dong & Ronald, 2019).

### 5.3. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais consiste na manutenção, propagação e regeneração de certas partes da planta (células ou tecidos) em um ambiente livre de microrganismos (assépticas) e em condições controladas (*in vitro*) com o uso de elementos necessários e, ou, essenciais ao crescimento de tecidos. Dentre os elementos necessários e, ou, essenciais, definidos em protocolos específicos, para cada cultura, podem ser citados hormônios, vitaminas, carboidratos e sais minerais (Burruezo et al., 2009). A cultura de tecidos é fundamentada no princípio da totipotência, enunciado no começo do século passado (1902) pelo fisiologista alemão Haberland. Segundo esse princípio, cada célula vegetal possui potencial genético para reproduzir um organismo completo.

A cultura de tecidos é uma das áreas da biotecnologia de maior êxito no melhoramento genético. As técnicas de culturas de tecidos permitem a ampliação da variabilidade (variação somaclonal). Durante o cultivo *in vitro* aparecem formas variantes.

Este tipo de variação é denominado de somaclonal. A variação somaclonal tem sido observada e utilizada por melhoristas, especialmente, para culturas ornamentais e frutíferas (Fita et al., 2008).

A cultura de tecido pode ser útil em cruzamentos interespecíficos para introdução de genes de espécies próximas não presentes no germoplasma da espécie alvo (polinização e fertilização *in vitro*, resgate de embriões e fusão de protoplastos). Muitas vezes não é possível o cruzamento entre espécies relacionadas devido a incapacidade do pólen de germinar sobre o estigma ou mesmo pela incapacidade do tubo polínico alcançar o óvulo. Nessas situações, é recomendado o uso da polinização *in vitro* para superar a incompatibilidade pré-fertilização ou autoincompatibilidade dentro da espécie. Por outro lado, quando não há incompatibilidade pré-zigótica, isto é, quando o pólen é capaz de germinar e fecundar o óvulo, mas ocorre aborto do embrião, recomenda-se a técnica de resgate de embriões imaturos. Nesta técnica, os embriões imaturos são extraídos das sementes em desenvolvimento cujo embriões são viáveis. Os embriões resgatados são cultivados em meios de cultivos adequados para a regeneração dos híbridos (Picó & Díez, 2009).

O protoplasto é uma célula vegetal desprovida da parede celular que apresenta uma forma globosa em meio líquido. A fusão somática entre protoplasma de espécies relacionadas permite a geração de híbridos interespecíficos que seriam impossíveis por via sexual. Com efeito, a fusão de protoplastos permite a superação de barreiras que impedem a transferência de material genético por cruzamento sexual entre espécies relacionadas. Para a formação da célula híbrida são utilizados métodos especiais (químicos e físicos) para permitir o contato e fusão dos protoplastos. A hibridação somática pode ser simétrica ou assimétrica. A primeira consiste na obtenção de indivíduos com todo material das duas espécies, isto é, híbridos interespecíficos com o genoma das duas espécies. Na hibridação assimétrica ocorre a fragmentação dos cromossomos de um dos genitores, resultando na formação de um indivíduo com toda a informação de uma espécie e apenas parte da outra.

A cultura de tecido também permite a redução do tempo de melhoramento (culturas de anteras e pólen e produção de duplo-haploides). O cultivo de pólen e anteras *in vitro* permite regenerar indivíduos haploides de espécies de interesse econômico. Os indivíduos haploides, a princípio, não possuem utilidade prática uma vez que os haploides são estéreis por não produzirem gametas viáveis em razão da ausência de cromossomos homólogos na meiose. Todavia, a aplicação de tratamento químico como a colchicina impede a formação do fuso mitótico durante a meiose e pode levar a duplicação cromossômica, gerando indivíduos duplo-haploides. Portanto, a principal aplicação do cultivo de pólen e anteras *in vitro* é a geração de linhagens homozigotas em apenas uma geração. Esta aplicação reduz o tempo de desenvolvimento de novos cultivares. Essa técnica foi utilizada com sucesso em culturas como melão (Iban & Monforte, 2005), milho (Prigge & Melchinger, 2012), *Capsicum* spp. (Sanchez et al., 2020), dentre outras.

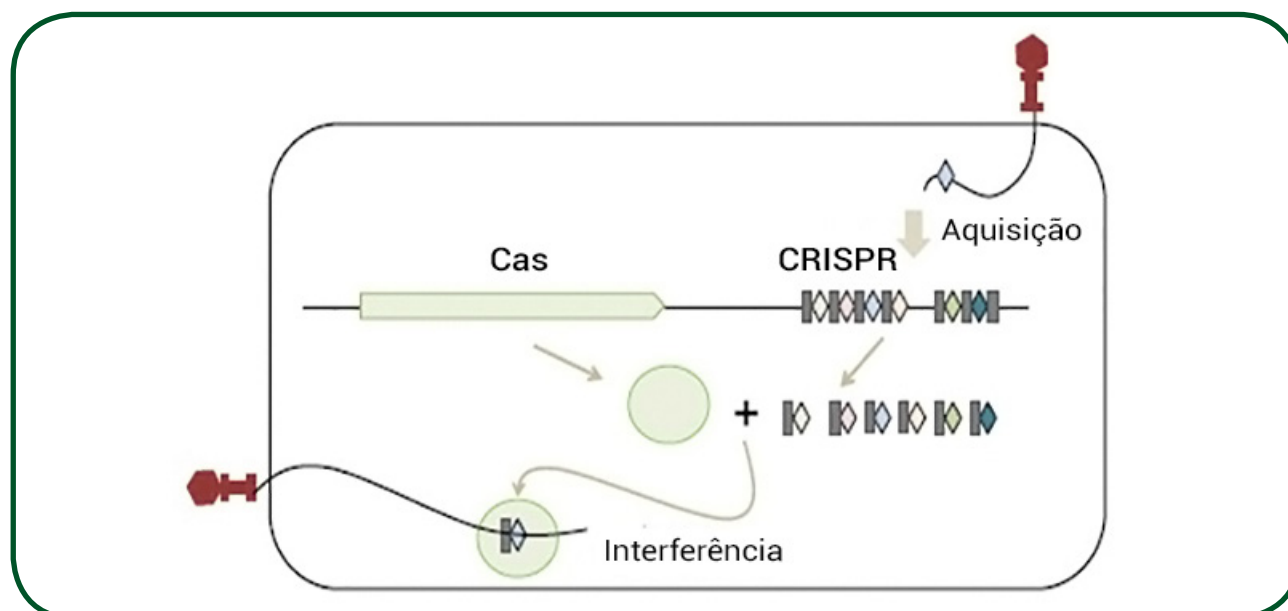
Outra aplicação importante baseada na totipotência celular é limpeza de vírus e bactérias. Isto é possível porque as células meristemáticas se multiplicam em maior velocidade do que vírus e bactérias, resultando uma planta “limpa”. A técnica tem sido utilizada em espécies como a cana de açúcar, batata doce, batata inglesa, laranja e alho para limpezas de vírus. (Fita et al., 2008).



Uma das principais aplicações da cultura tecidos está estreitamente relacionada à engenharia genética. Para a obtenção de cultivares transgênicas é imprescindível a regeneração de plantas completas a partir de células transformadas (Item 5.2).

## 5.4. Crispr-Cas-09

Nos últimos anos da década de 80, um grupo de pesquisadores japoneses liderados por Yoshizumi Ishino identificou um loco no genoma da bactéria *Escherichia coli*, formado pela seguinte configuração: sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (Figura 7). No início do século, 2002, foi utilizada a sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), traduzida, em português, por Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) (Jansen et al., 2002).



**Figura 7.** Sistema CRISPR-Cas em bactérias. Os sistemas CRISPR-Cas são usados para defesa de ataques de bacteriófagos. Parte do genoma do vírus é integrado ao genoma bacteriano por meio da etapa de "aquisição espaçadora". Em seguida, o vírus tendo a mesma sequência com espaçador é interferida pelo sistema CRISPR-Cas. (Adaptado de Sugano et al., 2018).

O sistema CRISPR-Cas é utilizado como defesa de procariotos contra a invasão de elementos genéticos móveis indesejáveis como vírus, plasmídeos e transposons. O mecanismo de defesa compreende as fases de adaptação, biogênese do crRNA e ação contra o invasor. A primeira fase corresponde a aquisição de um novo espaçador no loco CRISPR. Isso ocorre porque algumas bactérias quando infectadas, por meio de enzimas codificadas por genes Cas, clivam o DNA exógeno em pequenos fragmentos e os integram no loco CRISPR como novos espaçadores, imunizando-as contra futuras invasões (Jansen et al., 2002; Balbino et al., 2016).

Na segunda fase, ocorre uma transcrição ininterrupta do loco CRISPR. A transcrição gera um precursor RNA de CRISPR (pré-crRNA) com várias sequências repetidas e vários espaçadores em um único RNA longo. Posteriormente, o pré-crRNA é proces-

sado, originando diversos crRNA menores, cada um correspondente a um espaçador distinto. Na terceira fase, os crRNA juntamente com as proteínas Cas formam complexos que reconhecem a sequência genética exógena (Balbino et al., 2016; Sugano et al., 2018).

Mais de três décadas se passaram entre a descoberta inicial do loco CRISPR e o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica de edição genética. Nos dias atuais percebe-se uma rápida difusão acadêmica da técnica, aumento das publicações científicas, ampliação do número de empresas biotecnológicas baseadas em CRISPR e a aplicação da técnica em diversas áreas científicas. No melhoramento para resistência a patógenos há várias pesquisas publicadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Exemplos de artigos que tratam da edição de genomas relacionados à resistência de plantas a patógenos. (Adaptado de Sugano et al., 2018)

Patógeno	Hospedeiro	Gene	Referência
Beet severe curly top virus	<i>Nicotiana benthamiana</i>	LIR	Baltes et al., 2015
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativae</i>	OsERF922	Wang et al., 2016
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>Oryza sativae</i>	OsERF922	Wang et al., 2016
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Malus domestica</i>	DIPM-1	Malnoy et al., 2016
ZYMV, PRSV	<i>Cucumis sativus</i>	eIF4E	Chandrasekaran, 2016
<i>Oidium neolycopersici</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	SIMlo1	Nekrasov et al. 2017
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>Citrus sinensis</i>	CsLOB1	Jia et al., 2017
<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	TaEDR1	Zhang et al. 2017
<i>Rice tungro spherical virus</i>	<i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i>	eIF4G	Macovei et al., 2018
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Vitis vinifera</i>	WRKY52	Wang et al., 2018
<i>Phytophthora tropicalis</i>	<i>Theobroma cacao</i>	NPR3	Fister et al., 2018

## 5.5. Ômicas

As denominadas Ômicas têm como objeto de estudo o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. As ciências que compõem as Ômicas são a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica. A genômica estuda a alteração dos genes, a transcriptômica estuda as alterações dos transcritos, a proteômica estuda as alterações das proteínas, e a metabolômica estuda as alterações dos metabólitos (Canuto et al., 2018).

A genômica que trata do DNA é denominada de genômica estrutural e corresponde ao estudo de regulação epigenética, variação somática, variações cromossômicas e transmissão de caracteres. As técnicas de transcriptoma, também denominada de genômica funcional, geram informações associadas à expressão gênica, sendo a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir da fita do mRNA a mais comum. Para isto,

muitas técnicas são utilizadas como Northernblot, diferencial display, PCR em tempo real (rtPCR), bibliotecas full-length, entre outras. A técnica RNASeq tem se destacado pela geração rápida de uma grande quantidade de informação (Bunnik & Roch, 2013).

A proteômica tem sido utilizada em estudos de regulação pós-transcricional e pós-traducional. A técnica permite estudos para identificar proteínas relacionadas à reação ou susceptibilidade a um agente causal de uma doença e os processos interativos de proteínas com DNA, RNA ou produtos metabólicos. A metabolômica permite estudar produtos de metabólitos, que são produtos intermediários ou finais do metabolismo de baixa massa molecular (até 1500 Da) (Canuto et al., 2018).

Todas essas ferramentas Ômicas têm ampliando seus espectros de atuação e podem ser usadas para o entendimento das relações patógeno-hospedeiro, com uma aplicabilidade potencial no melhoramento genético para resistência de plantas e, ou, desenvolvimento de produtos.

## 6. Considerações finais

O melhoramento genético de plantas iniciou-se quando o homem passou a selecionar as plantas de maior interesse. Esse momento foi fundamental para história porque permitiu a fixação das pessoas e a formação das primeiras cidades, evitando a vida nômade. Com o surgimento da genética, a síntese moderna da evolução, os conceitos de genética populacional, aliados aos conhecimentos de estatística e a melhoria das condições ambientais de cultivo, o melhoramento genético proporcionou o aumento da produtividade nas principais culturas de importância econômica. O advento das técnicas biotecnológicas e suas primeiras aplicações, em especial no campo da engenharia genética, tem auxiliado os pesquisadores a obter cultivares cada vez mais produtivas.

Com aumento populacional, o desafio da ciência é produzir cada vez mais alimentos dentro das exigências dos consumidores por produtos mais saudáveis e com menor agressão ao meio ambiente. Nesse sentido, o melhoramento genético para resistência à patógenos precisará de todas as ferramentas biotecnológicas disponíveis. Espera-se que a biotecnologia auxilie os pesquisadores a alcançar níveis elevados de produtividade e qualidade associados com o menor uso de defensivos para garantir maior qualidade de vida para a humanidade.

## 7. Referências bibliográficas

- ANDRADE, S.R.M. **Transformação de plantas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2003. 28 p. (Documentos/Embrapa Cerrados, 102).
- BALBINO, T.C. et al. Introdução. In: PEREIRA, T.C. (org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. p. 29-38.

- BALTES, N.J. et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. **Nature Plants**, v. 1, A. 15145, 2015.
- BERNARDO, R.; YU, J. Genomewide selection for rapid introgression of exotic germplasm in maize. **Crop Science**, v. 49, p. 419-425, 2009.
- BERNARDO, R.; YU, J. Prospect for genome wide selection for quantitative traits in maize. **Crop Science**, v. 47, p. 1082-1090, 2007.
- BUNNIK, E.M.; ROCH, K.G.L. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. **Advances in Wound Care**, v. 2, p. 490-498, 2013.
- BURRUEZO, A.R.; FITA, A.M.; TOMÁS, J.P. **A primer of genetics and plant breeding**. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2009, 177p.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores moleculares. In: CAIXETA, E.T.; BORÉM, A. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 9-78.
- 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.
- 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.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v. 142, p. 169-196, 2005.
- DIOUF, D. Genetic transformation of forest trees. **African Journal Biotechnology**, v.2, p.328-333, 2003.
- DONG, O.X.; RONALD, P.C. Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent Progress and Future Perspectives. **Plant Physiology**, v. 180, p. 26-38, 2019.
- DORMATEY, R. et al. Gene Pyramiding for Sustainable Crop Improvement against Biotic and Abiotic Stresses. **Agronomy**, v. 10, p. 1-21, 2020.
- EDUARDO, I., ARÚS, P.; MONFORTE, A.J. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. **Theoretical Applied Genetic**, v. 112, p. 139-148, 2005.
- 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. In: **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, p. 24-32, 2008.
- FISTER, A.S.; LANDHERR, L.; MAXIMOVA, S.N.; GUILTINAN, M.J. Transient expression of CRISPR/Cas9 machinery targeting TcNPR3 enhances defense response in *Theobroma cacao*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 268, 2018.
- FITA, A.M.; BURRUEZO, A.R.; TOMÁS, J.P. **Genética y Mejora vegetal**. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2008. 190p.
- FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advanced Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.
- GORKA, P.; ESTERAS, C.; GIBON, Y.; MONFORTE, A.J.; PICÓ, B. A new genomic library of melon introgression lines in a cantaloupe genetic background for dissecting desirable agronomical traits. **BMC Plant Biology**, v. 16, p. 1-21, 2016.

- HANSON, P.M. et al. Mapping a Wild Tomato Introgression Associated with Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance in a Cultivated Tomato Line. **Journal American Society Science**, v. 125, p. 15-20, 2000.
- HOSOYA, K.; NARISAWA, K.; PITRAT, M.; EZURA, H. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. **Plant Breeding**, v. 118, p. 259-262, 1999.
- HOSOYA, K. et al. Impact of resistant melon cultivars on *Sphaerotheca fuliginea*. **Plant Breeding**, v. 119, n. 3, p. 286-288, 2000.
- JANSEN, R.; EMBDEN, J.D.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1565-1575, 2002.
- JI, Y.F.; SCOTT, J.W.; MAXWELL, D.; SCHUSTER, D. Molecular mapping of Ty-4, a new tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 134, p. 281-288, 2009.
- JIA, H. et al. Genome editing of the disease susceptibility gene Cs LOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant biotechnology journal**, v. 15, p. 817-823, 2017.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.
- KUZUYA, M.; YASHIRO, K.; TOMITA, K.; EZURA, H. Powdery Mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2093-2100, 2006.
- MACOVEI, A. et al. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1918-1927, 2018.
- MALNOY, M. et al. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, A. 1904, 2016.
- MEUWISSEN, T.; GODDARD, M. Accurate prediction of genetic values for complex traits by whole-genome resequencing. **Genetics**, v.185, p. 623-631, 2010.
- MEUWISSEN, T.; HAYES, B.; GODDARD, M. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, p. 1819-1829, 2001.
- MULLIS, K.B.; FALONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, 155, p. 335-350, 1987.
- NEKRASOV, V. et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific reports**, v. 7, n. 482, 2017.
- NUNES, E.W.L.P. et al. Brazilian melon landraces resistant to *Podosphaera xanthii* are unique germplasm resources. **Annual Applied Biology**, v. 171, p.214-228, 2017.
- PICÓ, M.B.; DIÉZ, M.J. Práticas de Biodiversidad y Marcadores Moleculares. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 2009, 172p.
- PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. Production of haploids and doubled haploids in maize. **Plant Cell Culture Protocols**, v. 877, p. 161-172, 2012.
- SÁNCHEZ, M.A.; CORONADO, Y.M.; CORONADO, A.C.M. Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in *Capsicum* spp. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, v. 73, p. 9047-9056, 2020.
- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.



- SERVIN, B.; MARTIN, O.C.; MÉZARD, M.; FRÉDÉRIC, H. Toward a Theory of Marker-Assisted Gene Pyramiding. **Genetics**, v. 168, p. 513-523, 2004.
- SUGANO, S.S.; OSAKABE, K.; OSAKABE, Y. Crop Breeding Using CRISPR/Cas9. In: PRASAD, R.; GILL, S.S.; TUTEJA, N. **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 451-463.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetic**, v. 27, p. 205-233, 1993.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4417, 1995.
- WANG, W.; PAN, Q.; HE, F.; AKHUNOVA, A.; CHAO, S.; TRICK, H.; AKHUNOV, E. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. **The CRISPR Journal**, v. 1, p. 65-74, 2018.
- WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature biotechnology**, v. 32, p. 947-951, 2014.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.
- ZHANG, Y. et al. Simultaneous modification of three homoeologs of Ta EDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. **The Plant Journal**, v. 91, p. 714-724, 2017.
- ZIETKIEWICS, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprint by sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

Daniel Debona

## 1. Introdução

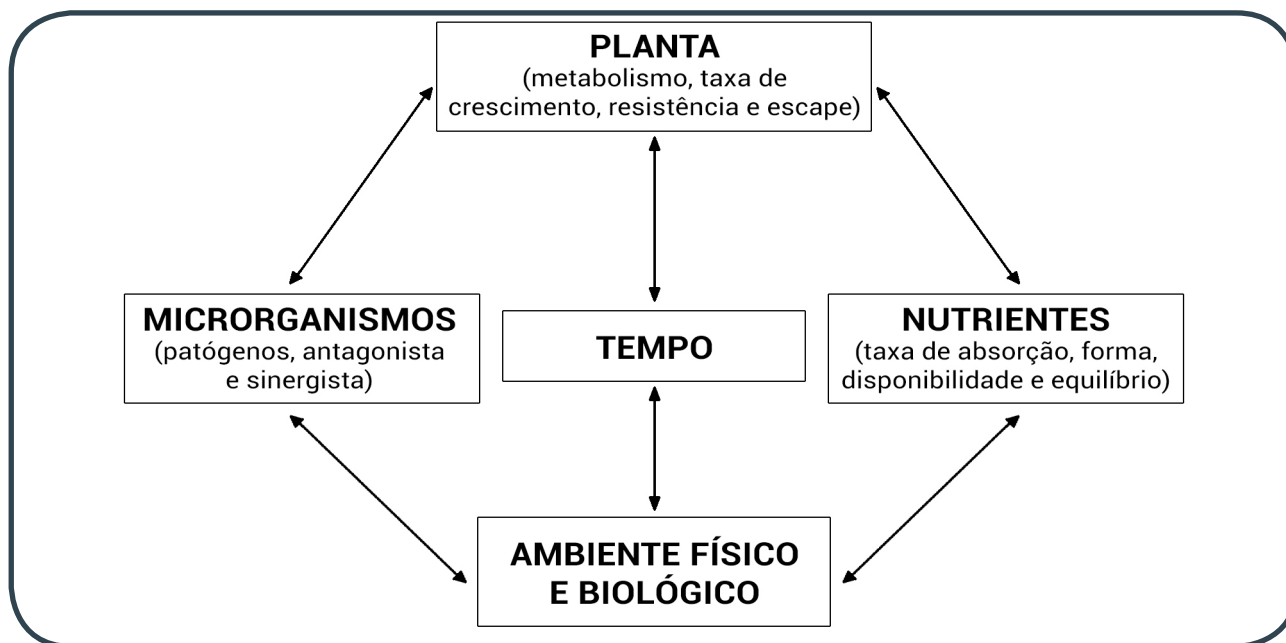
Historicamente, as doenças de plantas têm cobrado pesado tributo da humanidade. Em escala mundial, são dignas de nota as epidemias da requeima da batateira, causada por *Phytophthora infestans*, na Irlanda e da mancha parda do arroz, causada por *Bipolaris oryzae*, em Bangladesh em meados dos séculos XIX e XX, respectivamente, que resultaram na morte de milhões de pessoas por falta de alimento. No Brasil, grandes empreendimentos com plantas de Seringueira (*Hevea* sp.) estabelecidos nas primeiras décadas do século XX visando à produção de borracha por Henry Ford faliram em função do ataque de *Pseudocercospora ulei*. Mais recentemente, a ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, têm causado grandes impactos na sojicultura brasileira devido ao elevado potencial de dano, alto custo de controle, substituição de genes de resistência do hospedeiro e resistência do fungo a fungicidas. Esses exemplos ilustram a importância das doenças de plantas e a necessidade da adoção de múltiplas práticas de controle, e não somente daquelas baseadas em ferramentas genéticas e químicas, com o intuito de reduzir o dano causado pelas doenças que ocorrem atualmente, bem como minimizar o risco de emergência de doenças hoje consideradas secundárias. Dentro desse contexto, a nutrição mineral é um fator ambiental que influencia as doenças de plantas e que pode ser manipulado com relativa facilidade.

Treze elementos minerais são reconhecidos como essenciais às plantas, apresentando diferentes funções na sua fisiologia (Tabela 1). A nutrição mineral normalmente tem sido estudada em função do aumento na produtividade e qualidade dos produtos vegetais. Contudo, os efeitos secundários da nutrição, incluindo nas doenças de plantas, têm sido largamente negligenciados. Fatores como dose, forma, modo e momento de aplicação influenciam a resposta de determinada doença a um dado nutriente. As condições edafoclimáticas, como pH, temperatura, umidade e microrganismos, também exercem grande influência na disponibilidade de nutrientes e, por conseguinte, nas doenças de plantas. Alguns nutrientes, a exemplo do potássio, cálcio e magnésio, competem entre si pelos sítios de absorção pelas plantas, e o aumento na dose de um nutriente pode acarretar deficiência do outro. Além disso, um nutriente pode reduzir a intensidade de uma doença e aumentar a de outra, evidenciando a complexidade de estabelecer relações dos nutrientes com as doenças de plantas.

**Tabela 1.** Nutrientes essenciais, símbolo químico e abundância relativa (%) requerida em plantas de citros para o seu crescimento e desenvolvimento normal. (Adaptado de Spann & Schumann, 2010).

Nutriente	Símbolo químico	Abundância relativa (%)	Função na Planta
Nitrogênio	N	100	Aminoácidos e proteínas
Potássio	K	25	Catálise e transporte de íons
Cálcio	Ca	12,5	Componente da parede celular
Magnésio	Mg	8	Clorofila e fotossíntese
Fósforo	P	6	Ácidos nucleicos e ATP
Enxofre	S	3	Aminoácidos
Cloro	Cl	0,3	Fotossíntese
Ferro	Fe	0,2	Síntese da clorofila
Boro	B	0,2	Componente da parede celular
Manganês	Mn	0,1	Ativação de enzimas
Cobre	Cu	0,01	Componente de enzimas
Zinco	Zn	0,03	Ativação de enzimas
Molibdênio	Mo	0,0001	Fixação de nitrogênio

Os nutrientes afetam as doenças de plantas de diferentes formas (Figura 1). No hospedeiro, a nutrição mineral ocasiona mudanças anatômicas e morfológicas, como espessura da cutícula e das paredes celulares, além de bioquímicas, incluindo a síntese de substâncias antimicrobianas (fenóis e fitoalexinas), que influenciam a resistência de plantas a patógenos. A acelerada diferenciação dos tecidos devido à nutrição adequada pode resultar em escape da cultura a patógenos que possuem uma curta janela de ataque, como fungos e oomicetos causadores de tombamento de plântulas. Modificações no dossel da cultura, derivadas do suprimento nutricional, influenciam o ambiente, tornando-o mais ou menos favorável às doenças. Além disso, os nutrientes podem ter efeito direto sobre o patógeno. A baixa quantidade ou a ausência de uma forma do nutriente assimilável pelo patógeno pode comprometer sua virulência. Por outro lado, alguns nutrientes, notadamente enxofre e cobre, apresentam atividade fungicida. Por último, existe uma interdependência entre disponibilidade de nutrientes, microrganismos benéficos e patógenos. Dessa forma, a efetividade do controle biológico depende da nutrição mineral e alguns exemplos de biocontrole derivam da habilidade do microrganismo de tornar indisponível determinados nutrientes aos patógenos. O exemplo clássico é a produção de sideróforos sequestradores de ferro por *Pseudomonas* spp., que limitam a disponibilidade do nutriente aos patógenos, tornando os solos supressivos. Nesse capítulo, será discutida a influência dos macro e micronutrientes, além do elemento benéfico silício, nas doenças de plantas, bem como os mecanismos de ação dos nutrientes sobre patógeno, hospedeiro, ambiente e agentes de biocontrole.



**Figura 1.** Dinâmica das interações que influenciam as doenças de plantas, com ênfase no papel da nutrição mineral. (Adaptado de Zambolim et al., 2012).

## 2. Macronutrientes

### 2.1. Nitrogênio

O nitrogênio (N) é o elemento mineral requerido em maior quantidade pelas plantas. Ele é constituinte de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, nucleotídeos, hormônios, fitoalexinas, fenóis, entre outros componentes celulares. O ciclo do N é bastante complexo. A mineralização biológica do N orgânico a amônio ( $\text{NH}_4$ ) inorgânico e sua subsequente oxidação (nitrificação) a nitrato ( $\text{NO}_3$ ) são processos dinâmicos, resultando em diferentes formas de N disponíveis à absorção pelas raízes das plantas (Huber & Thompson, 2007).

As diferentes formas de N metabolizadas pelas plantas têm um impacto profundo nas doenças por alterarem características de crescimento, metabólitos intermediários, exsudatos radiculares e o controle biológico. Por outro lado, processos como a desnitrificação, lixiviação ou imobilização biológica reduzem a disponibilidade desse elemento. O N é o elemento com o maior número de relatos sobre a influência em doenças. O efeito do N sobre as doenças é influenciado pela quantidade, forma e época de aplicação do elemento (Huber & Thompson, 2007).

A quantidade de N disponível relativa à necessidade da planta pode ter grande impacto sobre a intensidade de doenças. A deficiência de N pode fornecer um ambiente nutricional inadequado a parasitas obrigatórios, porém o excesso de N inibe a produção de compostos de defesa. Além disso, o crescimento vigoroso promovido por elevadas doses de N pode resultar em microclima favorável à ocorrência de doenças. Tem sido reconhecido que a severidade de ferrugem e oídio em cereais é aumentada

conforme a dose de N aumenta. Da mesma forma, o aumento no suprimento com N predispõe as plantas ao mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*. A podridão radicular do trigo, causada por *Fusarium culmorum*, e a do gerânio, causada por *Pythium* spp., também são mais severas sob doses elevadas de N. Por outro lado, a intensidade de diferentes manchas foliares, incluindo a mancha amarela (*Pyrenophora tritici-repentis*) e a mancha de Septoria (*Septoria tritici*), bem como do mal do pé (*Gaeumannomyces graminis* f. sp. *tritici*) do trigo foram reduzidas com o aumento no nível de N (Zambolim et al., 2012). Como regra geral, o N aumenta a resistência do hospedeiro a parasitas facultativos e reduz a resistência a parasitas obrigatórios (Tabela 2).

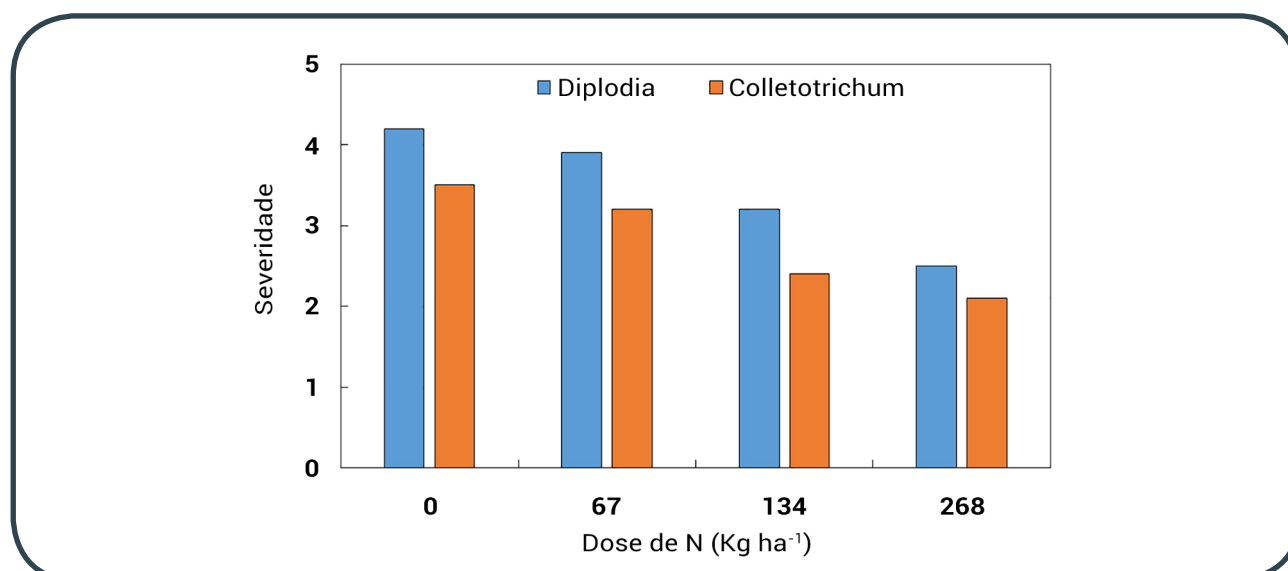
**Tabela 2.** Efeito de altos e baixos níveis de nitrogênio (N) na intensidade de doenças causadas por patógenos com diferentes estilos de vida. (Adaptado de Zambolim et al., 2012).

Estilo de vida	Patógeno	Doença	Nível de nitrogênio	
			Baixo	Alto
Parasitas obrigatórios	<i>Puccinia graminis</i>	Ferrugem	+ <sup>1</sup>	+++
	<i>Blumeria graminis</i>	Oídio	+	+++
Parasitas facultativos	<i>Xanthomonas</i> spp.	Mancha bacteriana	+++	+
	<i>Alternaria solani</i>	Pinta preta	+++	+
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha vascular	+++	+

<sup>1</sup>+ = baixa severidade; +++ = alta severidade.

As podridões de colmo do milho são comumente observadas no final do ciclo e tem relação direta com o estresse por N. Durante o enchimento de grãos, a demanda por N aumenta e a planta recicla o N armazenado vegetativamente para o grão para satisfazer essa demanda. Quando existe pouco N armazenado vegetativamente ou a disponibilidade do elemento no solo é baixa, a planta canibaliza enzimas envolvidas na fixação de CO<sub>2</sub>, incluindo a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) e a fosfoneolpiruvato (PEP) carboxilase, bem como proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina), como fontes de N (Huber & Thompson, 2007). Com isso, a fotossíntese é comprometida, e barreiras estruturais à maceração dos tecidos são removidas como resultado do consumo das paredes celulares para o fornecimento de N aos grãos. Portanto, um adequado suprimento de N às plantas é fundamental para prevenir esse efeito. De fato, a severidade das podridões do colmo de milho causadas por *Colletotrichum graminicola* e *Diplodia maydis* foi reduzida conforme a dose de N aumentou de 0 para 268 kg/ha (White et al., 1978; Figura 2).





**Figura 2.** Severidade de podridões do colmo do milho, causadas por *Colletotrichum graminiicola* e *Diplodia maydis*, em função do aumento na dose de nitrogênio (N). (Adaptado de White et al., 1978).

O momento de aplicação de N é determinante no seu efeito sobre as doenças de plantas. A aplicação de N em cobertura evita as perdas do nutriente por lixiviação e desnitrificação que ocorreriam em aplicações no início da estação de cultivo, reduzindo a predisposição de plântulas ao tombamento causado por *Pythium* e *Rhizoctonia*. A escolha do momento de aplicação do N pode variar de acordo com a pressão de doença. Em trigo de inverno, o atraso na aplicação de N até a primavera normalmente resulta em deficiência de N e predispõe as plantas ao mal do pé, mas evita o excesso de N disponível em condições frias e úmidas, que são conducentes à morte de plantas por *Rhizoctonia solani* (Huber, 1989).

A forma de N ( $\text{NO}_3$  ou  $\text{NH}_4$ ) que está disponível ao hospedeiro ou ao patógeno afeta a resistência ou agressividade de forma mais pronunciada que a quantidade do elemento (Zambolim et al., 2012). Existem diferentes fontes de N que são comercializadas, porém na maioria dos solos a forma predominante é o  $\text{NO}_3$  resultante da nitrificação, sendo a forma de N disponível mais dependente da atividade biológica no solo do que da forma de N aplicada. A sequência de culturas, exsudatos radiculares, forma de preparo do solo, aplicação de material orgânico e as condições do solo (temperatura, pH e umidade) influenciam a forma de N disponível (Huber & Watson, 1974). Determinada forma de N pode reduzir uma doença e aumentar outra. Nesse caso, a forma amoniacal foi demonstrada aumentar a murcha de *Verticillium* e reduzir o cancro da haste de *Rhizoctonia*, mas o inverso ocorre para a forma nítrica. Além do efeito sobre o hospedeiro e o patógeno, a forma de N influencia a efetividade do controle biológico. Supressão da murcha de *Fusarium* em tomateiro foi observada somente com o aumento na dose de  $\text{NH}_4$ , enquanto que o efeito foi mínimo em plantas supridas com  $\text{NO}_3$  (Borrero et al., 2012). A escolha correta da forma de N pode otimizar o seu efeito na produtividade sem predispor o hospedeiro ao patógeno. Dessa forma, o efeito predisponente da aplicação de esterco suíno em milho à podridão do colmo foi eliminado pela inibição da nitrificação (Huber & Thompson, 2007).

O efeito de cada uma das formas de N na intensidade de doenças está associado à alteração diferencial no pH da rizosfera. A absorção de  $\text{NH}_4$  pelas raízes das plantas acidifica, enquanto a absorção de  $\text{NO}_3$  alcaliniza a rizosfera. Assim, a forma amoniacal aumenta a intensidade de doenças que são favorecidas por pH ácido, ao passo que a forma nítrica intensifica as doenças favorecidas por pH neutro a alcalino. O efeito da calagem e de duas fontes de N (sulfato de amônio e nitrato de sódio) na severidade da podridão de raízes causada por *Rhizoctonia solani* foi avaliado em feijoeiro (Rodrigues et al., 2002). O índice de doença (ID) foi aumentado em 32% com o aumento do pH de 4,9 para 5,8 decorrente da calagem (Rodrigues et al., 2002). Após a calagem, entretanto, a aplicação de sulfato de amônio reduziu em 22% o ID e o nitrato de sódio aumentou em 18% o ID (Rodrigues et al., 2002). De maneira similar, doenças causadas por *Gaeumannomyces* spp., *Thielaviopsis* spp. e *Verticillium* spp. são reduzidas por  $\text{NH}_4$  e aumentadas por  $\text{NO}_3$  (Huber & Thompson, 2007). O mal do pé do trigo pode ser suprimido pela aplicação de fontes de N amoniacaais. Nesse caso, a acidificação do pH da rizosfera decorrente da absorção de  $\text{NH}_4$  aumenta a disponibilidade de micronutrientes, como o Fe, Cu e Mn, contribuindo para a resistência do hospedeiro. Por outro lado, podridões radiculares e murchas causadas por *Fusarium* spp. em aspargo, beterraba, cravo, crisântemo, ciclâmen, gladiolo, manjerição, melancia, tabaco e tomate são decrescidas por  $\text{NO}_3$  ou pH alcalino (Huber & Thompson, 2007).

O N pode interferir na resistência ou suscetibilidade de plantas a doenças de diversas maneiras. Alguns patógenos são capazes de prosperar em tecidos suculentos promovidos pelo N, enquanto doenças cujos patógenos são veiculados pelo solo são reduzidas em plantas vigorosas devido ao escape e à produção de novas raízes para compensar a destruição de raízes pelos patógenos (Huber & Thompson, 2007). No entanto, o excesso de N reduz o conteúdo de celulose da parede celular vegetal, aumentando a suscetibilidade a algumas doenças radiculares. A composição dos exsudatos radiculares influencia a infecção por patógenos e varia de acordo com a fonte de N utilizada. A quantidade e o número de aminoácidos presentes em exsudatos radiculares são maiores em plantas supridas com  $\text{NH}_4$  do que  $\text{NO}_3$ , tendo grande impacto na patogênese por influenciar o microbioma da planta. A prolina é o único aminoácido cuja concentração é aumentada por  $\text{NO}_3$  em raízes de tomateiro, e o nível de prolina foi correlacionado com a redução na murcha de *Fusarium* (Huber & Thompson, 2007). Plântulas de alface, beterraba açucareira e feijoeiro supridos com  $\text{NH}_4$  foram mais suscetíveis ao tombamento causado por *Rhizoctonia solani* do que as supridas com  $\text{NO}_3$ , e o aumento na suscetibilidade possivelmente está relacionado com o aumento nos níveis de asparagina bem como à indução na produção de enzimas macerativas do fungo promovidos por  $\text{NH}_4$  (Huber & Thompson, 2007). Por outro lado,  $\text{NH}_4$  promove um desenvolvimento mais rápido da periderme de tubérculos de batata do que  $\text{NO}_3$  (Huber & Thompson, 2007), podendo contribuir para a resistência à sarna comum causada por *Streptomyces scabies*. Além disso, o N pode ter um efeito direto sobre o patógeno e o ambiente. Algumas formas de N são fungitóxicas a patógenos de solo, incluindo *Verticillium dahliae* (Tenuta & Lazarovitis, 2002), enquanto outros patógenos, como *Aphanomyces* spp., *Pantoea stewartii* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* parecem ser incapazes de usar a fonte nítrica (Huber & Thompson, 2007). Formas específicas de N também aumentam a população de bactérias e actinomicetos antagonistas, aumentando a supressividade do solo (Huber & Watson, 1974).

## 2.2. Fósforo

O fósforo (P) é constituinte dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), das membranas celulares (na forma de fosfolipídeos), de proteínas, entre outras moléculas, sendo um nutriente essencial em reações de transferência de energia (como ATP, ADP e PPI) (Rice, 2007). O efeito do P sobre as doenças de plantas é variável, havendo relatos de redução na sua intensidade em alguns casos e aumento em outros.

O P reduz o progresso de ferrugens e outras doenças foliares por encurtar o período vegetativo e é particularmente benéfico em contraposição a elevados níveis de N. Estudos realizados em casa de vegetação mostraram que a variação de 0 a 170 kg ha<sup>-1</sup> de P reduziu a taxa de progresso da ferrugem asiática da soja de 0,42 para 0,29 (Balardin et al., 2006). Contudo, altos níveis de P no solo aumentaram a severidade da ferrugem da cana (*Puccinia melanocephala*), fato que foi relacionado à redução no período latente e aumento na esporulação do fungo (Andrade, 1991). O P isoladamente ou combinado com K aumentou a resistência do trigo ao oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) através do aumento no nível de fenóis e na atividade da enzima polifenoloxidase (Yurina et al, 1997). A investigação de quatro genótipos de arroz mostrou variação no acúmulo de nutrientes e na suscetibilidade à brusone na panícula; as concentrações de P, N e Mg foram positivamente correlacionadas com a severidade da brusone, enquanto que as concentrações de K e Ca tiveram correlação negativa com a severidade da doença (Prabhu et al., 2007a).

O efeito do P parece ser maior em doenças causadas por fungos de solo. O aumento na regeneração das raízes de plantas conferida por um adequado suprimento com P permite escape à doença, eliminando perdas na produtividade causadas por *Pythium* spp. em trigo (Zambolim et al., 2012). A aplicação de P também aumenta a resistência a nematoides devido ao aumento no volume radicular. É importante ressaltar, contudo, que o suprimento com N também deve ser adequado, pois o P foi pouco eficiente em limitar o dano causado pelo mal do pé em trigo sob deficiência de N. Plantas deficientes em P apresentam menor quantidade de fosfolipídeos e maior permeabilidade da membrana celular, resultando em exsudação radicular, que está relacionada à atividade de patógenos. Esse fato pode explicar o aumento na suscetibilidade a *R. solani* em plântulas de soja deficientes em P (Castano & Kernkamp, 1956).

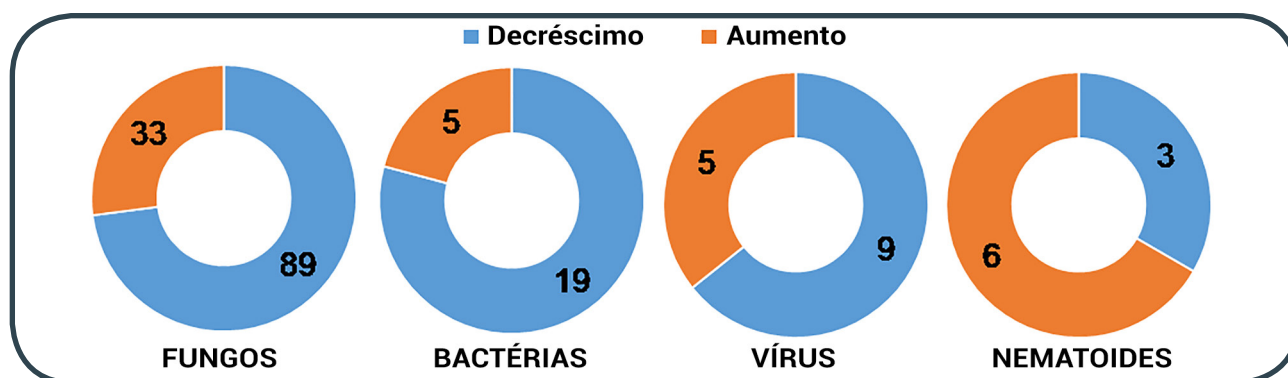
Murchas vasculares causadas por diferentes formas especiais de *Fusarium oxysporum* normalmente são intensificadas com o aumento na dose de P. O aumento no nível de P aumentou a murcha de Fusarium em tomateiro, enquanto que a combinação da calagem com baixo P reduziu a severidade da doença (Woltz & Jones, 1973). A incidência do mal do Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) em bananeira aumentou com a elevação da dose de P aplicada ao solo (Bolfarini et al., 2015). A disponibilidade de P é fortemente influenciada pelo pH do solo. Em solos ácidos, o elemento reage com óxidos de Al, Fe e Mn, o que reduz o P disponível. Em solos alcalinos, o P reage com Ca, o que também limita a disponibilidade de P. Portanto, a manutenção de uma faixa de pH adequada torna-se primordial para maximizar a quantidade de P disponível e a sanidade radicular. Alguns relatos de aumento na suscetibilidade de plantas a doenças decorrentes da aplicação de doses elevadas de P estão relacionados à sua interação e conseqüente redução na disponibilidade de outros elementos no solo, particularmente

o Zn, interferindo de forma indireta na resistência de plantas a doenças. É importante ressaltar o importante papel que as micorrizas desempenham na aquisição de P pelas raízes das plantas, tendo grande impacto no aumento da resistência ou tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos.

## 2.3. Potássio

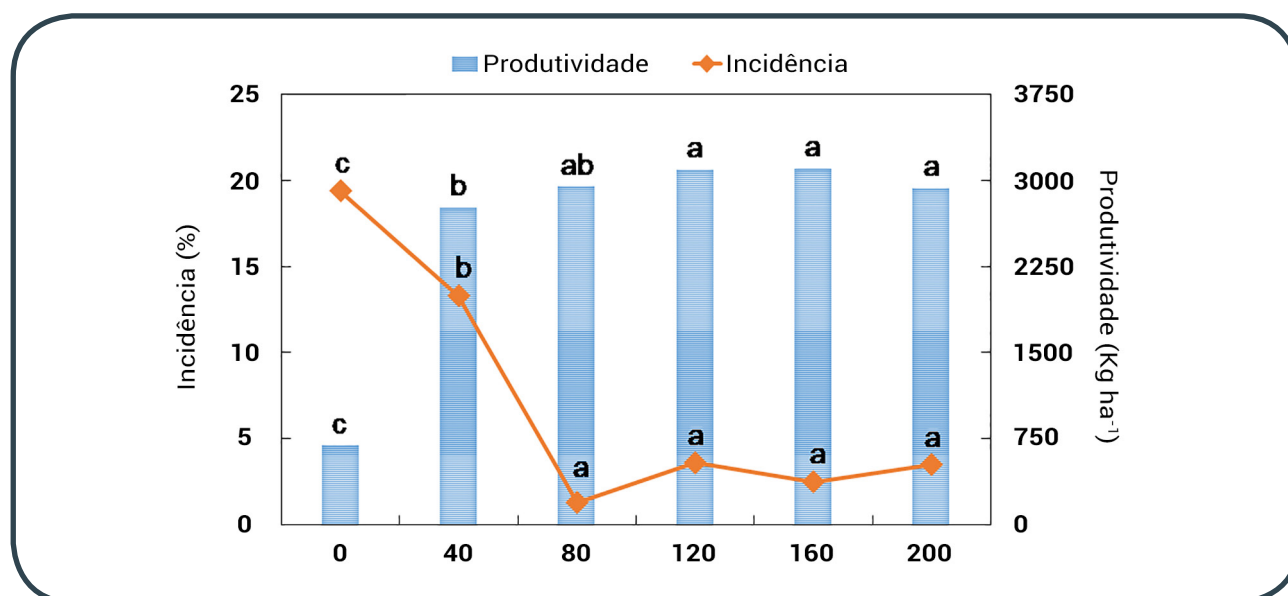
O potássio (K) é um elemento vital em diversas funções fisiológicas das plantas. O K promove o crescimento radicular e melhora a absorção de água e nutrientes; está envolvido na síntese de celulose e resistência ao acamamento; regula a atividade de mais de 60 enzimas envolvidas no crescimento da planta; reduz a respiração, prevenindo a perda de energia; auxilia na fotossíntese; ajuda na translocação de açúcares e amido; resulta na produção de grãos ricos em amido; aumenta o teor de proteína; mantém o turgor, reduzindo a perda de água e murcha; está envolvido na síntese e prevenção da degradação da clorofila (Rice, 2007).

O K, em combinação com N, P e outros nutrientes é reconhecido por afetar as doenças de plantas, exercendo um efeito positivo, negativo ou neutro sobre a resistência do hospedeiro. Embora o efeito do K não possa ser generalizado, a maioria dos estudos tem demonstrado redução na intensidade de doenças em plantas com um suprimento adequado de K (Prabhu et al., 2007b; Figura 3). As respostas mais consistentes têm sido obtidas à medida que o nível de K aumenta da faixa de deficiência para a de suficiência.



**Figura 3.** Número de relatos do efeito do potássio (K) sobre doenças de plantas causadas por diferentes grupos de patógenos. (Adaptado de Prabhu et al., 2007b).

Tanto as doenças de solo quanto as da parte aérea são afetadas por K. Plantas deficientes em K normalmente são mais suscetíveis a patógenos do que plantas que apresentam níveis adequados do elemento. As murchas vasculares do algodoeiro, causadas por *Verticillium albo-atrum* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, são reduzidas pelo K, especialmente em solos deficientes no elemento e quando a população de nematoides é baixa (Prabhu et al., 2007b). O aumento na dose de K reduziu a incidência de *Phomopsis* sp. e aumentou a produtividade da soja; doses acima de 80 kg ha<sup>-1</sup> de K, entretanto, não influenciaram a doença e a produtividade (Borkert et al., 1985 citado por Zambolim et al., 2012; Figura 4), mostrando que o efeito benéfico do K foi restrito à faixa de deficiência.



**Figura 4.** Incidência de *Phomopsis* sp. em sementes e produtividade da soja em função da aplicação de diferentes doses de potássio. (Adaptado de Borkert et al., 1993 citado por Zambolim et al., 2012).

Na interação arroz-*Pyricularia oryzae* foi demonstrado que o fungo produz um efetor (AvrPiz-t) que interage com um canal de K da célula do hospedeiro, reduzindo o influxo do nutriente e promovendo a patogênese (Shi et al., 2018). Consistentemente, o aumento de 1 mM para 5 mM de K na solução nutritiva aumentou a resistência do arroz à brusone através do acúmulo de peróxido de hidrogênio e aumento na expressão de genes de defesa (*PR1a* e *WRKY45*) (Shi et al., 2018). A maior eficiência de alguns genótipos de arroz na absorção de K pode contribuir para a resistência à brusone e aumentar a produtividade de grãos (Prabhu et al., 2007b). A taxa de progresso da ferrugem asiática da soja foi reduzida de 0,43 para 0,27 com o aumento na dose de K de 0 para 140 kg ha<sup>-1</sup> (Balardin et al., 2006).

É importante ressaltar que a relação do K com outros nutrientes é determinante no seu efeito sobre as doenças. A severidade da brusone do arroz é baixa quando a relação K:N no tecido foliar é alta, porém altas relações N:K aumentam a intensidade desta doença. Altos níveis de K suprimem a brusone do arroz quando os níveis de N são baixos, mas altos níveis de K aumentam a doença quando os níveis de N são elevados. O desbalanço entre K e N intensifica a mancha parda do arroz (*Bipolaris oryzae*), em que uma baixa relação N:K (0:30) resulta em alta incidência da doença, enquanto que um relação N:K de 45:30 diminuiu a doença (Faria & Prabhu, 1983). Outra relação importante é entre K, Ca e Mg. Tanto o K quanto o Mg decrescem o conteúdo de Ca em legumes de amendoim, predispondo-os ao ataque por *Rhizoctonia* e *Pythium* (Huber, 1980). No estado do Espírito Santo, plantas de bananeira mostraram sintomas do mal do Panamá em solos cujos níveis de K foram muito elevados em relação aos de Ca e Mg. Dessa forma, a relação K:Mg entre 0,1 e 0,4 é recomendada para bananeiras cv. Prata (AAB) a fim de mitigar os danos causados pela doença (Zambolim et al., 2012).

A fonte de K também influencia a severidade de doenças. A aplicação de KCl reduziu a podridão vermelha da raiz (PVR) da soja, causada por *Fusarium solani* f.



sp. *glycines*, em 36%, mas a severidade da doença aumentou em 45, 32 e 43% quando foram utilizados  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , respectivamente (Sanogo & Yang, 2001). O efeito das diferentes fontes de K na PVR foi correlacionado com seu efeito linear no crescimento micelial do fungo.

Diferentes mecanismos estão envolvidos na supressão de doenças mediada pelo K. Alterações na disponibilidade de aminoácidos e proteínas e decréscimo na permeabilidade celular reduzem a suscetibilidade do tecido do hospedeiro à penetração e maceração. A arginina inibe a germinação de esporângios de *Phytophthora infestans* e o K aumenta os níveis de arginina em plantas de batata, explicando o aumento na resistência à requeima em função do aumento no suprimento com K (Zambolim et al., 2012). O K aumenta a silicificação da parede celular, que está associada ao aumento na resistência. A falta de K decresce o acúmulo de Si nas células da epiderme foliar do arroz, aumentando a suscetibilidade à brusone. A combinação de K e P aumenta a espessura da cutícula e da parede celular, que atuam como barreiras mecânicas à penetração por patógenos. Além disso, alguns sais de K, incluindo  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{KNO}_3$  são capazes de induzir a resistência sistêmica adquirida em diferentes espécies de plantas (Reuveni et al., 2000; Becot et al., 2000; Orober et al., 2002).

## 2.4. Cálcio

O cálcio (Ca) é essencial para o crescimento radicular e o desenvolvimento foliar. É um elemento estrutural importante; pelo menos 60% do Ca total da célula é encontrado na lamela média da parede celular, na forma de pectatos, conferindo rigidez ao tecido. O Ca também é importante na estabilidade e manutenção da integridade das membranas celulares. Além disso, o Ca é capaz de se ligar à proteína calmodulina, formando o complexo Ca-calmodulina; nesse complexo, o Ca atua como mensageiro secundário, regulando a transdução de sinal em respostas de defesa vegetal (Rice, 2007).

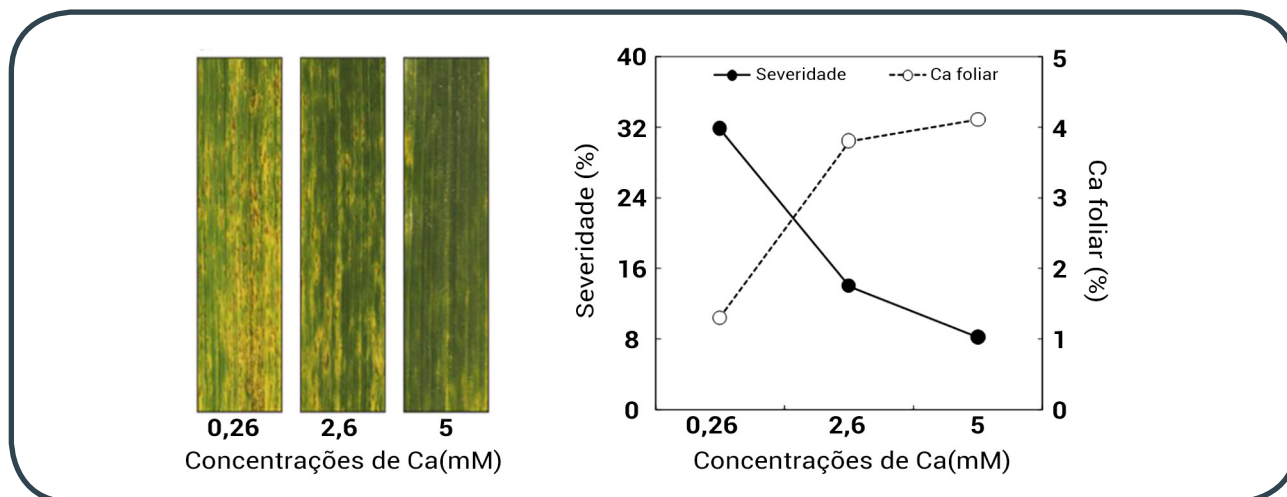
Numerosos estudos têm demonstrado que a aplicação de Ca no solo, folhas e frutos reduz a intensidade de doenças causadas por diversos patógenos de importância econômica (Rahman & Punja, 2007; Tabela 3). Um dos exemplos mais antigos é o controle da hérnia das crucíferas através da calagem, praticado há mais de 200 anos. A aplicação calcário ( $4,5 \text{ t ha}^{-1}$ ) foi tão eficiente quanto baixas doses de calcário associadas ao fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB) no controle da hérnia das crucíferas (Anderson et al., 1976). De maneira similar, o tombamento de plântulas de pepino em solo artificialmente infestado com *Pythium splendens* foi 50% menor seguindo a calagem em experimentos realizados em campo e em casa de vegetação. O aumento na dose de Ca na solução nutritiva de 5 para 500 ppm também reduziu a severidade da murcha de Fusarium em tomateiro (Edgington & Walker, 1958). A severidade da podridão mole da batata, causada por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, foi inversamente correlacionado com teor de Ca nos tubérculos (McGuire & Kelman, 1986).

**Tabela 3.** Efeito do cálcio na intensidade de doenças causadas por diferentes patógenos. (Adaptado de Zambolim et al., 2012).

Patógeno	Baixo Cálcio	Alto Cálcio
<i>Pectobacterium (Erwinia) spp.</i>	+++ <sup>1</sup>	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+++	+
<i>Sclerotium rolfsii</i>	+++	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+++	+
<i>Botrytis cinerea</i>	+++	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	+

<sup>1</sup>+ = baixa severidade; +++ = alta severidade.

Em muitos casos, o aumento no pH do solo promovido pela calagem é mais importante do que a concentração de Ca no solo, conforme relatado para a mancha da cavidade, causada por *Pythium coloratum*, em cenoura, em que somente o calcário, mas não o gesso ( $\text{Ca}_2\text{SO}_4$ ), reduziu a severidade da doença. Por outro lado, a correção de solos que apresentavam baixos níveis de Ca com gesso reduziu a podridão de legumes, causada por *Pythium* e *Rhizoctonia*, bem como a contaminação com aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus* em amendoim (Hallock & Garren, 1968; Wilson & Walker, 1981). Debona et al. (2017a) mostraram que o aumento na concentração de Ca na solução nutritiva de 0,26 para 5 mM aumentou a concentração de Ca no tecido foliar de 1,3 para 4,1% e reduziu a severidade da brusone do trigo de 37 para 8% (Figura 5).



**Figura 5.** Sintomas da brusone, severidade e concentração foliar de cálcio (Ca) em plantas de trigo crescidas em solução nutritiva contendo diferentes concentrações de Ca e inoculadas com *Pyricularia oryzae*. (Adaptado de Debona et al., 2017a).

A aplicação foliar de Ca também tem demonstrado ser capaz de reduzir a severidade de doenças. O tratamento prévio de folíolos de soja com uma formulação de Ca 48 horas antes da inoculação com um isolado de *S. sclerotiorum* altamente agressivo reduziu em 50% o tamanho da lesão (Arfaoui et al., 2018). A aplicação de sais de Ca, incluindo  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , também reduziu o número de colônias de oídio em tomateiro (Ehret et al., 2002).

O aumento da resistência de plantas a doenças como resultado do fornecimento de Ca pode ser parcialmente explicado pelo fato do elemento ser constituinte da parede celular e da lamela média, conferindo rigidez estrutural e dificultando a penetração e a colonização por patógenos. Além disso, algumas enzimas pectolíticas secretadas por patógenos, como *Pectobacterium* spp., são inibidas por elevadas concentrações de Ca. A ligação do Ca com grupos aniônicos das membranas forma pontes entre componentes estruturais, especialmente fosfolipídeos e proteínas, mantendo a permeabilidade seletiva e a integridade estrutural. O aumento nos níveis de Ca citosólico parece ser importante na transdução de sinais, intensificando algumas respostas de defesa. Nesse particular, observações feitas nas interações trigo-*P. oryzae* e soja-*S. sclerotiorum* mostraram que o Ca intensifica o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, a expressão de genes de defesa das rotas dos ácidos salicílico e jasmônico e dos fenilpropanoides, bem como o acúmulo de fitoalexinas (Debona et al., 2017a; Arfaoui et al., 2016).

## 2.5. Magnésio

O magnésio (Mg) é componente da lamela média e constitui o elemento central do anel tetrapirrólico da clorofila, molécula essencial na fotossíntese. O Mg é necessário para a preservação da estrutura e integridade dos ribossomos. Ademais, o Mg está associado com crescimento rápido, mitose, altos níveis de proteína, metabolismo de carboidratos e fosforilação oxidativa em células fisiologicamente jovens (Rice, 2007).

Diferentemente de outros macronutrientes, o papel Mg em intensificar ou minimizar o desenvolvimento de doenças tem sido pouco documentado, existindo poucos relatos da relação direta do Mg com doenças. A aplicação de Mg em combinação com fertilizante amoniacal é determinante na redução do mal do pé e aumento na produtividade do trigo em solos deficientes em Mg. Contudo, a aplicação de calcário dolomítico ( $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ ) com o intuito de neutralizar a acidez e aumentar os níveis de Mg do solo pode aumentar a severidade do mal do pé devido ao decréscimo na disponibilidade de Mn. A inibição da utilização de Mg por var pela avenacina dos exsudatos radiculares parece estar relacionada à tolerância de cultivares de aveia ao mal do pé (Huber, 1989; Jones & Huber, 2007).

Altos níveis de Mg estão associados ao aumento no desenvolvimento da mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) em pimentão e tomateiro; em ambos hospedeiros, a doença foi menos severa quando o Mg estava no limite inferior da faixa nutricional adequada de Mg do que quando o Mg estava no limite superior da faixa (Woltz & Jones, 1979). Aplicações de calcário dolomítico no solo ou de Mg foliar resultaram em maior severidade da mancha bacteriana em pimentão do que o controle sem correção do solo ou do solo corrigido com  $\text{CaCO}_3$  (Jones et al., 1983). O cloreto de Mg aumentou a severidade da murcha de *Fusarium* em tomateiro e pode se contrapor ao benefício do Ca na redução da doença (Jones et al., 1989). Tem sido reconhecido que Mg e K predispõe os legumes de amendoim ao ataque por *Pythium* e *Rhizoctonia* por reduzirem o conteúdo de Ca dos legumes. Debona et al. (2016) observaram que o aumento na concentração de Mg na solução nutritiva reduziu a concentração de Ca foliar e aumentou a severidade da brusone em trigo. Em contraste,

a resistência do arroz à brusone da panícula foi positivamente correlacionada com N, P e Mg no tecido e negativamente correlacionada com K e Ca, que são decrescidos por Mg (Filippi & Prabhu, 1998). O aumento na concentração de Mg na solução nutritiva de 0,25 para 4 mM aumentou a atividade de enzimas de defesa, potencializando a resistência do arroz à mancha parda (Moreira et al., 2013).

## 2.6. Enxofre

O enxofre (S), na forma reduzida, é incorporado em aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, óleos aromáticos e ferredoxinas. Além disso, o elemento promove o crescimento de raízes e a nodulação em leguminosas (Rice, 2007).

O S elementar foi o primeiro fungicida empregado pelo homem e permaneceu como o mais importante até o desenvolvimento dos fungicidas orgânicos. Ele tem sido bem sucedido no controle de ferrugens, oídios, míldios em cereais, sarna comum em batata e mancha de *Alternaria* em canola. O S elementar também apresenta atividade acaricida, sendo recomendado no controle de ácaros. Apesar de seu efeito fungicida, o S pode atuar indiretamente, intensificando respostas de defesa de plantas a patógenos, fenômeno descrito pelo termo “resistência induzida pelo enxofre” (do inglês, *sulfur-induced resistance* ou SIR). Outro modo de ação indireto do S é o aumento na atividade de antagonistas a patógenos. Em abacateiro, o S foi demonstrado favorecer o desenvolvimento de *Trichoderma viridae*, que atua como micoparasita de *Phytophthora cinnamomi* (Haneklaus et al., 2007; Zambolim et al., 2012).

Os metabólitos contendo S, como cisteína, glutatona, emissões de S gasoso, fitoalexinas, glicosinolatos e deposições de S elementar têm sido investigados para elucidar o seu papel na defesa vegetal e na manipulação da nutrição com S para potencializar a resistência de plantas a doenças (Bloem et al., 2015). A cisteína é o principal precursor dos compostos sulfurados e o conteúdo de cisteína no citosol é determinante na imunidade vegetal a patógenos por seu envolvimento na reação de hipersensibilidade (Alvarez et al., 2012).

Algumas proteínas ricas em S, fitoalexinas, como a camalexina, S elementar e produtos da degradação dos glicosinolatos apresentam uma ação antifúngica direta. Tem sido reconhecido que proteínas ricas em S, a exemplo das tioninas, são capazes de gerar canais iônicos nas membranas celulares de patógenos, perturbando gradientes de concentração e a homeostase celular (Bloem et al., 2015).

O caráter lipofílico ajuda a explicar o modo de ação antifúngico de S<sup>0</sup>. A oxidação de grupos sulfidril devido à entrada de S<sup>0</sup> na parede celular compromete reações redox, sendo responsável pela ação fungicida de S<sup>0</sup>. De fato, a deposição de S<sup>0</sup> no sistema vascular foi associado à resistência do cacau a *Verticillium dahliae* (Resende et al., 1996).

Numerosos estudos têm demonstrado a importância do S em reduzir a intensidade de doenças em diversas culturas. Observações feitas em casa de vegetação demonstraram que o aumento no suprimento com S reduziu a severidade da doença causada por *S. sclerotiorum* em canola, *Bipolaris maydis* em milho e *Rhizoctonia solani* em trigo em 5, 21 e 44%, respectivamente, oito a 20 dias após a inoculação (Wang et al., 200).

A correção de solos com baixo nível de S com sulfato reduziu a mancha clara foliar em canola, causada por *Pyrenopeziza brassicae*. Além disso, o S elementar aplicado em folhas de canola foi demonstrado ter atividade fungicida sobre o fungo. Em batata, a taxa e a severidade da infecção por *R. solani* foram reduzidas em 41 e 29% pela aplicação de S no solo.

Análises geoestatísticas foram utilizadas para adquirir informações sobre a variabilidade espacial de características de plantas de canola e a probabilidade de infecção por *Leptosphaeria maculans*. A infecção das plantas pelo fungo variou espacialmente; a probabilidade de infecção severa foi maior para a cultivar Lipton (suscetível) do que para a cultivar Bristol (resistente). Os padrões de variabilidade espacial para infecção severa coincidiram com o estado nutricional de S nas plantas, em que um risco maior de infecção por *L. maculans* foi relacionado a menores níveis de S e ao menor conteúdo de glicosinolatos (Salac et al., 2004).

## 3. Micronutrientes

### 3.1. Ferro

O ferro (Fe) é essencial para a atividade biológica de muitas proteínas mediando a transferência de elétrons e reações redox devido à sua capacidade de passar por diferentes estágios de oxidação. O Fe é requerido para importantes funções metabólicas, incluindo respiração, síntese de DNA, fotossíntese e fixação de nitrogênio. Igualmente importantes são algumas hemoproteínas, como catalases, peroxidases e lipoxigenases, envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio, síntese de lignina e biogênese de membrana, respectivamente. Por outro lado, o Fe catalisa a redução do oxigênio para formar radicais que são altamente danosos a biomoléculas. A toxidez por Fe resulta em peroxidação de lipídeos, degradação de proteínas e mutações no DNA, ao passo que deficiência de Fe reduz a concentração de clorofilas e carotenóides, bem como a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rice, 2007).

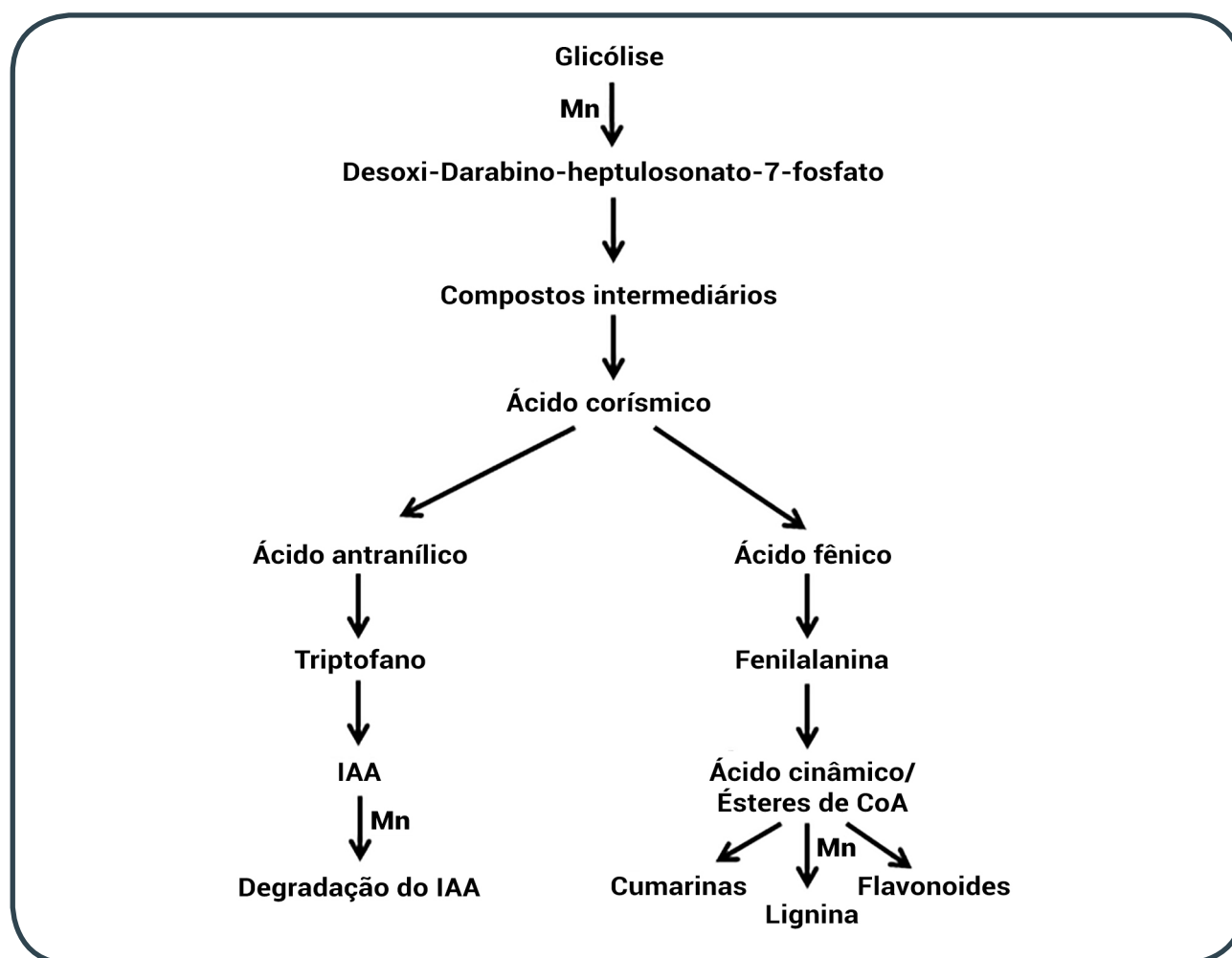
Um dos principais efeitos do Fe em doenças de plantas é através de sideróforos, compostos de baixo peso molecular secretados por microrganismos que são capazes de sequestrar Fe reduzindo sua disponibilidade para outros microrganismos na rizosfera (Expert, 2007). Dessa forma, a manipulação da disponibilidade de Fe no solo desempenha um papel crucial no controle biológico de doenças. A análise da capacidade de 2.150 bactérias de 80 microbiomas, cobrindo as principais linhagens filogenéticas, de suprimir a bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*, mostrou que membros do microbioma rizosférico com sideróforos inibidores de crescimento



suprimiram o patógeno *in vitro*, bem como em solos naturais e em casa de vegetação, e protegeram plantas de tomateiro da infecção (Gu et al., 2020). Diversos isolados da rizobactéria promotora de crescimento de plantas *Pseudomonas fluorescens* controlam doenças de plantas devido à sua habilidade de produzir sideróforos, que reduzem a disponibilidade de Fe a patógenos fúngicos e bacterianos. No entanto, o controle biológico mediado pela atividade de sideróforos é dependente da disponibilidade de Fe; a rizosfera deve ser limitante em Fe para maximizar o potencial de biocontrole. De fato, estudos com cultivo de tomateiro sem solo com diferentes concentrações de Fe, mostraram que a redução da infecção por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) por *Trichoderma asperellum* isolado T34 foi evidente apenas na concentração de 10 µM de Fe; concentrações de Fe acima de 10 µM resultam em supressão na síntese de sideróforos por T34, inibindo a competição por Fe com Fol (Segarra et al., 2010). Além do efeito direto da deficiência de Fe mediada por sideróforos no patógeno, a resistência sistêmica induzida (RSI) por microrganismos também está interligada com a homeostase de Fe. Desse modo, elicitores microbianos de RSI podem induzir respostas de deficiência de Fe nas raízes do hospedeiro, incluindo aumento na atividade da redutase férrica, acidificação da rizosfera, liberação de fenóis e flavinas e desenvolvimento de pêlos radiculares (Romera et al., 2019). Interessantemente, o indutor químico da resistência sistêmica adquirida (RSA) ácido β-amino butírico (BABA) é capaz de quelar Fe e o efeito protetor do BABA contra *Botrytis cinerea* em arabisopsis foi mimetizado pela deficiência de Fe. Portanto, a deficiência de Fe causada por BABA confere à planta um “estado de alerta”, participando na resistência de plantas a patógenos (Koen et al., 2014).

## 3.2. Manganês

O manganês (Mn) está envolvido integralmente em importantes funções bioquímicas e fisiológicas das plantas. O elemento desempenha um papel fundamental durante as reações redox e transferência de elétrons na fotossíntese, que resulta na separação da água e captação de luz durante a reação da fase clara. O Mn é componente da superóxido dismutase, enzima envolvida na remoção de espécies reativas de oxigênio. No entanto, o Mn atua primariamente como ativador de enzimas, a exemplo de desidrogenases, transferases, hidroxilases e descarboxilases. Grande parte dessas enzimas está envolvida no metabolismo do C e do N. O Mn também ativa diversas enzimas envolvidas na síntese de metabólitos secundários que resultam na produção de compostos de defesa, incluindo fenóis, glicosídeos cianogênicos e lignina (Rice, 2007; Thompson & Huber, 2007; Figura 6).



**Figura 6.** Rotas bioquímicas importantes em que o manganês (Mn) está envolvido. IAA = ácido indol acético. CoA = coenzima A (Adaptado de Thompson & Huber, 2007).

Plantas doentes exibem alterações nas concentrações dos elementos minerais nos tecidos e a concentração de Mn é alterada em muitas doenças causadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus. Tais alterações ocorrem em nível micro nas lesões ou nos sítios de penetração de patógenos. Acúmulo de Mn tem sido demonstrado ocorrer nessas áreas em cevada infectada por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, em raízes de trigo infectadas por *G. graminis* e em arroz infectado por *P. oryzae*. Interessantemente, o Mn acumula na forma de  $Mn^{+4}$  em tecidos necróticos de plantas de trigo com o mal do pé, mas na forma de  $Mn^{+2}$  em tecidos saudáveis. O mesmo parece ocorrer com a brusone do arroz (Thompson & Huber, 2007).

As evidências da relação do Mn e a severidade de doenças têm sido baseadas na correlação entre as concentrações de Mn em tecidos doentes *versus* saudáveis e plantas suscetíveis *versus* resistentes. A maioria das doenças fúngicas e bacterianas são reduzidas com o aumento na disponibilidade de Mn, mas doenças virais podem ser intensificadas por altos níveis de Mn nos tecidos das plantas. A Tabela 4 demonstra exemplos de doenças cuja intensidade é reduzida pelo fornecimento de Mn.

**Tabela 4.** Doenças de plantas que foram demonstradas terem sua intensidade decrescida com o aumento na disponibilidade de manganês. (Adaptado de Thompson & Huber, 2007).

Grupo de patógeno	Doença	Patógeno
Fungos	Tombamento de plantas, podridões radiculares e de caule	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Curvularia ramosa</i> , <i>Fomes annosus</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Gaeumannomyces graminis</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>
	Murcha	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium udum</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , <i>Verticillium dahliae</i>
	Cancro	<i>Hypoxylon mammatum</i>
	Antracnose	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
	Mancha foliar	<i>Alternaria solani</i> , <i>Bipolaris oryzae</i> , <i>Cercospora</i> spp., <i>Helminthosporium</i> spp., <i>Mycosphaerella citri</i> , <i>Pyricularia oryzae</i>
	Ferrugem	<i>Puccinia graminis</i> , <i>Puccinia recondita</i>
	Oídio	<i>Erysiphe cichoracearum</i> , <i>Erysiphe cruciferarum</i> , <i>Erysiphe glycines</i> , <i>Erysiphe graminis</i> , <i>Erysiphe polygoni</i>
	Carvão	<i>Ustilago scitaminea</i>
Oomicetos	Requeima	<i>Phytophthora infestans</i>
	Míldios	<i>Peronosclerospora sorghi</i> , <i>Peronospora lathyri-palustris</i>
Bactérias	Podridão radicular	<i>Streptomyces ipomoeae</i>
	Sarna	<i>Streptomyces scabies</i>
	Crestamento bacteriano	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas oryzae</i>
Vírus	Mosaico	<i>Tobacco mosaic virus</i>

Fatores ambientais que alteram a disponibilidade de Mn, incluindo o pH, forma de N predominante, potencial redox, teor de matéria orgânica, temperatura do solo e atividade microbiana afetam a severidade de doenças. É importante ressaltar que o Mn é absorvido como  $Mn^{+2}$ , e a sua oxidação a  $Mn^{+4}$  compromete o estado nutricional de Mn na planta. As doenças nas quais fatores ambientais e a conseqüente alteração na disponibilidade de Mn interferem na sua intensidade incluem o mal do pé dos cereais, brusone do arroz, podridão de *Phymatotrichum* em algodoeiro e murcha de *Verticillium*. A brusone é menos severa em arroz de “terras baixas” do que em arroz de “terras altas”; as condições de “terras baixas” aumentam a disponibilidade de  $Mn^{+2}$ ,

devido ao menor potencial redox do solo inundado. Genes presentes em milho e soja que conferem tolerância ao glifosato reduzem a absorção e o uso de Mn pelas plantas, o que pode predispor-las ao ataque por patógenos. Em adição, existem algumas linhas de evidência de que o glifosato reduz a população de bactérias redutoras do  $Mn^{+4}$  no solo, reduzindo a disponibilidade de  $Mn^{+2}$  para ser absorvido pelas plantas. Uma vez no interior da planta, o glifosato também pode atuar como agente complexante de Mn, reduzindo sua disponibilidade para o metabolismo vegetal. O mal do pé em cereais raramente é severo em solos ácidos, exceto em solos naturalmente deficientes em Mn. Contudo, a aplicação demasiada de calcário e o conseqüente aumento do pH, aumenta o mal do pé por reduzir a absorção de Mn pelas plantas. Práticas culturais, como diminuição do pH, irrigação e fertilização com Mn aumentam a disponibilidade do nutriente às plantas, mitigando a sarna comum da batata. O cultivo de gramíneas, como a braquiária, nas entrelinhas de citros e o subseqüente corte forma um *mulching* que inibe a nitrificação e aumenta a absorção de Mn pelas plantas de citros. Essa prática apresenta um papel chave na redução da severidade da clorose variegada do citros causada por *Xylella fastidiosa* (Thompson & Huber, 2007).

A aplicação de Mn para corrigir deficiências reduz a severidade de diversas doenças, mas sua eficiência depende da doença e do método de aplicação do nutriente. O Mn aplicado no solo pode ser rapidamente imobilizado devido à atividade de microrganismos oxidantes, porém a aplicação foliar do nutriente pode ter um efeito limitado em patógenos de solo devido à imobilidade do Mn na planta. De qualquer maneira, a manipulação de práticas culturais e o suprimento com Mn para aumentar a quantidade do elemento nos tecidos das plantas tem mostrado efeito positivo na redução de doenças. Aplicações foliares de Mn reduziram a severidade de oídio e ferrugem em cereais de inverno e a mancha parda do arroz. O Mn combinado com fosfito aplicado foliarmente suprimiu a antracnose e o crestamento bacteriano comum em feijoeiro, a manca de olho pardo e a ferrugem em cafeeiro e o mofo branco em soja (Costa et al., 2018; Monteiro et al., 2016; Novaes et al., 2019). O tombamento de plântulas de soja, causado por *Pythium*, também foi reduzido quando as sementes foram tratadas com fosfito de Mn (Carmona et al., 2018).

Devido ao seu envolvimento no metabolismo do C, N e metabolismo secundário, existem diversos mecanismos potenciais pelos quais o Mn pode atuar direta ou indiretamente na supressão de doenças de plantas. Diretamente, o Mn pode inibir o crescimento, esporulação, replicação e a produção de enzimas e toxinas pelos patógenos. Os efeitos indiretos incluem a modificação nos exsudatos radiculares e no metabolismo vegetal, alterando a atividade do patógeno. No entanto, talvez o principal efeito do Mn seja devido ao seu papel no aumento da produção de barreiras químicas (fenóis e fitoalexinas) e físicas (calose e lignina) pelo hospedeiro em resposta ao ataque por patógenos (Thompson & Huber, 2007).

### 3.3. Zinco

A despeito de constituir menos de 1% da massa das plantas e microrganismos, o zinco (Zn) desempenha um papel crucial como centro catalítico de centenas de enzi-

mas e outras proteínas, sendo o metal mais prevalente em enzimas microbianas. As proteínas contendo Zn possuem a capacidade de ligação ao DNA, atuando na transcrição de genes envolvidos desde o metabolismo e reparo da célula até a biossíntese de compostos de defesa pelas plantas. As enzimas contendo Zn exercem função fundamental na ciclagem de elementos primários, como H, O, C, N e S. O Zn interfere no balanço hormonal das plantas, regulando a síntese de auxina, giberelina e etileno. A síntese e atividade da clorofila, indução da fluorescência da clorofila no fotossistema II e transporte fotossintético de elétrons no cloroplasto são dependentes de Zn. Além disso, o Zn regula a abertura estomática; a deficiência de Zn reduz a condutância estomática, limitando o influxo de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (Rice, 2007).

Uma enzima citosólica, CuZnSOD, que está envolvida na remoção de espécies reativas de oxigênio, foi positivamente regulada em cevada durante a interação com o fungo biotrófico *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* e sua atividade foi associada com a resistência à mancha em rede. Por outro lado, a resposta ao fungo hemibiotrófico (*P. oryzae*) e e biotrófico (*B. graminis* f. sp. *hordei*), não foi afetada pela supressão da atividade da enzima, mostrando a importância da enzima na manutenção do estado redox citosólico e na regulação diferencial de patógenos com diferentes estilos de vida (Lightfoot et al., 2017). Os fatores de transcrição WRKY contendo Zn são reguladores primários da expressão de genes de defesa, contribuindo para a resistência de plantas a patógenos. Na interação arroz-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, dois fatores de transcrição dessa família se ligam ao promotor do gene de defesa *OsPR10a* e plantas transgênicas de arroz super expressando o gene *OsWRKY6* foram mais resistentes à bactéria (Choi et al., 2015).

Altas concentrações de Zn são conhecidas ter um efeito fungicida e podem ser interessantes no manejo de doenças se a sensibilidade dos patógenos ao Zn for maior do que a das plantas. A interação compatível entre *Noccaea caerulescens* e *Alternaria solani* em baixas concentrações de Zn tornou-se incompatível quando elevadas doses do nutriente foram utilizadas. As plantas de *N. caerulescens* crescidas durante cinco semanas em solução nutritiva contendo 102 µM de Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentaram 5.000 µg de Zn g<sup>-1</sup> de massa seca, o que correspondeu a 10 mM de Zn na seiva celular, concentração 20 vezes maior do que a EC<sub>50</sub> para *A. solani* (Gallego et al., 2017).

Apesar da redução na intensidade de doenças foliares, o efeito do Zn sobre patógenos de solo é ainda mais pronunciado. O aumento na concentração de Zn no solo de 0 para 1,6 mg kg<sup>-1</sup> reduziu doenças radiculares do tomateiro causadas por *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* (Siddiqui et al., 2012). Da mesma forma, a podridão cinzenta do milho, causada por *M. phaseolina* foi diminuída pelo Zn. Uma mistura de sulfato de zinco e óxido de zinco aplicada no sulco reduziu a incidência da sarna pulverulenta da batata, causada por *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*.

Algumas linhas de evidência sugerem que o Zn pode desempenhar um papel indireto em doenças de plantas, por estimular a atividade de antagonistas aos patógenos. O Zn é capaz de modular a produção de alguns antibióticos. O Zn estimula a produção de fenazina por *P. fluorescens* e o conteúdo de Zn no solo foi positivamente correlacionado com a eficiência de biocontrole por um isolado da bactéria. O Zn intensifica a produção de antibióticos policetídeos, a exemplo do 2,4-diacetilflogluciol por *P. fluorescens*. A produção do biocida cianeto de hidrogênio, que está diretamente rela-



cionada à efetividade do biocontrole, é intensificada pelo Zn. O Zn estimula a síntese de proteínas e dos sideróforos quelantes de Fe em diferentes agentes de biocontrole, como *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Bacillus thuringiensis*. Além disso, a produção de metabólitos nematicidas e a atividade de biocontrole de *P. fluorescens* contra *Meloidogyne javanica* foram estimuladas pelo Zn (Duffy, 2007).

### 3.4. Cobre

O cobre (Cu) participa de vários processos fisiológicos, incluindo fotossíntese, respiração, distribuição de carboidratos, redução e fixação de N, metabolismo de proteínas e da parede celular, além de influenciar a permeabilidade dos vasos do xilema à água e a produção de DNA e RNA. O Cu é o componente metálico de três tipos de proteínas: plastocianinas, envolvidas na transferência de elétrons; peroxidases, que oxidam fenóis; e proteínas multi-Cu, que atuam como oxidases (Rice, 2007).

O Cu tem um longo histórico de uso como pesticida. A calda bordalesa, que consiste numa combinação de cal hidratada e sulfato de cobre, foi um dos primeiros fungicidas empregados na agricultura, originalmente usado no controle do míldio da videira. Outros compostos à base de Cu foram desenvolvidos mais tarde para uso na agricultura, chamados de compostos fixos de cobre. Esses compostos incluem o óxido, hidróxido e oxiclureto de Cu e têm sido empregados no controle de doenças bacterianas em citros, feijoeiro e tomateiro, mancha de *Cercospora* em beterraba açucareira, pinta preta e requeima em batata e, mais recentemente, no controle da ferrugem asiática da soja em combinação com fungicidas sítio-específicos.

A despeito da ação fungicida do Cu, o nutriente também pode intensificar a resistência das plantas a doenças, conforme evidenciado observações de que doses sub-biocidas de Cu aplicado no solo reduziram a intensidade de doenças foliares. Folhas de macieira resistentes a *Erwinia amylovora* apresentaram maior conteúdo de Cu do que folhas suscetíveis. Flavonoides constituem uma classe de compostos químicos importantes na resistência de plantas a doenças, e a chalcona sintase, uma enzima chave na rota metabólica para a produção de flavonóides foi induzida por cloreto de cobre. O Cu também é requerido para a produção de peróxido de hidrogênio via amino oxidases em ervilha em resposta à infecção por *Aschochyta rabiei*. Peroxidases inibidas pelo Cu também contribuem para aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, aumentando a resistência de plantas a patógenos. A anormalidade de flores de trigo e cevada decorrente da baixa disponibilidade de Cu diminuem a produtividade e predis põe as plantas ao ataque de *Claviceps purpurea*, agente causal do ergot. A ativação da polifenol oxidase por Cu tem um papel crucial para a geração de quinonas, que possuem elevada atividade antimicrobiana. Por outro lado, o Cu é importante para a virulência de patógenos; a deficiência de Cu tornou *Colletotrichum lindemuthianum* avirulento ao feijoeiro. Portanto, o Cu influencia a interação planta-patógeno de três formas: apresentando efeito fungicida, intensificando a resistência do hospedeiro ou reduzindo a virulência do patógeno (Evans et al., 2007; Zambolim et al., 2012).

### 3.5. Cloro

Muito tempo antes do reconhecimento do seu papel no crescimento das plantas e no manejo de doenças, o cloro (Cl) foi utilizado como íon acompanhante de fertilizantes contendo N-NH<sub>4</sub>, K e Ca. Devido à elevada disponibilidade de Cl na maioria dos solos, sua essencialidade como um micronutriente na fotossíntese demorou a ser conclusivamente demonstrada.

A influência do Cl sobre doenças de plantas tem sido negligenciada devido ao efeito ser atribuído somente ao cátion acompanhante. Por exemplo, enquanto o benefício do K na supressão de doenças de plantas tem sido bem documentado, estudos que examinaram diferentes fontes de K mostraram que somente KCl teve efeito supressor sobre doenças. Tem sido demonstrado que a fertilização com Cl tem um importante papel no aumento da resistência ou tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos, com limitado efeito na ausência de estresse. No solo, doses elevadas de Cl inibem a nitrificação, aumentam a disponibilidade de Mn e aumentam a população de microrganismos benéficos, mudanças que podem explicar parcialmente o controle de doenças derivado do Cl (Elmer, 2007).

A maioria dos relatos de supressão de doenças pelo Cl envolve monocotiledôneas, como aspargo, coqueiro, milheto, milho, tamareira e trigo embora dicotiledôneas como o algodoeiro e a soja também possam ser beneficiadas. Uma combinação de NO<sub>3</sub> e NaCl reduziu a porcentagem de lesões nas raízes e a colonização por *Fusarium* spp. em raízes de aspargo. A aplicação de KCl (188 kg ha<sup>-1</sup>) reduziu a podridão radicular causada por *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium culmorum* em trigo; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> teve pouco efeito sobre a doença, enquanto que NaCl foi mais efetivo do que KCl. A aplicação foliar de KCl (0,64M) controlou em 50% o oídio do trigo e a ferrugem da cevada. O Cl também foi o íon envolvido no controle da podridão do colmo do milho; os sintomas de doenças decresceram cerca de 50% com o aumento de 0 para 54 kg ha<sup>-1</sup> de KCl, mas não houve efeito do K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De maneira similar, KCl decresceu o número de cistos de *Heterodera glycines* em raízes de soja. Fertilizantes cloretados aplicados em faixa decresceram o mal do pé e aumentaram o vigor de plantas de trigo (Elmer, 2007).

### 3.6. Molibdênio

A importância do molibdênio (Mo) na fisiologia da planta está relacionada à sua habilidade de passar por mudanças na valência (transferência de elétrons), atuando como cofator enzimático. O Mo possui papel vital no metabolismo do N. O nutriente está envolvido na redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por atuar como cofator da enzima nitrato redutase, bem como na fixação biológica e assimilação de N por ser constituinte das enzimas nitrogenase e xantina desidrogenase (Rice, 2007).

O Mo pode ter um efeito direto sobre patógenos. Pelo fato de o elemento ser um metal pesado, o Mo pode inativar proteínas essenciais a patógenos, causando a sua desnaturação. Tem sido reconhecido que o metal inativa a proteína do capsídeo em vírus e algumas proteínas em zoósporos de *Phytophthora*, nesse caso resultando em

supressividade do solo. Além disso, o Mo suprime a produção da toxina roridina A por *Myrothecium roridum*, o que pode comprometer a sua patogênese (Graham & Stangoulis, 2007).

Alguns estudos têm mostrado a habilidade do Mo em modificar a fisiologia do hospedeiro, aumentando a sua resistência a doenças. O tratamento de raízes com Mo suprimiu a murcha de *Verticillium* em tomateiro. Em feijoeiro, uma única aplicação de Mo 25 dias após a semeadura decresceu a área abaixo da curva de progresso da mancha angular em 38% e aumentou a área abaixo da curva de progresso da área foliar em 20%, a fotossíntese em 26% e a produtividade em 51%; a combinação do Mo com fungicida conferiu substancial controle da mancha angular (Jesus Júnior et al., 2004). A aplicação foliar de molibdato de sódio (NaMo) aos 27 dias após a semeadura isoladamente ou com silicato de potássio (KSi) decresceu os sintomas da antracnose e aumentou a produtividade do feijoeiro (Polanco et al., 2014).

### 3.7. Boro

Cerca de 90% do boro (B) encontra-se na parede celular, onde o elemento confere ligações estruturais devido à sua facilidade de formar complexos diéster na parede celular com grupos hidroxil de dióis e polióis da parede celular para formar complexos de polissacarídeos pécticos. O B é indispensável para a manutenção da funcionalidade da membrana celular e da atividade de ATPases bombeadoras de prótons ligadas a membrana. O B, em associação com o Ca está envolvido com a reprodução, particularmente com o crescimento do tubo polínico. Ademais, o B está envolvido na síntese de uracila, influenciando os processos de transcrição e tradução da célula e, por conseguinte, a síntese de proteínas e processos de crescimento meristemático (Rice, 2007).

A importância do B na resistência de plantas a patógenos está relacionado ao efeito do elemento na síntese de lignina e compostos fenólicos. Além disso, devido ao seu papel de estabilização da membrana plasmática, a exsudação de açúcares e aminoácidos pelas raízes é limitada, diminuindo a infecção por patógenos de solo. A fertilização com B reduz a infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve-flor, *Sclerospora graminicola* em milho, *Rhizoctonia solani* em feijoeiro mungo e *Plasmodiophora brassicae* em *Brassica* spp. (Stangoulis & Graham, 2007).

Combinações de B e Fe suprimiram o mal do Panamá em bananeira através de múltiplos mecanismos (Dong et al., 2016). Altas concentrações de B e de Fe inibiram a taxa de germinação de conídios e o crescimento de *F. oxysporum*, decrescendo o número de plantas infectadas. Além disso, altas concentrações de B e Fe decresceram a produção de ácido fusárico por *F. oxysporum* e aumentaram o conteúdo de manitol nas plantas, que, por sua vez, decresceu a produção da toxina em plantas infectadas e reduziu o índice de doença devido ao fator de virulência da toxina. Plantas de tomateiro crescidas em solução nutritiva com doses elevadas de B e inoculadas com *Ralstonia solanacearum* tiveram menor severidade da murcha, maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e maior atividade da peroxidase e polifenoloxidase do que plantas crescidas em doses reduzidas de B (Jiang et al., 2016). O B foi sugerido como um potencial fungicida para o controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae*, pois o elemento foi encontrado afetar dramaticamente

mente o esporângio e inibir o crescimento micelial do oomiceto (Qiao et al., 2017). Esse efeito foi atribuído à inibição do gene *csn4* de *P. nicotianae* pelo B, resultando em estresse oxidativo no patógeno.

### 3.8. Níquel

O níquel (Ni) é requerido para a atividade catalítica de enzimas, incluindo urease, superóxido dismutase, NiFe hidrogenases, metil coenzima-M redutase, monóxido de carbono desidrogenase, acetil coenzima A sintase e RNase A (Harasim & Filipek, 2015) e também está envolvido no metabolismo de ureídeos e aminoácidos (Bai et al., 2006).

O Ni influencia as doenças de plantas por mecanismos diretos e indiretos. Existem evidências de que o Ni apresenta atividade fungicida quando aplicado em soluções aquosas contendo concentrações maiores que 200 mg L<sup>-1</sup>. Contudo, a potencialização das defesas vegetais parece ser o principal mecanismo. Baixas concentrações de sais de Ni reduziram a intensidade da mancha parda e da brusone em arroz e da ferrugem em amendoim (Wood & Reilly, 2007).

Os sais de Ni são particularmente efetivos no controle de ferrugens. O número de pústulas da ferrugem em *hemerocallis*, causada por *Puccinia hemerocallidis*, foi reduzido linearmente com o aumento na concentração de sulfato de níquel aplicado foliarmente; houve supressão da doença em 90% pelo Ni aplicado a 200 mg L<sup>-1</sup>, concentração que não afetou a germinação dos uredósporos, indicando que o Ni intensificou a resistência do *hemerocallis* à ferrugem (Wood & Reilly, 2007). A aplicação foliar de Ni (0,19 g de NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O L<sup>-1</sup>) três dias antes da inoculação com *P. pachyrhizi* reduziu em 35% a severidade da ferrugem asiática da soja. Análises bioquímicas e moleculares mostraram que o Ni aumentou a concentração de lignina, a atividade da β-1,3-glucoamilase e a expressão dos genes da urease, fenilalanina amônia liase, quitinase e proteína 1 relacionada à patogênese, indicando o potencial do Ni para aumentar a resistência da soja à ferrugem asiática e complementar outros métodos de controle dentro do contexto de agricultura sustentável (Einhardt et al., 2020). De maneira similar, a aplicação de Ni (40 g ha<sup>-1</sup>) combinado com fungicida reduziu a severidade do oídio da soja, causado por *Microspheera diffusa*, em 99% e aumentou a atividade das enzimas catalase, peroxidase, superóxido dismutase e urease (Barcelos et al., 2018).

## 4. Elemento benéfico

### 4.1. Silício

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante da crosta terrestre. Embora ele não seja considerado um elemento essencial ao crescimento das plantas, existem

numerosos relatos do efeito benéfico do suprimento com Si na atenuação de estresses abióticos, como a toxidez por metais pesados, radiação ultra-violeta, estresses hídrico, térmico e salino, e estresses bióticos, incluindo o ataque por pragas e patógenos. Há uma extensa lista de doenças cuja intensidade tem sido reduzida devido ao Si, como tombamentos, crestamentos foliares, manchas foliares, galhas, oídios, podridões radiculares, ferrugens e murchas causadas por diferentes gêneros de bactérias, fungos, nematoides, oomicetos e vírus (Tabela 5) em culturas de importância econômica (Debona et al., 2017b).

**Tabela 5.** Gêneros de patógenos causadores de doenças de sementes, de solo e foliares que têm sua infecção limitada pelo suprimento com silício. (Adaptado de Debona et al., 2017b).

Grupo de Patógeno	Gênero
Fungos	<i>Alternaria, Bipolaris, Blumeria, Botrytis, Bremia, Cylindrocladium, Cercospora, Colletotrichum, Corynespora, Diaporthe, Didymella, Drechslera, Erysiphe, Fusarium, Ganoderma, Hemileia, Leptosphaeria, Magnaporthe, Microdochium, Monilinia, Monographella, Mycosphaerella, Oculimacula, Oidiopsis, Oidium, Penicillium, Pestalotia, Phakopsora, Phomopsis, Podosphaera, Pseudocercospora, Puccinia, Pyricularia, Ramularia, Rhizoctonia, Sclerospora, Sclerotinia, Septoria, Sphaerotheca, Trichothecium, Uncinula e Ustilago</i>
Oomicetos	<i>Phytophthora e Pythium</i>
Bactérias	<i>Acidovorax, Pseudomonas, Ralstonia e Xanthomonas</i>
Nematoide	<i>Meloidogyne</i>
Vírus	Nepovirus

Plantas capazes de acumular grandes quantidades de Si em seus tecidos devido à presença de transportadores de Si, como o arroz, são largamente beneficiadas pelo suprimento com Si. De fato, diversos estudos têm demonstrado que a adubação silicatada em arroz é tão ou mais eficiente que a aplicação de fungicidas para o controle de doenças, incluindo a brusone e a mancha parda (Datnoff et al., 2007; Debona et al., 2017b).

Duas hipóteses têm sido levantadas para explicar a redução na intensidade de doenças mediada pelo Si. A hipótese da barreira física relaciona o efeito do Si à sua deposição e polimerização sob a cutícula, na parede celular, e dentro das células bulbiformes, foi primeiramente proposta para explicar a redução na severidade da brusone em arroz. Estudos subsequentes forneceram suporte à hipótese de que o Si desempenha um papel ativo na resistência de plantas a doenças. Nesse caso, o Si foi demonstrado aumentar as concentrações de fitoalexinas, fenóis, flavonóides e lignina, bem como a atividade de enzimas e/ou a expressão de genes de defesa ( $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia liase, peroxidase, polifenoloxidase, quitinase) e antioxidativos (catalase, glutatona redutase, glutatona-S-transferase, peroxidase do ascorbato e da glutatona e superóxido dismutase). Rotas de sinalização de defesa dependentes dos ácidos salicílico e jasmônico e etileno também são intensificadas pelo Si. Finalmente, muitas disfunções fisiológicas em plantas infectadas por patógenos, incluindo disfunções na fotossíntese, têm sido atenuadas pelo suprimento com Si (Debona et al., 2017b).



## 5. Conclusões e Perspectivas

A necessidade de aumento na produtividade das culturas para alimentar uma população sempre crescente associado à demanda da sociedade por práticas de produção mais sustentáveis tornam a nutrição mineral um fator chave para satisfazer essas necessidades. Dentro desse contexto, o suprimento adequado com nutrientes é determinante para a redução da intensidade de doenças de plantas, reduzindo a demanda por defensivos agrícolas. Fatores como dose, forma, momento e modo de aplicação dos nutrientes são determinantes no efeito que a nutrição exerce sobre as doenças. Assim, um nutriente pode reduzir a intensidade de uma doença e aumentar a intensidade de outra. Condições edafoclimáticas, como pH, temperatura, umidade e microrganismos também interferem nessa resposta. Os nutrientes apresentam diversos mecanismos de atuação sobre as doenças, incluindo seu efeito no hospedeiro (fortalecimento ou intensificação de barreiras estruturais e bioquímicas), patógeno (efeito fungicida), ambiente (alterações no microclima) e microrganismos (sinergismo com agentes de controle biológico). O aumento na eficiência da nutrição mineral é um desafio a ser enfrentado. Nesse particular, diferentes estratégias devem ser perseguidas. Primeiro, o melhoramento genético, via métodos tradicionais ou biotecnologia, visando o aumento na capacidade de absorção e assimilação dos nutrientes parece fundamental. A seleção de microrganismos capazes de transformar formas inacessíveis dos nutrientes em formas acessíveis pelas plantas também será de suma importância. Finalmente, o avanço na formulação de nutrientes através da nanotecnologia e do emprego de formas mais eficientes visando à redução de perdas para o ambiente, aumentará o benefício da nutrição mineral às plantas e minimizará o uso de recursos e a contaminação ambiental.

## 6. Referências bibliográficas

- ALVAREZ, C.; BERMUDEZ, M.A.; ROMERO, L.C.; GOTOR, C.; GARCIA, I. Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. **New Phytologist**, v. 193, p. 165-177, 2012.
- ANDERSON, W.C.; GABRIELSON, R.L.; HAGLUND, W.A.; BAKER, A. Clubroot control in crucifers with hydrated lime and PCNB. **Plant Disease Reports**, v. 60, p. 561-565, 1976.
- ANDRADE, P.M.J. **Efeito do nitrogênio, fósforo e potássio sobre o desenvolvimento da ferrugem da cana de açúcar (Puccinia melanocephala H. & P. Sidow)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 1991.
- ARFAOUI, A.; HADRAMI, A.E.; ADAM, L.R.; DAAYF, F. Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 93, p. 12-21, 2016.
- ARFAOUI, A.; HADRAMI, A.E.; DAAYF, F. Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, p.121-128, 2018.
- BAI, C., REILLY, C.C.; WOOD, B.W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, v. 140, p. 433-443, 2006.

- BALARDIN, R.S., DALLAGNOL, L.J., DIDONÉ, H.T., & NAVARINI, L. Influência do fósforo e do potássio na severidade da ferrugem da soja *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 462-467, 2006.
- BARCELOS, J.P.Q. et al. Impact of foliar nickel application increase urease activity enhances antioxidant metabolism, and control powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in soybean plants. **Plant Pathology**, v. 67, p. 1502-1513, 2018.
- BECOT, S.; PAJOT, E.; LECORRE, D.; MONOT, C.; SILUE, D. Phytogard (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, v.1 9, p. 417-425, 2000.
- BLOEM, E.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Milestones in plant sulfur research on sulfur-induced-resistance (SIR) in Europe. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, A. 779, 2015.
- BOLFARINI, A.C.B.; LEONEL, S.; LEONEL, M.; FERREIRA, R.B; SILVA, M.S. Incidência do “mal-do-panamá” e aspectos nutricionais da bananeira maçã, cultivada sob doses de fósforo. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 11, p. 33-45, 2015.
- BORRERO, C.; TRILLAS, M.I.; DELGADO, A.; AVILÉS, M. Effect of ammonium/nitrate ratio in nutrient solution on control of *Fusarium* wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. **Plant Pathology**, v. 61, p. 132-139, 2012.
- CARMONA, M.A.; SAUTUA, F.J.; GRIJALBA, P.E.; CASSINA, M.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, O. Effect of potassium and manganese phosphites in the control of *Pythium* damping-off in soybean: a feasible alternative to fungicide seed treatments. **Pest Management Science**, v. 74, p. 366-374, 2018.
- CASTANO, J.J.; KERNKAMP, M.F. The influence of certain plant nutrients on infection of soybeans by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 46, p. 326-328, 1956.
- CHOI, C. et al. Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesis-related (PR) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens. **New Phytologist**, v. 208, p. 846-859, 2015.
- COSTA, B.H.G. et al. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, v. 166, p. 95-102, 2018.
- DATNOFF, L.E.; RODRIGUES, F.A.; SEEBOLD, K.W. Silicon and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 2007, p. 233-246.
- DEBONA, D.; CRUZ, M.F.A.; RODRIGUES, F.A. Calcium-triggered accumulation of defense-related transcripts enhances wheat resistance to leaf blast. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 309-314, 2017a.
- DEBONA, D.; RIOS, J.A.; NASCIMENTO, K.J.L.; SILVA, L.C.; RODRIGUES, F.A. Influence of magnesium on physiological responses of wheat infected by *Pyricularia oryzae*. **Plant Pathology**, v.65, p. 114-123, 2016.
- DEBONA, D.; RODRIGUES, F.A.; DATNOFF L.E. Silicon's role in abiotic and biotic plant stresses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 85-107, 2017b.
- DONG, X.; WANG, M.; LING, N.; SHEN, Q.; GUO, S. Effects of iron and boron combinations on the suppression of *Fusarium* wilt in banana. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38944, 2016.
- DUFFY, B. Zinc and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. **The American Phytopathological Society**, 2007, p. 155-175.

- EDGINGTON, V.; WALKER, J.C. Influence of calcium and boron nutrition on development of Fusarium with of tomato. **Phytopathology**, v. 48, p. 324-326, 1958.
- EHRET, D.L.; MENZIES, J.G.; BOGDANOFF, C.; UTKHEDE, R.S.; FREY, B. Foliar applications of fertilizer salts inhibit powdery mildew on tomato. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 437-444, 2002.
- EINHARDT, A.M.; FERREIRA, S.; HAWERROTH, C.; VALADARES, S.V.; RODRIGUES, F.A. Nickel potentiates soybean resistance against infection by Phakopsora pachyrhizi. **Plant Pathology**, v. 69, p. 849-859, 2020.
- ELMER, W.H. Chloride and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 189-202.
- EVANS, I.; SOLBERG, E.; HUBER, D.M. Copper and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (org.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 177-188.
- EXPERT, D. Iron and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 119-137.
- FARIA, J.C.,D.; PRABHU, A.S. Relation between nitrogen fertilization and brown spot of rice in cerrado soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, p. 1377-1379, 1983.
- FILIPPI, M.C.; PRABHU, A.S. Relationship between panicle blast severity and mineral nutrition content of plant tissue in upland rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 1577-1587, 1998.
- GRAHAM, R.D.; STANGOULIS, C.R. Molybdenum and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 203-205.
- GU, S. et al. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 1002-1010, 2020.
- HALLOCK, D.L.; GARREN, K.H. Pod breakdown, yield and grade of Virginia type peanuts as affected by Ca, Mg and K sulfates. **Agronomy Journal**, v. 60, p. 253-257, 1968.
- HANEKLAUS, S.; BLOEM, E.; SCHNUG, E. Sulfur and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 101-118.
- HARASIM, P.; FILIPEK, T. Nickel in the environment. **Journal of Elementology**, v. 20, p. 525-534, 2015.
- HUBER, D.M.; THOMPSON, I.A. Nitrogen and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 31-44.
- HUBER, D.M.; WATSON, R.D. Nitrogen form and plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 139-165, 1974.
- HUBER, D.M. Introduction. In: ENGELHARD, A.W. (ed.). **Soilborne plant pathogens: management of diseases with macro- and microelements**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 1989, p. 1-8.
- HUBER, D.M. The role of mineral nutrition in defense. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (eds.). **Plant pathology: an advanced treatise**. New York, NY. Academic Press, 1980, p.381-406.
- JESUS JÚNIOR, W.C. et al. Management of angular leaf spot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with molybdenum and fungicide. **Agronomy Journal**, v. 96, p. 665-670, 2004.

- JIANG, J.F.; WAN, X.; LI, J.G.; DONG, Y.H. Effect of boron nutrition on resistance response of tomato against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Plant Pathology**, v.98, p. 117-122, 2016.
- JONES, J.B.; HUBER, D.M. Magnesium and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 95-100.
- JONES, J.B.; WOLTZ, S.S.; JONES J.P. Effect of foliar and soil magnesium application on bacterial leaf spot of peppers. **Plant Disease**, v. 67, p. 623-624, 1983.
- JONES, J.P.; ENGELHARD, A.W.; WOLTZ, S.S. Management of Fusarium wilt of vegetables and ornamentals by macro and microelements. In: ENGELHARD, A.W. (ed.) **Soilborne plant pathogens: management of diseases with macro- and microelements**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 1989, p. 18-32.
- KOEN, E. et al.  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA)-induced resistance in *Arabidopsis thaliana*: link with iron homeostasis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p. 1226-1240, 2014.
- LIGHTFOOT, D.J.; MCGRANN, G.R. D.; ABLE, A.J. The role of a cytosolic superoxide dismutase in barley-pathogen interactions. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 323-335, 2017.
- MCGUIRE, R.G.; KELMAN, A. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. **Phytopathology**, v. 76, p. 401-406, 1986.
- MONTEIRO, A.C.A. et al. Manganese phosphite in coffee defense against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1043-1053, 2016.
- MOREIRA, W.R.; RESENDE, R.S.; RODRIGUES, F.A.; ANDRADE, C.C.L.; NASCIMENTO, C.W.A. Influência do magnésio na resistência do arroz à mancha parda. **Bragantia**, v. 72, p. 154-161, 2013.
- NOVAES, M.I.C.; DEBONA, D.; FAGUNDES-NACARATH, I.R.F.; BRÁS, V.V.; RODRIGUES, F.A. Physiological and biochemical responses of soybean to white mold affected by manganese phosphite and fluazinam. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, p. 186, 2019.
- OROBER, M.; SIEGRIST, J.; BUCHENAUER, H. Mechanism of phosphate induced disease resistance in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, v. 8, p. 345-353, 2002.
- POLANCO, L.R. et al. Management of anthracnose in common bean by foliar sprays of potassium silicate, sodium molybdate, and fungicide. **Plant Disease**, v. 98, p. 84-89, 2014.
- PRABHU, A.S.; FAGERIA, N.K.; BERNI, R.F.; RODRIGUES, F.A. Phosphorus and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 2007a, p. 45-55.
- PRABHU, A.S.; FAGERIA, N.K.; HUBER, D.M.; RODRIGUES, F.A. Potassium and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 2007b, p. 57-78.
- QIAO, Y.; YANG, S.; WANG, H.; LI, Z. Effect of boron on mycelial growth, sporangiogenesis and zoosporegenesis of *Phytophthora nicotianae* and the possible inhibitory mechanisms. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, 945-952, 2017.
- RAHMAN, M.; PUNJA, Z.K. Calcium and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 79-93.



- RESENDE, M.L.V. et al. Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium* wilt (*Verticillium dahlia* Kleb.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, p. 347-359, 1996.
- REUVENI, R.; DOR, G.; RAVIV, M.; REUVENI, M.; TUZUN, S. Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponic system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, v. 19, p. 355-361, 2000.
- RICE, R.W. The physiological role of minerals in the plant. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 2007, p. 9-29.
- RODRIGUES, F.A.; CARVALHO, E.M.; VALE, F.X.R. Severidade da podridão-radicular de *Rhizoctonia* do feijoeiro influenciada pela calagem, e pelas fontes e doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1247-1252, 2002.
- ROMERA, F.J. et al. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe Deficiency Responses in Dicot Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 287, 2019.
- SALAC, I.; HANEKLAUS, S.; GASSNER, A.; BLOEM, E.; SCHNUG, E. Relation between spatial variability of plant physiological parameters in oilseed rape and infection with *Leptosphaeria maculans*. **Phyton**, v. 44, p. 215-229, 2004.
- SANOGO, S.; YANG, X.B. Relation of sand content, pH, and potassium and phosphorus nutrition to the development of sudden death syndrome in soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 174-180, 2001.
- SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; AVILÉS, M.; TRILLAS, I. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. **Microbial Ecology**, v. 59, p. 141-149, 2010.
- SHI, X.; LONG, Y.; HE, F.; ZHANG, C.; WANG, R.; ZHANG, T. The fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* suppresses innate immunity by modulating a host potassium channel. **PLOS Pathogens**, v.14, p. 1006878, 2018.
- SPANN, T.M.; SCHUMANN, A.W. **Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance**. Gainesville, FL. University of Florida/Horticultural Sciences Department, 2010. 5p.
- STANGOULIS, C.R.; GRAHAM, R.D. Boron and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 207-214.
- TENUTA, M.; LAZAROVITS, G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v. 92, p. 255-264, 2002.
- THOMPSON, I.A.; HUBER, D.M. Manganese and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society, 2007, p. 139-153.
- WANG, J. et al. Crop resistance to diseases as influenced by sulphur application rates. In: JI, L., CHEN, G., SCHNUG, E., HERA, C., HANEKLAUS, S. (eds.) **Fertilization in the third millenium - fertilizer, food security and environmental protection**. Proceedings of the 12th International World Fertilizer Congress, 2001, p. 1285-1296.
- WHITE, D.G.; HOEFT, R.G.; TOUCHTON, J.T. Effect of nitrogen and nitrapyrin on stalk rot, stalk diameter, and yield of corn. **Phytopathology**, v. 68, p. 811-814, 1978.
- WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. Effects of magnesium on bacterial spot of pepper and tomato and on the in vitro inhibition of *Xanthomonas vesicatoria* by streptomycin. **Plant Disease Reports**, v. 63, p. 182-184, 1979.



- WOLTZ, S.S.; JONES, J.P. Interactions in sources of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of Fusarium wilt of tomato. **HortScience**, v. 8, p. 137-138, 1973.
- WOOD, B.W.; REILLY, C.C. Nickel and plant disease. In: DATNOFF, L.E.; ELMER, W.H.; HUBER, D.M. (eds.) **Mineral nutrition and plant disease**. Saint Paul, MN. The American Phytopathological Society Press, 2007, p. 215-231.
- YURINA, T.P.; YURINA, E.V.; KARAVAEV, V.A.; SOLNTSEV, M.K. Effect of mineral nutrition on wheat resistance to powdery mildew. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 44, p. 54-56, 1997.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; ZANÃO JÚNIOR, L.A. **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG. Suprema Gráfica e Editora, 2012.

*Maria Esther de Noronha Fonseca  
Leonardo Silva Boiteux*

## 1. Introdução

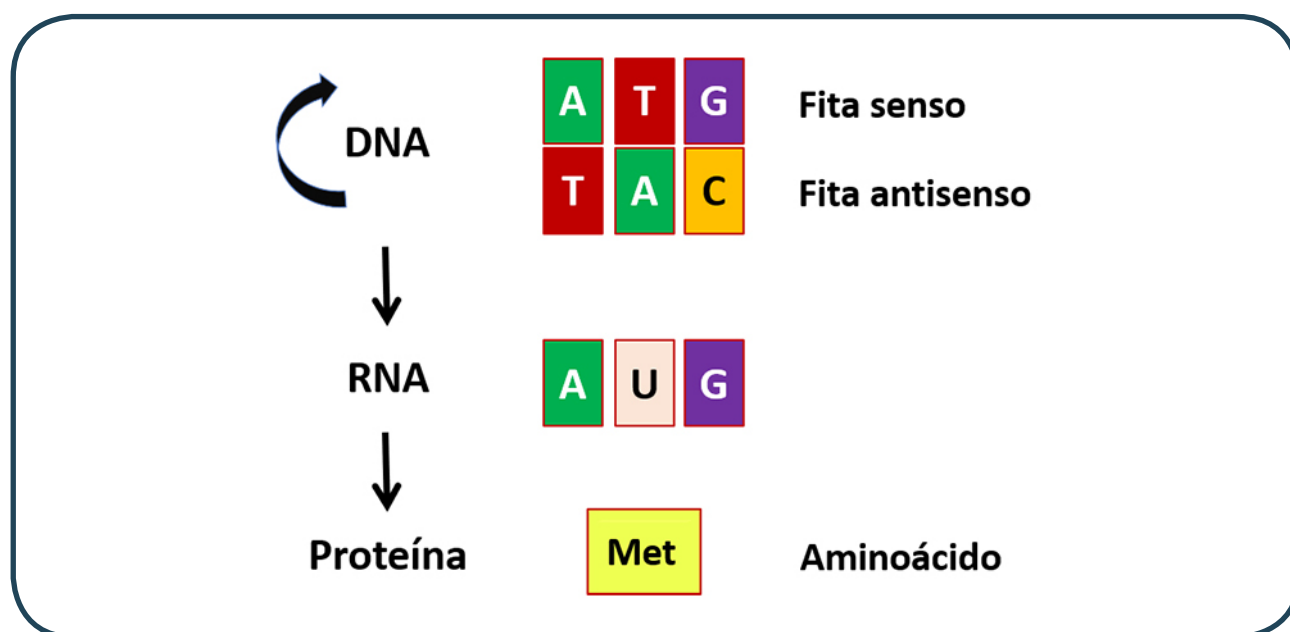
O melhoramento genético (em geral) e o melhoramento genético para resistência a patógenos e pragas (em particular) têm viabilizado, por décadas, o cultivo de plantas de forma mais sustentável (Zamir, 2001). Entre as ferramentas disponíveis para os programas de melhoramento genético para resistência a patógenos estão os métodos de melhoramento envolvendo cruzamentos controlados e bioensaios com inoculação controlada para a seleção fenotípica de plantas individuais que combinem resistência contra uma doença alvo e características agrônômicas de interesse para o consumidor final (Boiteux et al., 2016). Outro aspecto de infraestrutura importante é a disponibilidade de bancos de germoplasma contendo a mais ampla diversidade genética e extensas coleções de mutantes, incluindo fatores de resistência aos principais patógenos (Emmanuel & Levy, 2002). Os cruzamentos controlados para incorporação de fatores de resistência envolvem, em geral, cultivares comerciais (ou linhagens elite) e acessos de espécies silvestres (= **fontes de resistência**) de onde os genes de interesse vão ser **introgridos**. Desta forma, é necessário, após os cruzamentos interespecíficos iniciais, tecnologias capazes de “recuperar” de maneira eficiente o genoma da linhagem elite, contendo agora o novo fator de resistência. Além disso, o desenvolvimento de cultivares com resistência a doenças via melhoramento genético é, necessariamente, um processo contínuo uma vez que novos patógenos e novas variantes de patógenos surgem (ou podem ser introduzidos) a todo momento em uma dada região geográfica. Esse aspecto dinâmico do processo de incorporação e piramidização de novos fatores requer rapidez e precisão, especialmente no caso de hortaliças que são afetadas por uma assombrosa gama de patógenos em constante evolução. Neste cenário, a utilização de **seleção assistida por marcadores moleculares (SAM)** tem se tornado um componente metodológico crucial, apresentando uma perfeita harmonia com todos os métodos clássicos de melhoramento genético, permitindo uma seleção mais robusta (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por sua vez, os marcadores moleculares e o desenvolvimento de mapas genéticos ultradensos conduzem para a localização física e a posterior descoberta de novos genes de resistência bem como seus genes reguladores. A localização cromossômica e a descoberta de novos fatores de resistência têm se constituído em atividades essenciais na aplicação de novas estratégias de melhoramento via biotecnologia tais como transformação genética e edição genômica (Rothan et al., 2019). Todas estas tecnologias avançadas são mais eficientes com o conhecimento preciso da região do genoma a ser editada ou a ser mobilizada. Essa informação é proveniente, em última análise, dos estudos genéticos conduzidos com o auxílio dos marcadores moleculares. Neste capítulo será apresentan-

do um breve histórico das tecnologias que permitiram o desenvolvimento dos principais sistemas de marcadores moleculares bem como um conjunto de exemplos da aplicação de SAM no melhoramento genético para resistência a patógenos usando o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) como planta modelo.

## 2. Evoluções Tecnológicas da Era Genômica que Permitiram a Geração dos Modernos Sistemas de Marcadores Moleculares

### 2.1. Elucidação dos mecanismos de hereditariedade e da estrutura do DNA

A elucidação da estrutura do DNA por Watson & Crick (1953), a definição de seu papel crucial na transmissão de caracteres e o estabelecimento definitivo do “dogma central” da genética (**Figura 1**) possibilitaram inúmeros e consistentes avanços no melhoramento vegetal. Esse conjunto de conhecimentos genéticos claramente indicou que dissecando a estrutura do DNA podemos decifrar os mecanismos de transmissão de todos os caracteres (qualitativos e quantitativos) de interesse, incluindo fatores de resistência ou suscetibilidade a doenças em plantas.

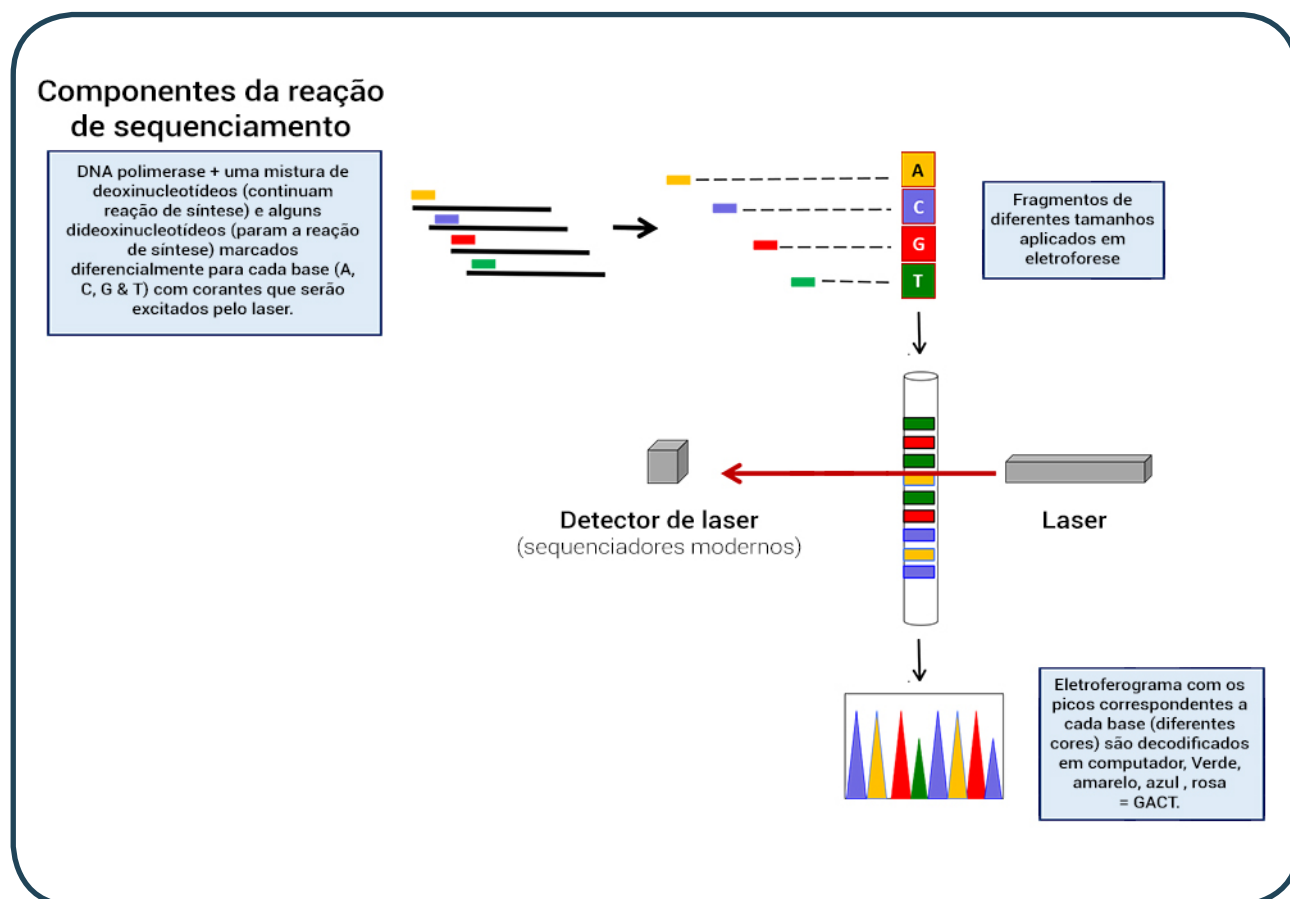


**Figura 1.** Diagrama do fluxo de informação genética (dogma central da genética). A molécula de DNA carrega toda a informação para própria replicação e para a sua transcrição em RNA. O RNA, de acordo com o código genético, é traduzido em aminoácidos que formam as proteínas. Na ilustração, o códon ATG na fita senso do DNA é transcrito em AUG e finalmente traduzido no aminoácido metionina.

## 2.2. Metodologias de sequenciamento da molécula do DNA

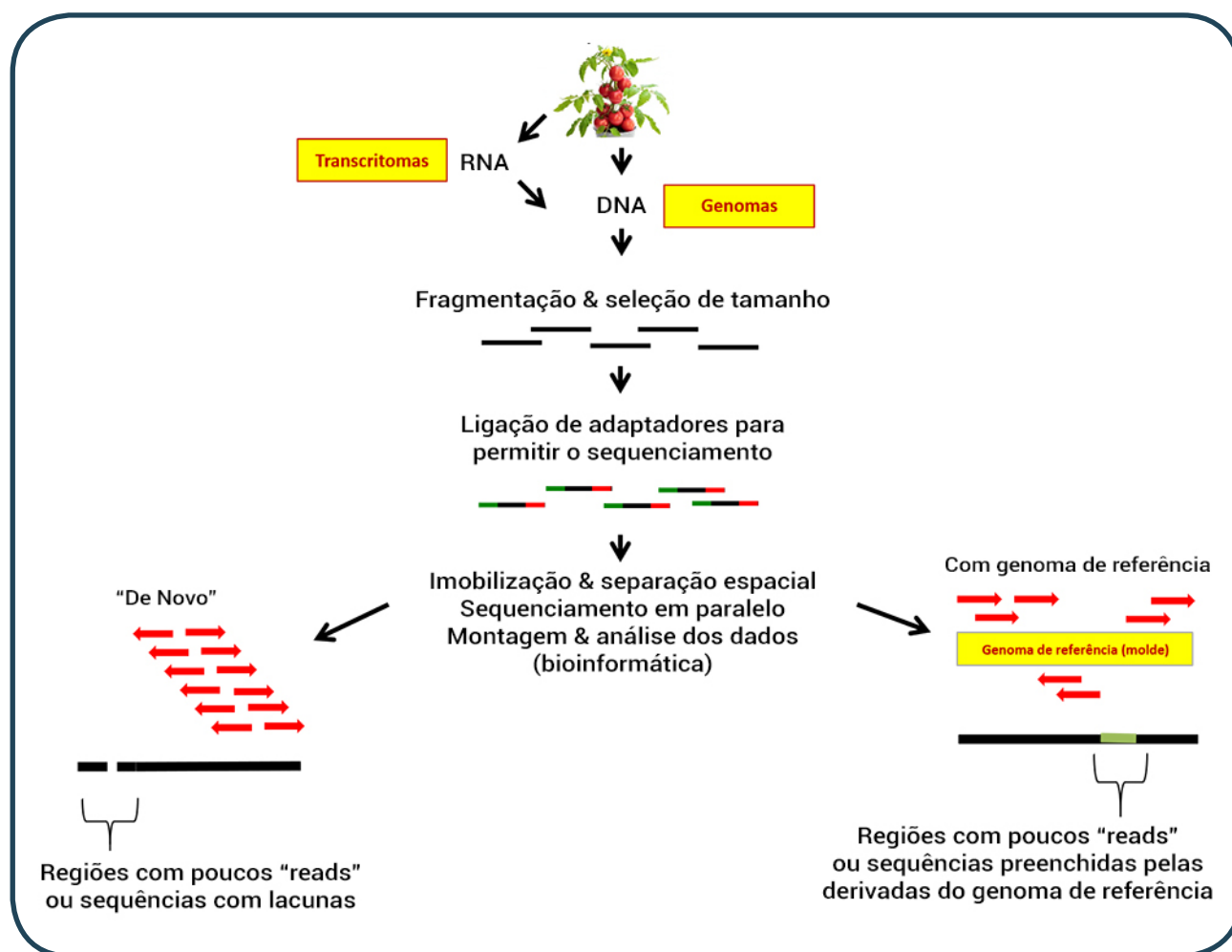
A definição da sequência de bases do DNA e a identificação das diferenças genéticas que geram variabilidade alélica bem como expressão de distintos caracteres formam as bases do moderno melhoramento genético vegetal. A elucidação das funções do DNA estimulou a busca por técnicas de sequenciamento mais precisas, robustas e baratas para a comunidade científica. O método desenvolvido por Sanger et al. (1977) foi o primeiro grande passo que permitiu o sequenciamento em mais ampla escala (**Figura 2**). Esse método baseia-se no estabelecimento de reações bioquímicas de síntese de DNA contendo uma combinação de deoxiribonucleotídeos normais (dATP, dGTP, dCTP e dTTT) e alguns dideoxiribonucleotídeos com bases modificadas (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTT) que provocam uma interrupção na amplificação do DNA. Essas bases modificadas são marcadas permitindo sua posterior detecção. Esse procedimento resulta em uma amplitude de fragmentos de vários tamanhos que podem ser separados por eletroforese e detectados em sequenciadores automáticos (**Figura 2**). Atualmente o método de Sanger é considerado como “sequenciamento de primeira geração” e se constitui no padrão de validação de mutações observadas nas tecnologias de nova geração. O método Sanger, no entanto, demonstrou ter limitações de escala, evidenciadas em projetos mais ambiciosos de sequenciamento de genomas completos e de várias amostras (ou variantes) de um mesmo organismo em paralelo (ao mesmo tempo). Essa ampliação de escala foi obtida através de novas tecnologias coletivamente denominadas como **NGS (= Next Generation Sequencing)**. NGS é um termo geral para denominar os métodos de sequenciamento em larga escala ou “em paralelo”. Em geral, o NGS é realizado em moldes imobilizados em membranas e a adição de bases é monitorada. A técnica de obtenção das sequências, no entanto, varia entre os vários modelos de sequenciadores de nova geração (Linnarsson, 2010). Um esquema simplificado da estratégia de NGS é ilustrado na **Figura 3**. As principais limitações das tecnologias NGS são o custo por fragmento e os tamanhos dos fragmentos obtidos. As principais plataformas (Illumina, Roche, SoLiD) disponibilizam fragmentos curtos (entre 30 e 400 pb) se comparados aos obtidos por Sanger (entre 500 e 1000 pb). Novas plataformas (PacBio e Nanopore) e novos protocolos (Illumina, Roche, SoLiD) geram fragmentos maiores, mas ainda com custos elevados. A grande limitação dos fragmentos curtos é a dificuldade de montagem dos genomas se realizados “de novo”, ou seja, sem um **genoma de referência** como molde (**Figura 3**). Por esta razão, a disponibilidade de genomas prontos, anotados e montados, como no caso do tomateiro, é de extrema utilidade para o melhoramento genético. Além disso, é importante que sejam obtidos vários fragmentos de DNA que se sobreponham, permitindo a montagem de longos “contigs”, resultando em uma boa “cobertura” do genoma e evitando lacunas de informação de sequência nos diferentes cromossomos ou regiões genômicas. Com o advento das técnicas de NGS os genomas de referência de várias culturas passaram a estar disponíveis, facilitando o chamado **resequenciamento genômico**, importante ferramenta para estudo da diversidade e detecção de diferenças genéticas entre acessos de uma dada espécie. Com estes moldes ou genomas de referência, a montagem dos cromossomos via resequenciamento se torna exequível mesmo com fragmentos pequenos, embora possam persistir alguns problemas em algumas regiões específicas

que podem não apresentar “cobertura” suficiente. Dois exemplos de resequenciamento do tomateiro são os projetos “BGI tomato 360 genomes” (Lin et al., 2014) e “100 tomato genome resequencing project” (Tomato Genome Sequencing Consortium, 2012; 2014). As informações sobre o genoma do tomateiro e de outras espécies cultivadas e selvagens da família Solanácea estão disponíveis no portal da SolGenomics ([www.solgenomics.net](http://www.solgenomics.net)).



**Figura 2.** Diagrama ilustrando os principais componentes do método de sequenciamento de Sanger em um sequenciador automático. O conjunto de amplicons de diferentes tamanhos e marcados diferencialmente (no exemplo, amarelo = A, azul = C, vermelho = G e verde = T) são obtidos via PCR, separados em capilares e cada um é sequencialmente detectado e sua informação ordenada por tamanho.





**Figura 3.** Esquema de NGS (Next Generation Sequencing). NGS é um termo geral para denominar os métodos de sequenciamento em larga escala ou "em paralelo". Em geral, o NGS é realizado em moldes imobilizados em membranas e a adição de bases é monitorada. As principais plataformas de NGS (Illumina, Roche, SoLiD) disponibilizam fragmentos curtos (entre 30 e 400 pares de bases). A grande limitação dos fragmentos curtos é a dificuldade de montagem dos genomas se realizados "de novo", ou seja, sem um genoma de referência como molde. Novas plataformas (Nanopore, PacBio) ou novos protocolos (Illumina, Roche, SoLiD) têm sido desenvolvidos para solucionar essa limitação do NGS.

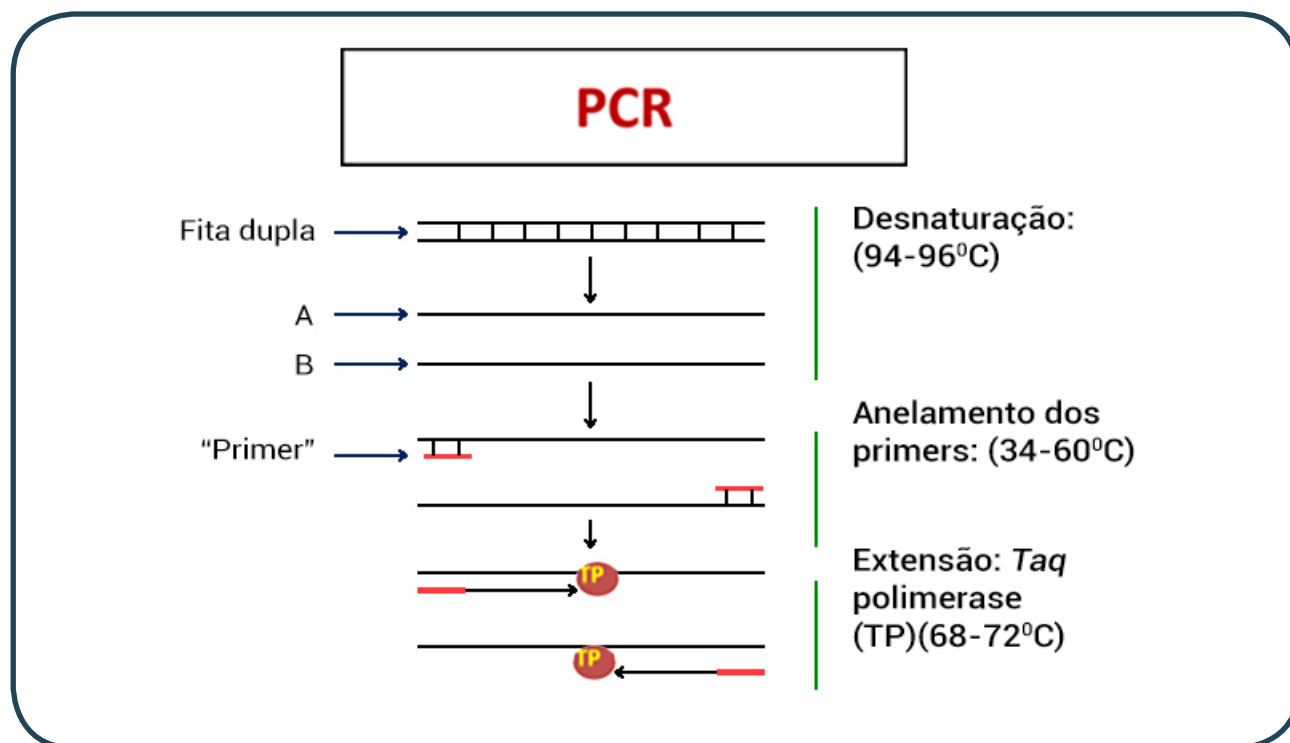
## 2.3. Tecnologia do DNA recombinante & engenharia genética

Duas descobertas permitiram o desenvolvimento da chamada **engenharia genética**. Primeiro a confirmação do DNA como a molécula unificadora de todos os sistemas biológicos. Todos os seres vivos transferem informações utilizando DNA, RNA e proteínas, ou seja, o código genético é universal. Outra descoberta metodológica importante foi a das **enzimas de restrição**, que são normalmente encontradas em bactérias e que apresentam a propriedade de clivar o DNA em sequências palindrômicas específicas. Esses avanços permitiram a inserção de fragmentos específicos de DNA em vetores bacterianos e o intercâmbio destes segmentos gênicos entre diferentes espécies e mesmo entre diferentes reinos. O domínio inicial destas tecnologias permitiu o posterior estabelecimento de todas as técnicas básicas de engenharia genética,

tais como: manutenção do gene de interesse em plasmídeos de bactérias (clonagem), inserção de genes de plantas (e de outros organismos) em *Agrobacterium* e posterior transferência desses genes para o genoma de plantas e, mais recentemente, a inserção em vetores para silenciamento gênico mediados por endonucleases (ZFNs e TALENs) ou CRISPR Cas9 (Rothan et al., 2019).

## 2.4. PCR (Polymerase Chain Reaction)

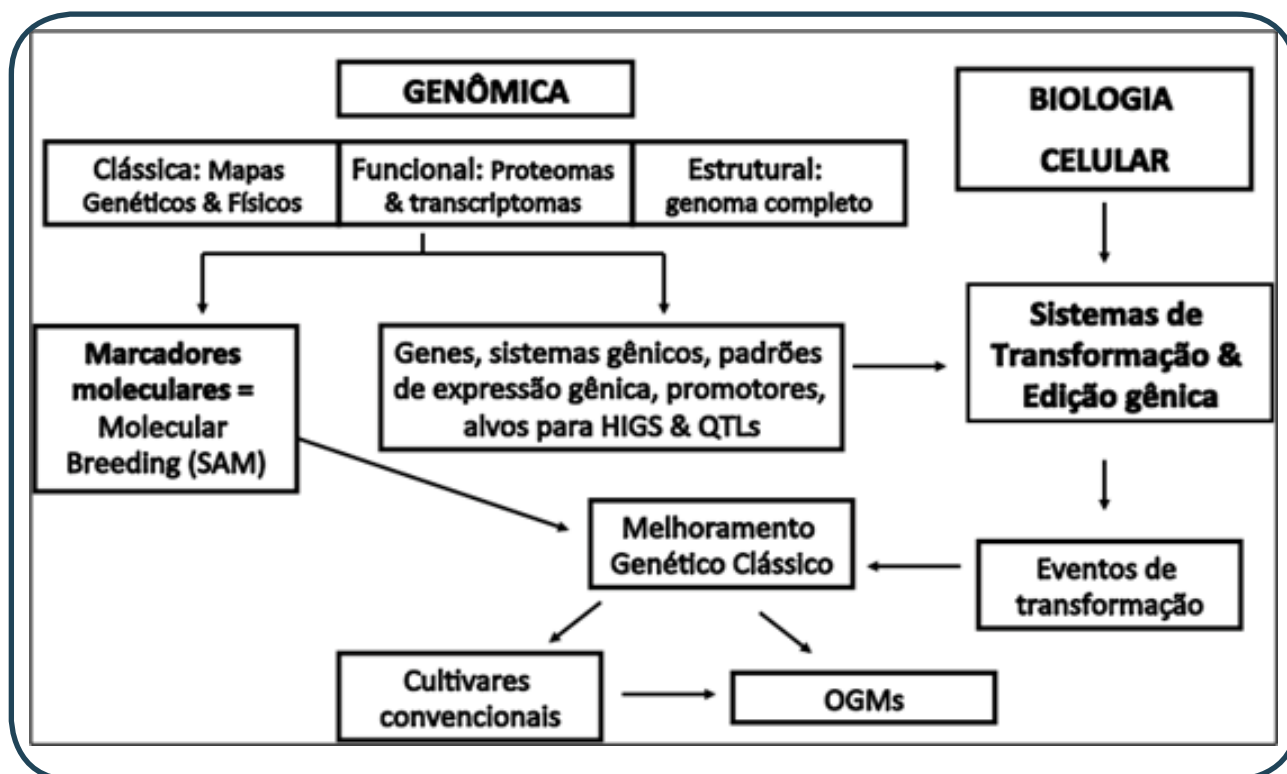
PCR é técnica que permite a amplificação de segmentos específicos de DNA tendo suas bordas definidas por sequências com as quais primers anelam para dar início ao processo de replicação. Cópias em série das fitas de DNA são produzidas *in vitro* até que seja obtida a quantidade desejada da região amplificada da região alvo do genoma definida pelos primers (**Figura 4**). Utiliza-se para tal uma enzima do tipo polimerase com propriedades únicas de termo estabilidade (= enzima resiste aos vários ciclos de desnaturação de DNA), permitindo a cópia em série do DNA sem reposição de enzima (Mullis & Faloona, 1987). A técnica de PCR permitiu superar a grande limitação que a disponibilidade de pequenas quantidades de DNA impunha para a pesquisa genética. Com o advento do PCR, mesmas purificações exíguas de DNA puderam ser amplificadas e manipuladas (Mullis & Faloona, 1987). Os aparelhos de PCR são programados para alterar as temperaturas da reação rapidamente (em torno de 94 °C para desnaturação ou separação das fitas de DNA, 37-68 °C para anelamento dos primers, 68-72 °C para síntese de novas fitas com o auxílio das polimerases termoestáveis). Desta forma, em poucos ciclos (em geral 30 ciclos) e pouco tempo (entre 1 e 2 horas) o DNA é amplificado exponencialmente e são obtidas quantidades suficientes para se efetuar a maioria das análises de rotina no melhoramento genético vegetal (exemplo: identificação de marcadores, sequenciamento e clonagem). Em muitos protocolos, o processo de amplificação de mais que uma região alvo pode ser obtida desde que as temperaturas de anelamento dos distintos primers sejam idênticas ou muito próximas, permitindo o estabelecimento do chamado sistema de **PCR multiplex**. Uma modalidade mais recente e refinada desta tecnologia é a chamada **PCR em tempo real (quantitative PCR ou qPCR)**. Nesta técnica, uma nova geração de aparelhos permite o monitoramento do progresso da amplificação dos fragmentos de DNA que são continuamente detectados pela presença de marcação fluorescente diferenciada (Rebrikov & Trofimov, 2006), permitindo identificar as diferentes variantes alélicas pela marcação de iniciadores com diferentes fluoróforos. O sistema facilita o monitoramento da real quantidade inicial do molde de DNA genômico ou derivado de RNA (DNA complementar ou cDNA) e também permite distinguir mutações de acordo com a curva de desnaturação dos amplicons (Novais et al., 2004). No aspecto relacionado ao desenvolvimento de marcadores moleculares, o PCR em tempo real permitiu ampliar a geração de novos sistemas de detecção e análise de polimorfismos de base única (= **Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs**), o que anteriormente seria possível apenas por sequenciamento ou pela fortuita presença de uma mudança de nucleotídeo capaz de gerar um sítio de clivagem para alguma enzima de restrição.



**Figura 4.** Esquema geral da PCR (Polymerase Chain Reaction). O processo de replicação de DNA é obtido de forma contínua em ciclos de reação que envolvem as etapas de separação ou desnaturação do DNA fita dupla (94-96 °C), anelamento dos 'primers' ou iniciadores e extensão de novas fitas, realizado com o emprego de enzimas polimerases termoestáveis (exemplo: *Taq* polimerase).

### Importância dos marcadores moleculares no melhoramento genético de nova geração

Os marcadores moleculares têm um papel central no moderno melhoramento genético porque interligam as várias áreas de conhecimento fornecendo informações essenciais para a busca de novos genes e posterior utilização em sistemas de transformação genética (transgenia e cisgenia) e edição gênica e, ao mesmo tempo, permitindo que informações disponíveis possam ser diretamente aplicadas em sistemas de SAM e na geração de novas cultivares e híbridos (**Figura 5**).



**Figura 5.** Diagrama das interconexões de diferentes áreas de conhecimento associadas com a seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) dentro dos programas de melhoramento genético de nova geração.

- \*OGM- Organismos Geneticamente modificados;
- \*HIGS- Silenciamento Gênico Induzido pelo Hospedeiro
- \*QTLs- Quantitative Trait Loci

### 3. Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos podem ser definidos por diferenças em características fenotípicas bem como qualquer diferença estrutural em segmentos de DNA (codantes ou não), RNA ou proteína (produto gênico) que revelam (direta ou indiretamente) diferenças genéticas entre indivíduos (= **polimorfismos**). Para funcionarem como marcadores, estas diferenças têm que estar em associação (ligação) genética estreita com os caracteres de interesse. Os marcadores moleculares de DNA são os mais abundantes e mais estáveis quimicamente, facilitando os processos de análise (Jones et al., 1997). Devido a essas propriedades, grande parte dos demais marcadores (baseados em RNA ou proteínas) são prioritariamente convertidos para marcadores de DNA. Em geral quanto mais próximo do gene de interesse maior a probabilidade do marcador de DNA de permanecer ligado ao gene. Essa é base teórica que permitiu o desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos como originalmente elucidado por Stutervant (1921).

## 4. Propriedades & tipos de Marcadores Genéticos

Três tipos de marcadores **genéticos** têm sido utilizados, quando disponíveis, na seleção assistida: os morfológicos, os bioquímicos e os moleculares. **Marcadores morfológicos:** resultam da análise direta e simples de diferenças (polimorfismos) no fenótipo (= morfologia) entre indivíduos. **Marcadores bioquímicos:** são obtidos via técnicas de detecção de polimorfismos ao nível de proteína (geralmente enzima) ou padrão de proteínas. **Marcadores moleculares:** são obtidos via técnicas de detecção de polimorfismos ao nível de DNA e RNA (Jones et al., 1997).

### 4.1. Marcadores morfológicos ou clássicos

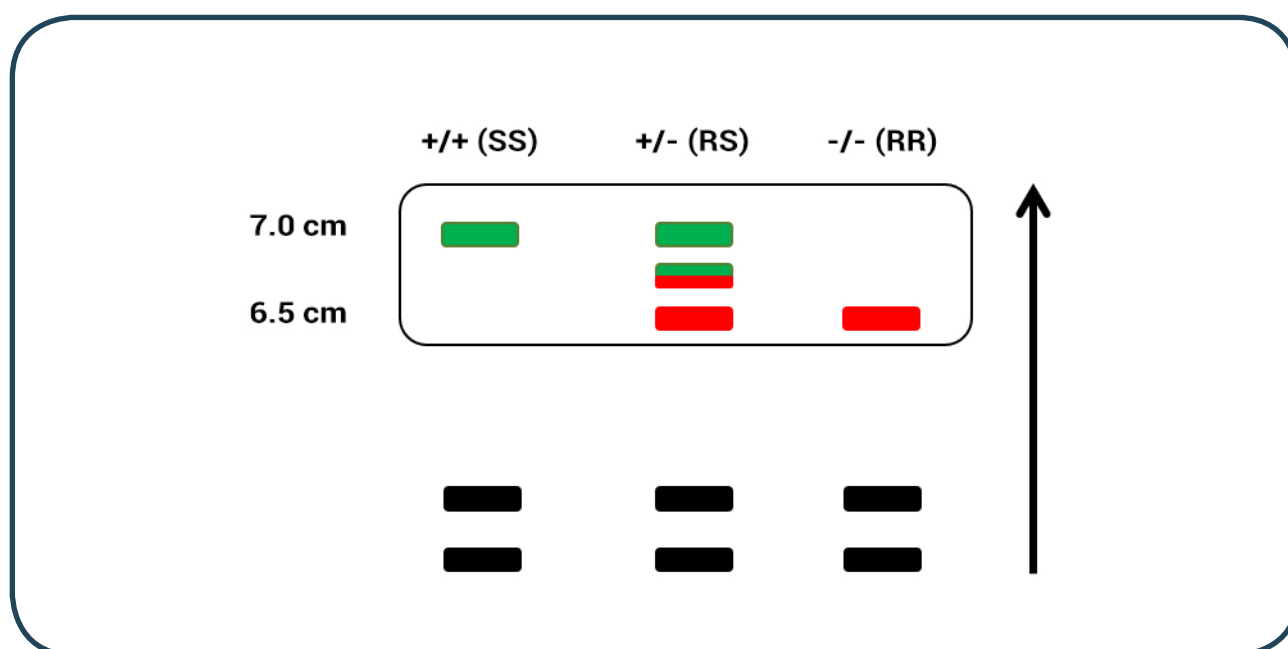
Desde Mendel até meados da década de 1960, os marcadores predominantemente utilizados em melhoramento eram associados a caracteres morfológicos. Marcadores morfológicos são aqueles controlados por características fenotípicas de fácil identificação associadas e/ou ligadas com outra característica de interesse (Rick & Yoder, 1988). Os marcadores morfológicos são caracteres visíveis a olho nu (porte da planta, deficiência de clorofila, cor de flores etc.) ou em lupa (formato, tamanho e cor de folhas, frutos, flores e outras partes da planta). No caso do tomateiro os caracteres fruto com ombro verde e arquitetura de folha (folha ereta) podem ser utilizados como marcadores um do outro, ou com outros caracteres localizados no início do cromossomo 10 porque apresentam estreita co-segregação (González-Arcos et al., 2019). De fato, os primeiros mapas genéticos se constituíam exclusivamente em marcadores morfológicos e citológicos. As desvantagens dos marcadores morfológicos incluem o seu pequeno número e devido ao fato de serem identificados, em sua maioria, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Por sua vez, os marcadores bioquímicos ou fragmentos de DNA, podem ser utilizados a partir de amostras de células ou de tecidos de todas as partes da planta (folhas, embriões, cotilédones, pólen, sementes etc.) e também em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. No tomateiro, marcadores morfológicos foram inicialmente mapeados empregando estoques cromossômicos com aberrações tais como aneuploidias, translocações, inserções/deleções e inversões (Rick & Yoder, 1988).

### 4.2. Marcadores bioquímicos

Os marcadores bioquímicos são enzimas com função similar, mas que diferem em sua estrutura e peso molecular, permitindo sua identificação geralmente por eletroforese (Markert & Moller, 1959). A análise dessas **isoenzimas** é realizada em de três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos. Estes marcadores proporcionam grande facilidade, pois a obtenção de produtos é evidenciada pela simples observação do gel (Alfenas, 1998). São marcadores predominantemente codominantes (ver definição abaixo), possibili-



tando identificação de variantes alélicas para um mesmo gene. Além disso, a técnica de isoenzimas é de baixo custo, fácil e rápida. Isoenzimas tem contribuído muito para caracterização de cultivares de uma gama de espécies culturas (Alfenas, 1998). No tomateiro, o locus da fosfatase ácida 1 (*Aps-1*) foi a primeira isoenzima empregada como marcador para o gene *Mi-1.2* (Figura 6) que confere resistência aos nematoides-das-galhas (Rick & Fobes, 1974; Medina-Filho, 1980). A proteína fosfatase ácida 1 foi purificada e sequenciada parcialmente. A sequência parcial dos aminoácidos foi utilizada para o desenho de iniciadores de PCR e identificação do gene em tomateiro (Williamson & Colwell, 1991). As principais desvantagens desses marcadores são o relativo baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos além de serem fortemente influenciados por fatores ambientais ou pela fase de desenvolvimento da planta (Alfenas, 1998). Apesar de todas essas limitações, os marcadores bioquímicos prestaram valiosos serviços no melhoramento de plantas (Alfenas, 1998), incluindo no melhoramento do tomateiro (Medina-Filho, 1980).



**Figura 6.** Exemplo do emprego de um marcador bioquímico (isoenzima) no melhoramento genético do tomateiro para resistência aos nematoides-das-galhas (gene *Mi-1.2*). A análise é realizada em de três etapas: extração das enzimas do tecido vegetal, separação por eletroforese e coloração por métodos histoquímicos. As bandas lentas da enzima (vermelhas) codificadas pelos diferentes alelos do gene da fosfatase ácida 1 (*Aps-1*, localizado no cromossomo 6) estão correlacionadas com o genótipo resistente (R) e as bandas rápidas (verdes) aos genótipos suscetíveis (S). Os padrões de bandas para a enzima fosfatase ácida 1 representam indivíduos homocigotos resistentes [banda vermelha (+)], homocigotos suscetíveis [banda verde (-)] e heterocigotos [(+/-)]. No heterocigoto, a enzima ocorre como um dímero (representado por uma banda bicolor) que tem uma migração intermediária. As bandas a 7.0 e 6.5 cm são as derivadas do gene *Aps-1*. As demais bandas (fora da área demarcada) são derivadas de enzimas codificadas por diferentes loci e não estão ligadas com o fator de resistência (gene *Mi-1.2*). Seta indica sentido da migração das bandas em eletroforese. Fonte: Medina-Filho (1980).

### 4.3. Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são fragmentos de DNA (genes ou regiões não codantes) que são ligados ou codificam uma característica a ser estudada, sinalizando a presença/ausência do gene alvo na planta sob análise. Esta ligação é genética, ou seja, o marcador e o gene estão localizados no genoma de tal maneira que são transferidos predominantemente juntos aos gametas e as progênies (ou seja, co-segregam) (Jones et al., 1997). Isto ocorre porque estão fisicamente ligados no cromossomo e/ou porque não ocorre recombinação frequente entre eles. A frequência de recombinação (em %) é expressa com a unidade cM (centi-Morgan), onde 1 cM é igual a 1% de recombinação entre um marcador e um locus interesse. Ou seja, o marcador e gene de interesse vão juntos no mesmo gameta em uma frequência de 99%. Desta forma, quanto mais forte for esta ligação melhor o marcador. Neste cenário, o marcador molecular perfeito seria aquele derivado da informação advinda do próprio gene (= **marcador funcional**). As modernas tecnologias de análise de marcadores moleculares viabilizam a caracterização genética de um grande número de genótipos através de procedimentos relativamente simples e rápidos. Como consequência, a seleção de indivíduos em programas de melhoramento é realizada de forma mais precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de genótipos superiores (Bered et al., 1997). Marcadores de DNA foram inicialmente utilizados no melhoramento de plantas no início da década de 1980 (Soller & Beckmann, 1983). Ao contrário dos marcadores morfológicos e bioquímicos, os marcadores moleculares são praticamente ilimitados em número, não sendo afetados por fatores ambientais e/ou pela fase de desenvolvimento da planta. Além disso, vários sistemas de marcadores moleculares apresentam fácil detecção e análise e se comportarem como “caracteres” de herança simples (Jones et al., 1997). No processo de transferência de alelos de resistência, os marcadores moleculares podem ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se fortemente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados em SAM, sendo imprescindíveis na seleção assistida durante o processo de piramidização de alelos de resistência para um mesmo patógeno ou grupo de patógenos. Essa estratégia vem sendo considerada como uma forma de desenvolver cultivares com resistência duradoura e de amplo espectro.

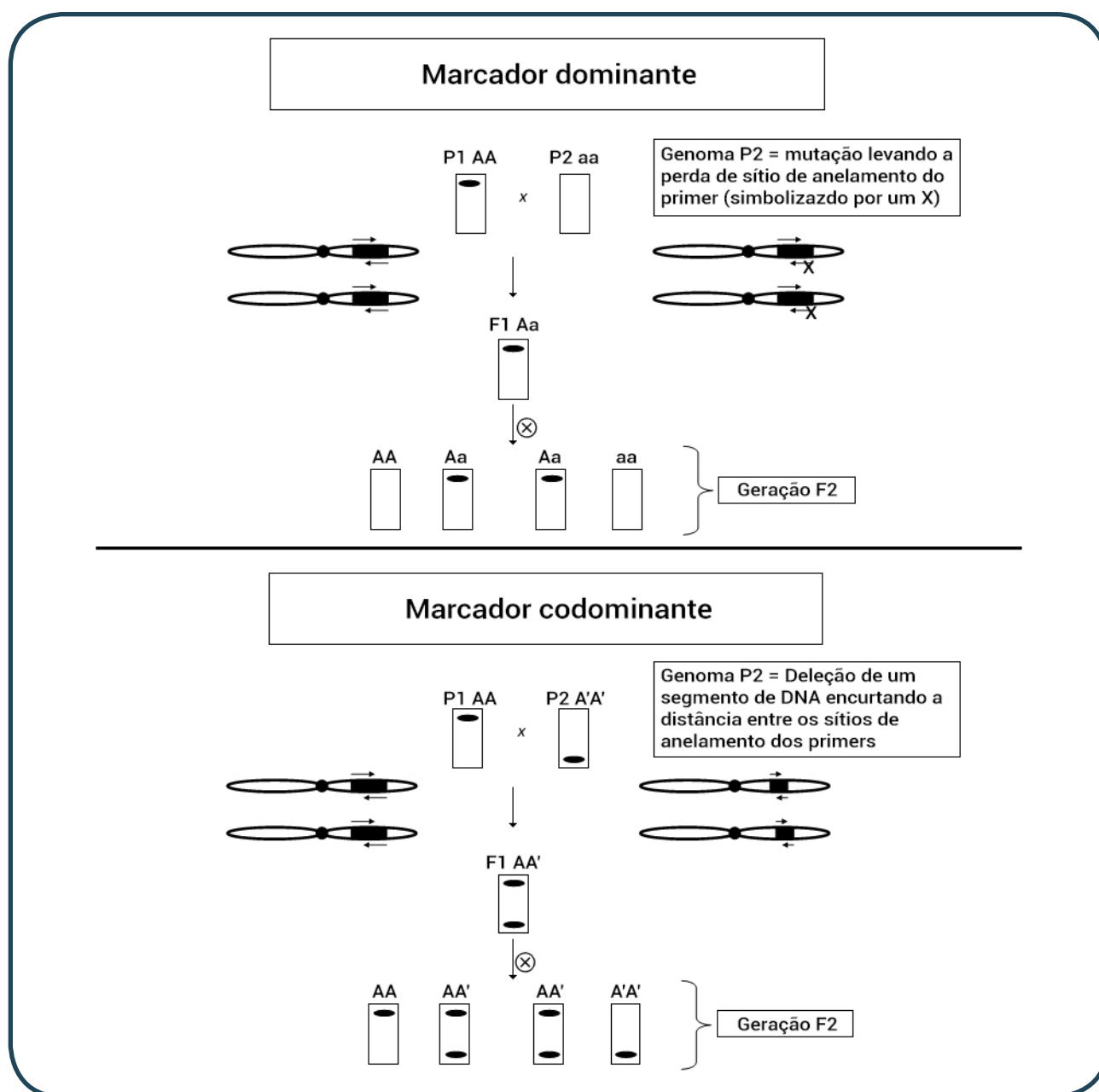
#### Tipos de polimorfismos de DNA

Os marcadores moleculares se baseiam na presença de polimorfismos que possam ser utilizados para distinguir organismos com diferenças de interesse. A capacidade de identificar e de detectar tais polimorfismos depende da magnitude dessas diferenças e da precisão da técnica de detecção. Polimorfismos são diferenças entre alelos ou regiões genômicas causadas por mutações do tipo deleção/inserção de mais de uma base (InDels), deleções, inserções ou trocas de uma única base (SNPs), repetições ou modificações epigenéticas no DNA (metilação). No tomateiro, os SNPs representam a maior classe de polimorfismos, sendo o maior número encontrado nas espécies selvagens e preferencialmente localizados em regiões intergênicas (Gupta et al., 2020).

#### Marcadores dominantes e codominantes

Marcadores dominantes são detectados em apenas um dos alelos e não são visíveis em indivíduos com o alelo contrastante. O marcador codominante é visível e distinto en-

tre os dois alelos, sendo o marcador para o heterozigoto facilmente reconhecido (Jones et al., 1997). O marcador dominante dificulta a análise pois a não visualização do alelo pode ser resultado de alguma falha nos procedimentos laboratoriais e não necessariamente de origem genética. Dessa forma, os marcadores dominantes necessitam de um número maior de controles e repetições do que os marcadores codominantes. A origem bem como os principais contrastes entre os marcadores dominantes e codominantes detectados em ensaios de PCR estão ilustrados na **Figura 7**. A presença de InDels entre os sítios de anelamento dos primers usualmente definem marcadores codominantes, enquanto os SNPs usualmente definem marcadores dominantes. No entanto, quando a presença de um SNPs resulta na formação de um novo sítio de clivagem para uma enzima de restrição, esta informação pode ser convertida na geração de marcadores codominantes.



**Figura 7.** Diagramas contrastando as características peculiares dos marcadores moleculares dominantes e codominantes em ensaios de PCR. No painel superior o local de anelamento dos primers é perdido no indivíduo aa e a região delimitada pelos primers não é amplificada. No painel inferior a deleção no fragmento interno em A'A' gera amplicons menores, mas ainda detectáveis.

## 5. Principais Categorias e Tipos de Sistemas de Marcadores

No presente capítulo, os principais sistemas de marcadores são agrupados nas seguintes categorias: **(1)** Marcadores moleculares baseados em hibridação; **(2)** Marcadores baseados em PCR com primers arbitrários; **(3)** Marcadores baseados em PCR com primers não-arbitrários; **(4)** Marcadores baseados em PCR & análise de restrição; **(5)** Marcadores baseados em sequenciamento de amplicons polimórficos; **(6)** Marcadores derivados de NGS; **(7)** Marcadores baseados em informação de sequência & PCR em tempo real e **(8)** Marcadores derivados de transcritomas.

### 5.1. Sistemas de Marcadores Moleculares Baseados em Hibridação

Estes sistemas de marcadores moleculares detectam diferenças de fragmentos de DNA obtidos após corte com enzimas de restrição e hibridação com sondas marcadas (radioativas ou “frias”). **RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** – É o principal representante deste grupo de marcadores. Foi o primeiro sistema de marcadores de DNA utilizado no melhoramento de plantas (Helentjaris et al., 1986), sendo os marcadores moleculares utilizados para gerar os primeiros mapas genéticos ultradensos do tomateiro (Tanksley et al., 1992). Nessa técnica, o DNA total de um indivíduo é inicialmente isolado e clivado com enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos são separados por eletroforese e transferidos para uma membrana de celulose ou náilon. Em seguida, fragmentos específicos podem ser detectados pela incubação da membrana com uma sonda (uma sequência de DNA marcada). Essa sonda irá, por complementaridade entre as bases nitrogenadas, parear com um ou mais dos fragmentos contidos na membrana. As variações nos nucleotídeos do DNA devido à mutação, inserção/deleção e inversão podem ser detectadas se essas ocorrerem em uma região do genoma que define um sítio de corte de enzimas de restrição. Se o DNA de plantas diferindo em um ou vários desses nucleotídeos forem expostos a essas enzimas, diferentes padrões de fragmentos ou fragmentos de diferentes tamanhos, portanto polimórficos, são gerados e podem ser identificados e clonados. Tais fragmentos são denominados RFLPs e foram inicialmente desenvolvidos por Botstein et al. (1980). Os RFLPs são loci no DNA que podem ser identificados e mapeados. **Minissatélites (VNTRs = Variable Number of Tandem Repeats)** – são unidades de 10 a 100 pb repetidas em tandem, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição. Originalmente, esta metodologia utiliza os mesmos princípios da técnica de RFLP que abrange técnicas de restrição do DNA e uso de sondas para hibridização, sendo extremamente laboriosa. Contudo, esses marcadores podem ser analisados por PCR, de forma mais rápida e prática, uma vez que, as repetições são conservadas no genoma de uma mesma espécie. Muitos dos minissatélites são altamente polimórficos, produzindo um grande número de bandas. Por estarem espalhadas por todo o genoma e apresentarem um número variável de repetições em diferentes indivíduos em rela-

ção a uma mesma região cromossômica (locus), os minissatélites simultaneamente proporcionam um conjunto de marcadores genéticos que se constitui no que tem sido denominado de impressões digitais de DNA, conseqüentemente, indivíduo-específicos. Para a obtenção do padrão de bandas utiliza-se o mesmo procedimento utilizado para o RFLP, com exceção de que a sonda contém repetições de sequência conhecida. As desvantagens são relacionadas à dominância dos marcadores e ao fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

## 5.2. Marcadores Baseados em PCR com Primers Arbitrários

### RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

No final da década de 1980, foi desenvolvido um novo tipo de sistema de marcadores moleculares denominado de RAPD (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990) ou de **Arbitrarily primed PCR** = AP-PCR (Caetano-Anollés et al., 1991). O RAPD é uma técnica que utiliza a reação de PCR para detectar fragmentos específicos de DNA (Williams et al., 1990). O sistema RAPD fez parte da primeira geração de marcadores obtidos pela utilização de estratégias mais simples via PCR. O RAPD é uma ferramenta bastante útil quando não existem informações sobre os genes a serem amplificados ou sobre o genoma da espécie em estudo. Ao contrário do PCR convencional, o RAPD utiliza apenas um ‘primer’ curto (de até dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma. Caso duas cópias desse ‘primer’ se liguem às fitas opostas do DNA a região flanqueada pelos ‘primers’ pode ser amplificada desde que separada por uma distância amplificável via PCR (entre 200 e cerca de 2.000 pares). O RAPD não exige o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada, ao contrário do PCR convencional. Logo, um mesmo conjunto de ‘primers’ pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos. As principais vantagens da técnica são a facilidade e a rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises, sendo muito empregado no desenvolvimento de marcadores ligados a genes de resistência a doenças como por exemplo no feijoeiro (Kelly & Miklas, 1998) e no tomateiro (Boiteux et al., 2016). A baixa reprodutibilidade tem sido apontada como a grande limitação deste sistema de marcadores. Na verdade, a técnica requer certa experiência com procedimentos moleculares, cuidado com o preparo das reações e rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. A quantidade e qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima *Taq* polimerase são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD. É importante que o DNA esteja padronizado e não muito concentrado, livre de contaminações de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, pois estas substâncias inibem ou diminuem a ação da *Taq* polimerase (Lopes et al., 2012). Em plantas, os RAPDs têm facilitado a condução de estudos em genética e melhoramento, até então, considerados inexequíveis com as técnicas tradicionais. Os polimorfismos detectados via RAPD podem ser InDels ou SNPs. Uma diferença entre o DNA de duas plantas que ocorra na região de anelamento



do *primer* é identificada pela ausência da referida banda em uma delas e presença da banda na outra. No caso de indivíduos heterozigotos, estes produzem as mesmas bandas que os homozigotos, pois os marcadores rápidos são majoritariamente dominantes.

### 5.3. Marcadores Baseados em PCR com Primers Não-Arbitrários

Os iniciadores da PCR podem ser sequências conhecidas que se deseja amplificar (exemplo: um gene de resistência) ou sequências conservadas que flanqueiam os microssatélites (que são segmentos genômicos repetitivos dispersos ao longo de todo o genoma). Esses marcadores podem também ser derivados de sequências de genes conhecidos contendo regiões genômicas ou domínios conservados (em termos evolucionários) mesmo entre plantas hospedeiras sem estreitas relações filogenéticas. Essa informação pode ser empregada no desenho de primers (= **PCR heterólogo**), tendo como objetivo a descoberta de novos alelos (análogos ou homólogos) em uma nova hospedeira. Outro sistema de marcadores nessa classe é o uso de primers cobrindo regiões conservadas da transcriptase reversa de **retrotransposons**. Esses elementos móveis são interessantes para a potencial geração de marcadores moleculares uma vez que estão dispersos ao longo de todo o genoma de plantas. **Marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) ou Microssatélites** – O genoma dos eucariotos apresenta diferentes classes de sequências repetidas. Tais repetições podem ser classificadas de acordo com a sua extensão em: satélites, minissatélites e microssatélites. Marcadores microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR) têm sido preferidos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados no genoma em uma frequência alta (Akkaya et al., 1992). Essas sequências são constituídas de repetições de nucleotídeos que ocorrem naturalmente no genoma. Devido a erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA, diferentes indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições dentro de um mesmo microssatélite (Akkaya et al., 1992). Para que o microssatélite seja útil como marcador, ele deve ser inicialmente identificado, clonado, sequenciado e amplificado a partir de ‘primers’ que o flanqueiem. Alternativamente podem ser identificados diretamente no genoma, caso esse esteja disponível. Após o desenvolvimento do marcador a rotina passa a ser a PCR e a separação dos produtos por eletroforese. Na maioria das vezes, a eletroforese deve ser feita em gel de poliacrilamida devido à pequena diferença de tamanho entre os fragmentos alélicos polimórficos. Os elementos repetitivos são formados por arranjos de repetições em “tandem”, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e são os loci mais polimórficos dos genomas (Milach, 1998). Por exemplo, a sequência GACAGACAGACAGACA, também representada  $(GACA)_4$ , é um microssatélite. O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA. Em genomas de eucariotos estas sequências estão distribuídas ao acaso e constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares disponíveis, devido à sua alta taxa de mutação. Ao usar-se primers específicos que flanqueiam o microssatélite para sua amplificação,

têm-se diferenças entre indivíduos de acordo com o número de repetições da sequência, ou seja, bandas de tamanhos diferentes serão produzidas. Os microssatélites são marcadores codominantes e cobrem bem o genoma, entretanto, para o uso rotineiro existe a necessidade de primeiro amplificar uma região, posteriormente sequenciar e em terceiro lugar, sintetizar os iniciadores específicos para cada locus. Uma vez feito isto, o locus marcador pode ser utilizado indefinidamente naquela espécie. Desta forma, existe um custo elevado e trabalho no início, mas o custo subsequente é baixo e a simplicidade a posteriori, é muito grande.

## 5.4. Marcadores Baseados em PCR & Análise de Restrição

### AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP é uma técnica que combina a clivagem de fragmentos de DNA com enzimas de restrição e amplificação desses fragmentos por PCR (Vos et al., 1995). Nessa técnica, o DNA é clivado com enzimas de restrição, às suas extremidades são ligados adaptadores, os quais servem de sítios de ligação para ‘primers’ numa reação de PCR. Os marcadores AFLP combinam a sensibilidade da detecção por PCR com a ubiquidade dos sítios de restrição no genoma de plantas para busca de polimorfismos (Vos et al., 1995). Assim como o RAPD existem coleções e “kits” contendo estas combinações. No caso do AFLP a estratégia tem uma patente e tais kits são comercializados por empresas de insumos para Biologia Molecular. Para obtenção de marcadores AFLP o primeiro passo é a digestão do DNA por duas enzimas de restrição: uma de corte raro e outra de corte frequente. É fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas de adaptadores. Uma vez conhecidas a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição, podem-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Esta etapa consiste na amplificação dos fragmentos agora ligados aos adaptadores através da reação da polimerização em cadeia com o uso de iniciadores, complementares aos adaptadores com uma base a mais. A amplificação final é feita com uma pequena amostra da primeira amplificação. Neste caso são utilizados iniciadores que são compostos de todas as bases dos *primers* da primeira amplificação, mais duas a três bases, dependendo do nível de polimorfismo da espécie ou da população. Existem inúmeras vantagens no uso da técnica de AFLP, como alto número de bandas analisadas em um único gel, pela restrição e amplificação de fragmentos espalhados por todo o genoma, além da considerável estabilidade do perfil de amplicons e, principalmente, por não necessitar de dados de sequenciamento prévio da espécie em estudo (Spooner et al., 2005). Apesar de ser um tipo de marcador bastante útil para a realização de *fingerprints* de DNA, principalmente quando existem poucas informações disponíveis a respeito do genoma de interesse, o seu uso no melhoramento de plantas tem sido limitado devido a dificuldades metodológicas inerentes à técnica e ao seu elevado custo.

## 5.5. Marcadores baseados em sequenciamento de amplicons polimórficos

São marcadores moleculares derivados dos anteriores. Após purificação e sequenciamento do fragmento polimórfico esse pode ser convertido em um marcador mais simples, baseado apenas em PCR e/ou PCR mais análise de restrição. **CAPS (Cleared Amplified Polymorphic Sequence)** – CAPS são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se de primers específicos (20 a 30 pb), seguido da digestão com endonucleases de restrição. As etapas para obtenção desses marcadores são a extração e amplificação de DNA via PCR, a digestão com enzimas de restrição, eletroforese em géis de agarose e a visualização dos polimorfismos pela coloração com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. As principais vantagens são a codominância e a alta reprodutibilidade dos marcadores e a principal desvantagem é a necessidade de conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção dos primers. Existem ferramentas online para o desenho de CAPS (visitar [https://solgenomics.net/tools/caps\\_designer/caps\\_input.pl](https://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl)). **SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)** – O sistema RAPD apresenta uma desvantagem que limita, até certo ponto, o seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para a ligação do ‘primer’ ao molde (em torno de 37 °C) permite que muitos amplicons não específicos sejam visualizados. Isso torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Portanto, modificações no termociclador utilizado, na DNA polimerase e em outros reagentes do mix de reação podem alterar o padrão de amplificação. Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR. Neste caso, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois ‘primers’ (mais longos que o original) são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora em uma temperatura de anelamento mais elevada. Nessa nova condição, o processo de amplificação é mais estável e específico (Paran & Michelmore, 1993). As etapas principais no desenvolvimento de um SCAR são: **(1)** identificação de um iniciador que confere polimorfismo a dois bulks de DNA com fenótipos contrastantes; **(2)** o isolamento e a clonagem do fragmento amplificado em um vetor (plasmídeo); **(3)** sequenciamento do fragmento isolado; **(4)** desenho dos iniciadores de tamanho maior que os decâmeros e **(5)** o teste ou validação final (Paran & Michelmore, 1993). Até a etapa 3 usa-se de marcadores RAPDs. De posse da sequência, se desenham os *primers*/ iniciadores (etapa 4) com comprimento variável entre 16 e 24 pares de bases. A ideia de um iniciador mais longo surgiu de cálculos feitos sobre o comprimento mínimo para a estabilidade de um *primer* amplificar uma sequência única de um genoma vegetal. Desta forma, espera-se a geração de uma banda única com o uso dos referidos iniciadores. Existem programas de computador que auxiliam a tomada de decisão para a escolha do par de primers específicos mais adequados como, por exemplo, o Primer - Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Esses aplicativos computacionais proporcionam valiosas informações comparativas a respeito de diferentes iniciadores que são gerados quando uma determinada sequência de bases é fornecida ao programa.

## 5.6. Marcadores derivados de NGS

Os avanços tecnológicos e diminuição nos custos tem permitido o sequenciamento de genomas de cultivares/aceessos do tomateiro cultivado e de espécies selvagens comumente fontes de alelos de resistência a doenças. Este banco de dados é uma fonte de informações de sequências que pode ser utilizada para a descoberta de novos marcadores moleculares e conseqüentemente de novos genes. O sequenciamento do tipo **NGS** (Shendure & Ji, 2008) aumenta significativamente a eficiência e reduz os custos em relação aos métodos anteriores. Com base nos avanços dessa técnica, foi possível concluir o projeto completo de sequenciamento do genoma do tomate em 2012. O primeiro modelo sequenciado (no caso do tomateiro a cultivar ‘Heinz 1706’) e a evolução de diferentes hardwares e softwares capazes de armazenar, processar e analisar quantidades significativas de dados, facilitou o resequenciamento de diferentes genomas e transcritomas. Aplicando esta ferramenta, também foi possível descobrir inúmeras variantes através do genoma e o desenvolvimento de genotipagem de larga-escala. Os genomas derivados de resequenciamento estão disponíveis em [solgenomics.net](http://solgenomics.net). Após a análise em diversos programas de alinhamento disponíveis pode-se escolher regiões com SNPs e InDels para o desenho de marcadores. À medida que os tempos de sequenciamento e os custos são reduzidos, novas estratégias de genotipagem estão agora disponíveis. Com o resequenciamento do genoma foi possível identificar dezenas de milhares de variantes (exemplo SNPs) ao longo do genoma do tomate (Hamilton et al., 2012). Com o desenvolvimento paralelo de plataformas de genotipagem (Gupta et al., 2020), que facilitam a caracterização de populações a partir de marcadores selecionados, foi possível construir novos mapas genéticos de alta densidade (Sim et al., 2012). Sua aplicação permite localizar com precisão no genoma uma característica de interesse facilitando o processo de seleção de genes candidatos. Outras estratégias de genotipagem (baseadas em sequenciamento de alto desempenho) estão sendo usadas atualmente. O objetivo da estratégia é identificar polimorfismos (SNPs) e coletar simultaneamente informações genômicas de uma população de interesse. Para isso, utiliza-se o sequenciamento de fragmentos de DNA específicos com representação genoma mais ou menos total de indivíduos (ou grupos de indivíduos) de uma população. Mais recentemente, a técnica **resequenciamento (Re-seq)** tem sido empregada usada para encontrar um grande número de marcadores genéticos. Além disso, tecnologias baseadas na estratégia de **digestion-based simplified genome sequencing** também têm sido usadas, incluindo o **RAD-seq = restriction site associated DNA sequencing** (Baird et al., 2008), **genotyping-by-sequencing (GBS-seq)** ou genotipagem por sequenciamento (Elshire et al., 2011; Kim et al., 2016) e a **SLAF-seq = specific-locus amplified fragment sequencing** (Sun et al., 2013). A técnica SLAF-seq tem a vantagem de evitar sequências de genoma repetitivas se tornando altamente precisa, de baixo custo e rápidas. Atualmente, essas metodologias têm sido aplicadas em genotipagem de larga escala e para várias espécies, com ou sem genomas de referência. Essas metodologias são usadas

na construção de mapas genéticos de alta densidade e empregadas para mapear diretamente características/genes individuais. Como exemplos no tomateiro, temos a aplicação da metodologia RAD-seq para o reposicionamento de fatores quantitativos relacionados à resistência ao oomiceto *Phytophthora infestans* (Chen et al., 2014) e o emprego da metodologia SLAF-seq para o mapeamento de um gene relacionado à resistência ao fungo *Cladosporium fulvum* (Zhao et al., 2016). Uma abordagem interessante tem sido o emprego da metodologia de **BSA-seq** (Win et al., 2017) para mapear genes de resistência (exemplo: gene recessivo *ty-5* que confere resistência a begomovírus; Wang et al., 2018). **BSA-seq** combina modernas técnicas de sequenciamento com o método de **Bulked Segregant analysis – BSA** (Michelmore et al., 1991) para rapidamente ‘aterrissar’ em genes controlando tanto características qualitativas quanto quantitativas.

## 5.7. Marcadores baseados em informação de sequência & PCR em tempo real

Os polimorfismos do tipo SNPs, InDels e mesmo em modificações induzidas por metilação podem ser identificados na técnica de **High Resolution Melting (HRM)**. Na análise por HRM os polimorfismos são revelados após amplificação, pelo padrão de desnaturação dos amplicons. Os marcadores do **tipo KASP (= Kompetitive Allele Specific PCR)** se baseiam na marcação dos alelos de cada parental com um fluorômetro específico (Semagn et al., 2014).

## 5.8. Marcadores derivados de transcritomas

Transcritoma é o conjunto completo de transcrições de uma célula e sua quantificação, associada a um determinado estado de desenvolvimento e condição ambiental. A tecnologia de sequenciamento de alto desempenho permitiu gerar ferramentas como **RNA-seq** (Wang et al., 2009) capazes de mapear e quantificar transcrições com níveis muito altos de eficiência (tempo, custo). Usando RNA-seq, juntamente com um design experimental adequado, transcrições expressas diferencialmente podem ser identificadas contra um estímulo ambiental e em determinado tecido vegetal, de modo que esta ferramenta pode ser usada especialmente para selecionar genes candidatos por função, com o benefício de que, ao mesmo tempo, se um genoma de referência estiver disponível, esses genes também são mapeados. É o caso da seleção de genes candidatos para o controle do formato do fruto de tomate (Sun et al., 2013) e a identificação do gene *I-7* que confere resistência ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raças 1, 2 e 3 (González-Cendales et al., 2016).



## 6. Construção e aplicação dos mapas genéticos (linkage maps) com alta densidade de marcadores moleculares no isolamento de Genes e identificação de QTLs

Diversos genes de resistência a doenças têm sido isolados, utilizando as estratégias de mapeamento genético/físico de alta resolução (**map-based cloning ou positional cloning**). Esse tipo de trabalho tem o objetivo de encontrar marcadores moleculares próximos/ligados ao gene de interesse, saturando a região onde o gene se localiza, com vários marcadores, o que vem sendo acelerado/facilitado em algumas espécies cujos genomas completos já estão disponíveis. Os **mapas de ligação (linkage maps)** são construídos com base em análises da segregação dos marcadores em uma população segregante, geralmente na geração  $F_2$ . Na construção destes mapas, quando marcadores polimórficos são encontrados, eles devem ser validados em toda a população de mapeamento, que é a **genotipagem** da população. Portanto, o DNA de cada indivíduo da população de mapeamento deve ser extraído. As taxas de segregação esperadas para marcadores dominantes e codominantes para uma população  $F_2$  são, respectivamente, 3:1 e 1:2:1 (Collard et al., 2005). Desvios significativos entre taxas esperadas e taxas observadas, podem ser analisados usando o teste qui-quadrado. Geralmente, os marcadores segregarão em um modelo Mendeliano, embora taxas de segregação distorcidas possam ser encontradas, especialmente em cruzamentos interespecíficos envolvendo espécies cultivadas e selvagens (Sayed et al., 2002; Xu et al., 1997). A última etapa para a construção de um mapa de ligação envolve a análise dos dados obtidos de cada marcador de DNA de cada um dos indivíduos da população e a análise da ligação utilizando softwares com essa função, sendo os mais usados: Map-maker/EXP (Lander et al., 1987), MapManager QTX (Manly et al., 2001) e JoinMap (Stam, 1993). Algumas análises mais simples podem ser feitas de forma manual, dividindo o número de indivíduos recombinantes para os fatores analisados pelo total de indivíduos da população, contudo, para construir mapas com grande número de marcadores, é recomendado o uso de softwares. A acurácia para medir a distância genética e determinar a ordem dos marcadores está diretamente relacionada com o tamanho da população de mapeamento. Populações segregantes ideais para construção de mapas de ligação devem possuir no mínimo 50 indivíduos (Young, 1996). A distância no mapa de ligação é medida em termos de frequência da recombinação entre marcadores genéticos (Paterson, 1996), essa distância é medida em centiMorgans (cM), pois a frequência de recombinação e a frequência de *crossing-over* não são linearmente relacionadas (Paterson, 1996). Quanto maior a distância entre e dos marcadores com o fator estudado, maior a chance de ocorrer recombinação durante a meiose. Quando as distâncias mapeadas são pequenas (<10cM), a distância mapeada se iguala à frequência de recombinação. Entretanto, esta relação não se aplica a distâncias mapeadas maiores que 10 cM (Paterson, 1996). Com o desenvolvimento de mapas genéticos superdensos, vários marcadores moleculares em estreita ligação ou mesmo dentro de alguns desses genes (= marcadores funcionais) já estão disponíveis para ser utilizados em seleção assisti-

da. Além disso, esses mapas de alta densidade são fundamentais para localizar regiões do genoma que possuem genes controlando a expressão de características complexas (poligênicas) são denominadas de **QTLs (= quantitative trait loci)** (Tanksley, 1993; Tanksley & Fulton, 2007). Os QTLs associados com uma dada característica quantitativa podem estar localizados em diferentes cromossomos e apresentar diferentes contribuições na expressão do fenótipo em estudo. Vários QTLs associados com diferentes caracteres de efeito quantitativo já foram identificados estando associados com a chamada resistência horizontal a diferentes doenças (Young, 1996).

## 7. Aplicações das ferramentas de biologia avançada e de análise genômica disponíveis para o melhoramento do tomateiro

No tomateiro, esses grandes avanços da genética molecular se concentraram no desenvolvimento e uso de marcadores moleculares, a fim de facilitar o mapeamento de genes de interesse e sua transferência para linhagens elite (Eshed & Zamir, 1995; Saliba-Colombani et al., 2000). O tomate foi uma das primeiras espécies cultivadas para as quais marcadores genéticos e mapas foram desenvolvidos para fins de reprodução (Shirasawa & Hirakawa, 2013). Marcadores moleculares baseados em PCR e seleção assistida por marcadores estenderam os limites de seleção fenotípica tradicional (Folad & Panthee, 2012). Dados moleculares de DNA mitocondrial, RFLPs, microssatélites, isoenzimas e a análise de sequência do gene nuclear *Granule-bound starch synthase* (GBSSI = *waxy*) foram a base de estudos de reavaliação taxonômica do tomateiro que culminaram com a transferência esta espécie bem como espécies correlatas do gênero *Lycopersicon* para o gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) (Spooner et al., 2005). Na última década, as ferramentas disponíveis para identificar genes de resistência candidatos revolucionaram esse procedimento. Sobretudo, como comentado, a partir da evolução da eficiência dos métodos de sequenciamento.

### 7.1. Obtenção dos genomas completos de diversas cultivares do tomateiro e seu potencial uso no melhoramento genético da cultura

Em 2012, o primeiro genoma de referência (da linhagem de ‘Heinz 1706’) foi obtido e disponibilizado após um trabalho coordenado por um consórcio de 14 países que sequenciaram todos os doze cromossomos do tomateiro (The Tomato Genome Sequencing Consortium, 2012). Após isso, foram conduzidos trabalhos de resequenciamento do genoma completo de um grande número de variedades de tomateiro e acessos de espécies silvestres do gênero *Solanum* (secção *Lycopersicon*) (The Tomato

Genome Sequencing Consortium, 2014). Antes disso, diversos genes de resistência a doenças já haviam sido localizados nos diferentes cromossomos via mapeamento genético e físico (= posicional) de alta resolução (Barone et al., 2009). Essas informações criaram novas possibilidades de pesquisa em termos de identificação e localização genética, estudos de função genética, diversidade genética e evolução, não apenas no tomate, mas também em forma comparativa com outras espécies da família Solanaceae (Menda et al., 2013). As informações geradas sobre o genoma do tomate (sequências, genes, mapas físicos e genéticos) bem como sua anotação (International Tomato Annotation Group – ITAG). Dados de transcrito, estruturas de proteínas, previsão de funções de genes e desenvolvimento de vários softwares utilitários para bioinformática são gerenciados e disponíveis nos porta da Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/>) (Bombarely et al., 2010) e também no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além disso, esses *sites* armazenam informações sobre outras espécies de plantas, permitindo análises genômicas comparativas. O genoma completo de diversas cultivares de polinização aberta de *S. lycopersicum* e de outras espécies selvagens tem sido rapidamente obtido via sequenciamento de nova geração (Lin et al., 2014). As informações moleculares advindas desses projetos têm permitido a síntese de primers de PCR altamente específicos que estão sendo empregados para gerar uma nova classe de marcadores moleculares associados com fenótipos de interesse.

## 7.2. Identificação de genes de resistência via mapeamento

Como mencionado, os marcadores moleculares ideais são aqueles denominados **marcadores funcionais**, ou seja, derivados dos próprios genes que conferem a característica de interesse. Diversos genes de resistência a doenças têm sido isolados, utilizando as estratégias de mapeamento genético/físico de alta resolução (**map-based cloning** ou **positional cloning**). Esse tipo de trabalho tem como objetivo inicial encontrar marcadores moleculares próximos/ligados ao gene de interesse e como objetivo final identificar o gene responsável pela expressão da característica e utilizar essa informação para gerar um marcador funcional (preferencialmente codominante). Esse trabalho de **clonagem posicional** pressupõe a saturação da região genômica onde o gene se localiza com uma densidade grande de marcadores moleculares. Esse trabalho vem sendo acelerado/facilitado em algumas espécies cujos genomas completos já estão disponíveis. O primeiro gene de resistência a ser isolado em tomateiro e um dos primeiros genes de resistência em plantas foi gene *Pto* que controla resistência a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e codifica uma quinase (Martin et al., 1993). O gene *Pto* foi identificado como parte de um *cluster* (agrupamento) de genes que foram isolados via clonagem posicional (**Figura 8**). Outro membro deste *cluster* fisicamente ligado ao *Pto* é o gene *Prf* que é necessário para conferir completa resistência a bactéria (Salmeron et al., 1996). Outro gene ligado aos genes *Pto* e *Prf* é o gene *Fen* que confere sensibilidade ao inseticida Fenthion (Salmeron et al., 1996). Ensaios com este inseticida têm sido empregados com sucesso como um método de seleção indireta para resistência a *P. syringae* pv. *tomato*. Plantas resistentes apresentam uma reação de fito-

toxidez ao inseticida, apresentando pequenas pontuações necróticas após a aplicação do produto. Marcadores codominantes (derivados do gene *Pto*) têm sido empregados em sistemas de seleção assistida, com ilustrado na **Figura 9**.

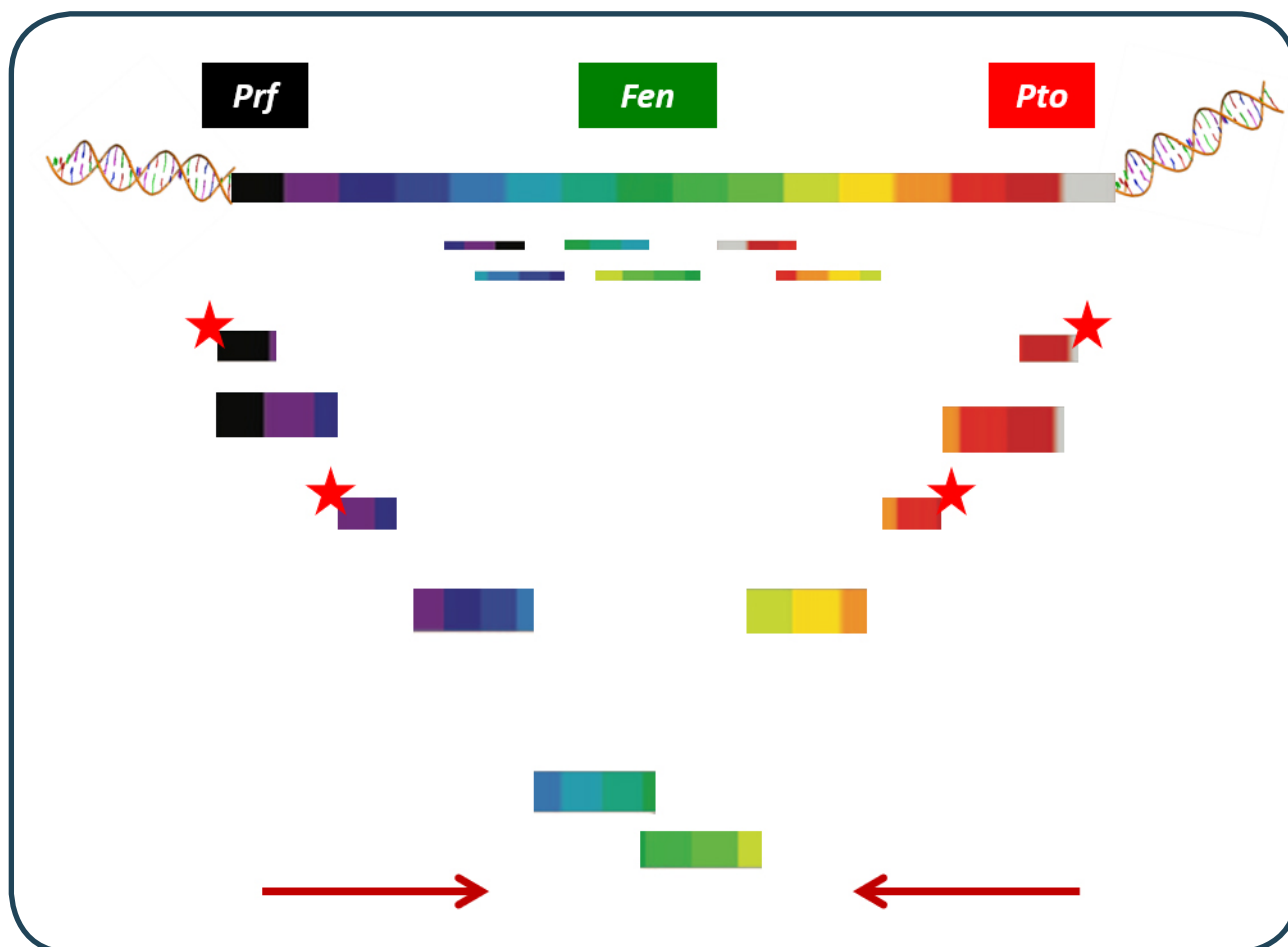
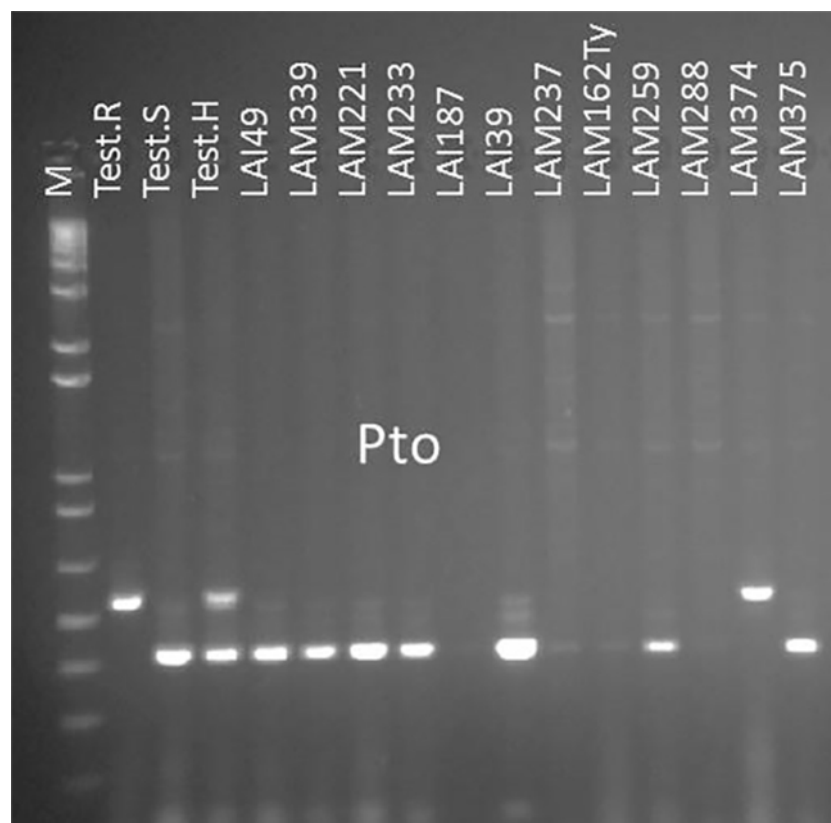


Figura 8. Estratégia de "chromosome walking" no cromossomo 5 do tomateiro: Clonagem posicional do gene de sensibilidade ao inseticida Fenthion (*Fen*) usando marcadores moleculares para as regiões flangeadoras correspondendo aos genes *Prf* & *Pto*, que conferem resistência a bactéria *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*. Nesta estratégia, os insertos de clones (DNA clivado e inserido em vetores) contendo os genes *Prf* e *Pto* tem sua sequência definida e são desenhadas novas sondas para sua extremidade. A ligação destas sondas com o fenótipo deve ser checada na população segregante. As novas sondas devem estar mais próximas (= menor número de recombinantes) do gene *Fen* que as sondas iniciais, demonstrando o avanço na direção do gene. Estes ciclos são repetidos até que o número de recombinantes seja zero e um mesmo clone seja selecionado em ambas as direções.

**Símbolo das sondas:** ★

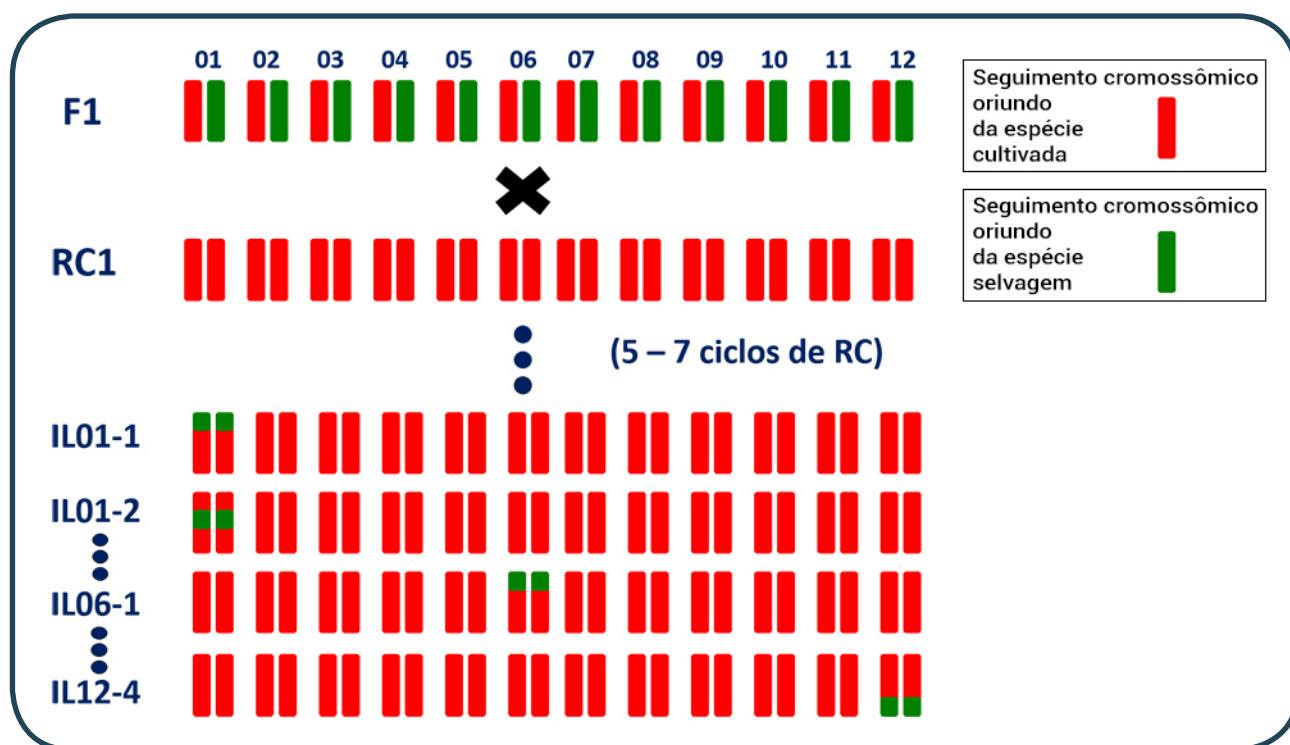


**Figura 9.** Análise em gel de agarose um marcador molecular codominante ligado ao gene *Pto* que confere resistência a bactéria *Pseudomonas tomato* pv. *tomato*. A testemunha homocigota resistente (Test. R) apresenta uma banda alta, a testemunha homocigota suscetível (Test. S) apresenta uma banda baixa e a testemunha heterocigota para o gene *Pto* (Test. H) apresenta dupla-bandas. A linhagem LAM 374 (parental do híbrido BRS Zamir) apresenta o gene *Pto* em homocigose. Para detalhes metodológicos ver Orsi et al. (2012).

### 7.3. Desenvolvimento de linhagens de introgressão

As linhagens de introgressão, conhecidas por sua sigla ILs (= *Introgression Lines*) são uma poderosa ferramenta para estudar a localização cromossômica de genes de resistência bem como QTLs (Eshed & Zamir,1995). Cada uma das ILs tem apenas uma única região genômica introgridida e, para todo o resto de genoma, essa linhagem é completamente idêntica a um parental conhecido (**Figura 10**). Esse o conjunto de introgressões individuais cobrem todos os distintos cromossomos. Como resultado, a variação fenotípica observada em uma IL particular pode ser associada com a correspondente região que foi introgridida via monitoramento por marcadores moleculares. Diferentes conjuntos de ILs foram obtidos em tomate, sendo o mais utilizado o conjunto derivado da espécie selvagem *S. pennellii* (Eshed & Zamir,1995). Regiões genômicas apresentando efeitos fenotípicos para diferentes características tais como rendimento, qualidade de fruto e resistência a doenças foram identificados usando essa ferramenta.



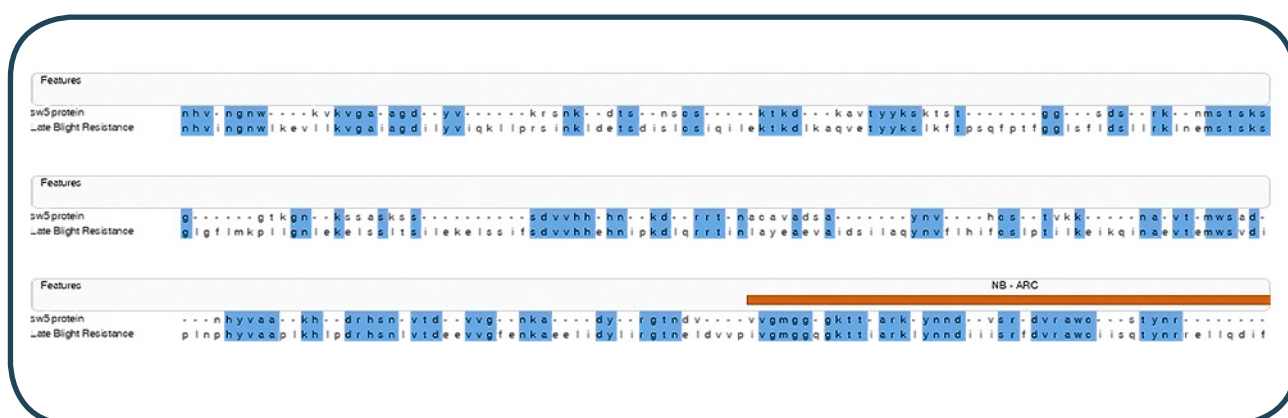


**Figura 10.** Esquema ilustrando a obtenção de linhagens de introgressão com o auxílio de marcadores moleculares.

## 7.4. Desenvolvimento de sistemas de marcadores derivados de genes análogos de resistência (RGAs)

A informação inicial sobre a estrutura dos genes de resistência a patógenos que foram clonados permitiu o estabelecimento de métodos mais eficientes e/ou simplificados, baseados em homologia com genes análogos/homólogos (**homology-based methods**), ou na busca por genes candidatos (Tomita et al., 2011). A análise desses genes sugere que as plantas desenvolveram um sistema de defesa que é conservado e que envolve receptores para reconhecimento dos patógenos. Os patógenos por sua vez podem silenciar esses mecanismos pela produção de proteínas efetoras que inibem o sistema imune tornando a planta suscetível. No processo de co-evolução, alguns desses efetores podem ser reconhecidos por uma segunda linha de defesa que envolve genes de resistência que induzem genes de imunidade (effector-triggered immunity – ETI). Esses genes de resistência a doenças em plantas (também denominados de genes R) são classificados em diferentes famílias de acordo com elementos conservados na estrutura das proteínas codificadas. A maioria das proteínas R contém uma região do tipo **nucleotide-binding site (NB)** e um domínio C-terminal do tipo **LRR (= leucine rich repeat)**. Um subconjunto destas famílias gênicas também apresenta um domínio do tipo **coiled-coil (CC)** na região 5' terminal. Os genes R dominantes clonados e estruturalmente caracterizados até o presente momento se enquadram como típicos genes R (Baggs et al., 2017) conhecidos como raça-específicos ou isolado-específicos que funcionam dentro do modelo de interação gene- a-gene. O reconhecimento de fatores de avirulência codificados pelo genoma de uma ampla gama de patógenos e a especifi-

cidade são condicionados pelas regiões C-terminais dos domínios LRR. O domínio NB funciona como um acionador molecular que regula a ativação da cadeia de transdução de sinais que leva ao fenótipo resistente (Baggs et al., 2017). O conhecimento dessas estruturas evolucionariamente conservadas dos genes de resistência pode ser utilizado em ferramentas de alinhamento de genomas de genótipos contrastantes buscando genes candidatos (**Figura 11**). Esses podem ser validados em populações segregantes visando busca de marcadores moleculares ou mesmo o próprio gene de resistência. Iniciadores ou “primers” específicos para genes de resistência conhecidos podem ser desenhados e utilizados para amplificar por PCR genes análogos em cultivares da mesma espécie, diferentes espécies e até diferentes gêneros. A especificidade destes primers depende do número de aminoácidos com múltiplos códons na sequência. O aminoácido Leucina apresenta o maior número de códons, o que força a utilização de uma coleção de primers com sequências variadas nesta posição. Uma alternativa também válida, embora mais cara, é empregar o nucleotídeo sintético Inosina, que forma par com qualquer base (A, C, G ou T). Após o desenho e síntese dos primers utiliza-se o DNA dos genótipos contrastantes como molde na busca de polimorfismos ligados a característica de interesse.

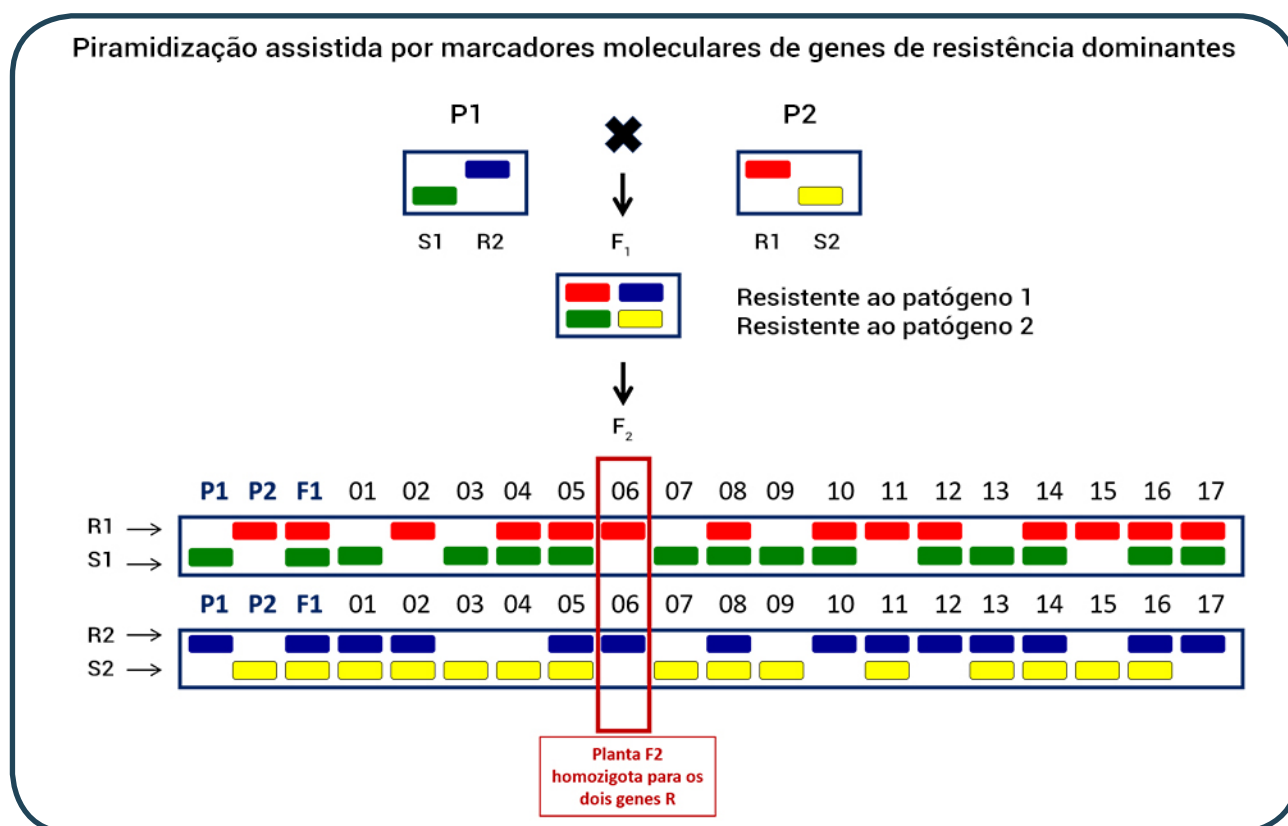


**Figura 11.** Alinhamento da sequência das proteínas de dois genes de resistência a doenças de tomateiro altamente polimórficos mostrando motivos idênticos (conservados) em azul. Iniciadores de síntese (“primers”) podem ser desenhados nessas regiões e o resultado da amplificação por PCR pode revelar polimorfismos ligados à resistência. Este tipo de marcador foi denominado DR analogs (disease resistance analogs = análogos de genes de resistência). O domínio conservado NB-ARC mostrado na figura refere-se a uma região ligada a transmissão de sinais que é comum em genes de resistência a doenças em plantas e associados com morte celular programada em animais.

## 7.5. Piramidização de genes de resistência

Um híbrido de tomateiro moderno deve apresentar a maior quantidade possível (“pacote”) de resistências incorporadas, principalmente contra doenças de solo e de etiologia viral, para as quais os tratamentos curativos são pouco efetivos. Um grande número de fatores de resistência genética presentes em acessos de tomateiro é do tipo monogênico/dominante. Isso possibilita a acumulação de múltiplos fatores

de resistência em um único híbrido. Nesta tarefa, a seleção assistida por marcadores moleculares desempenha um papel fundamental na seleção das linhagens parentais, permitindo “piramidar” genes em linhagens elite e quebrar ligações genéticas com características deletérias e/ou negativa (**Figura 12**).

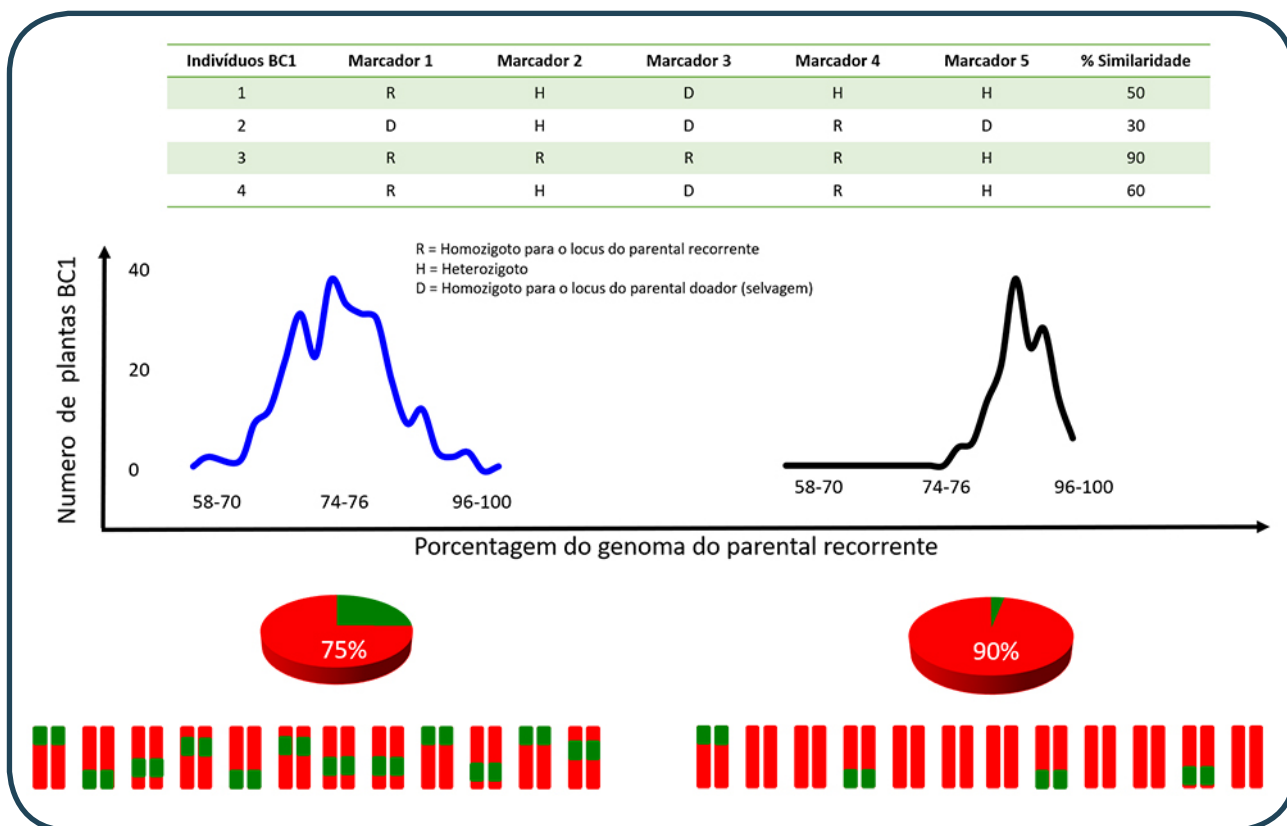


**Figura 12.** Piramidização de dois genes dominantes de resistência com o auxílio de marcadores moleculares codominantes. Indivíduo 06 (circulado em vermelho) contém os dois marcadores moleculares ligados aos genes de resistência em homocigose (fixados).

## 7.6. Retrocruzamento acelerado

O retrocruzamento é rotineiramente aplicado em programas de melhoramento para introgressão de genes. Esse método tem por objetivo recuperar o genoma do parental recorrente e, portanto, as características originais do material elite, ao mesmo tempo que incorpora características genéticas com alta herdabilidade, controladas por um ou poucos genes (Fehr, 1987), como por exemplo, fatores de resistência a doenças. Neste contexto, o retrocruzamento acelerado empregando marcadores moleculares é uma estratégia que visa aumentar a eficiência do processo, identificando de maneira precoce indivíduos que apresentam maiores níveis de recuperação do genoma do parental recorrente. A análise de polimorfismos distribuídos ao longo de todo o genoma dos parentais empregados nos cruzamentos envolve a chamada **genotipagem gráfica** onde são selecionados indivíduos com o novo gene de interesse incorporado e que possuem um menor número de segmentos cromossômicos do parental doador (Young & Tanksley, 1989). Este processo é conduzido preferencialmente com marcadores codominantes distribuídos, de preferência, em todos os braços dos cromossomos.

Essa estratégia pode fazer com que os níveis de recuperação do genoma de interesse possam ser rapidamente alcançados equivalendo a “saltos” em relação ao retrocruzamento convencional (**Figura 13**).



**Figura 13.** Esquema indicando o “salto” na recuperação do genoma do parental recorrente em sistema de retrocruzamento acelerado assistido por marcadores moleculares. A figura ilustra esse fato com o indivíduo #3 da população segregante resultante do retrocruzamento 1 (backcross – BC1) que apresentou 90% de similaridade com o genoma do parental recorrente (linha-gem elite) após genotipagem para cinco marcadores distribuídos pelo genoma do tomateiro. Isso indivíduo representa um incremento em comparação com a média teórica de recuperação do genoma do parental recorrente prevista nessa geração (75%).

## 7.7. Outras aplicações dos marcadores moleculares ligados a fatores de resistência

Marcadores moleculares codominantes ligados aos diferentes genes de resistência estão sendo empregados simultaneamente em sistemas de seleção assistida e para checagem de **pureza genética de híbridos** (Bhavana et al., 2019). A presença de misturas físicas de sementes ou de sementes oriundas apenas da autofecundação do parental feminino de um dado híbrido podem ser prontamente detectadas com esses tipos de marcadores. Os marcadores codominantes também podem ser utilizados para estimar o efeito de **dosagem gênica** na expressão fenotípica da resistência, como demonstrado por Ferro (2013) para o gene *Ty-1* que controla resistência contra begomovírus no tomateiro. Além disso, os marcadores moleculares ligados ou derivados

de genes de resistência são também de grande interesse como potenciais descritores dentro do sistema de **proteção de cultivares** preconizado pela International Union of Protection of Plant Varieties (UPOV). A avaliação de reação das novas potenciais cultivares para doenças nem sempre são simples devido a influência de fatores ambientais, dificultando uma fenotipagem precisa (Arens et al., 2010). Desta forma, dentro do contexto da UPOV os marcadores ligados a fatores de resistência têm o potencial para serem uma alternativa aos testes de patogenicidade, visando cumprir os requisitos necessários para serem incluídos nos testes de DHE (distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade) de novas variedades para concessão dos direitos dos melhoristas (Plant Breeders Rights – PBR) (Arens et al., 2010).

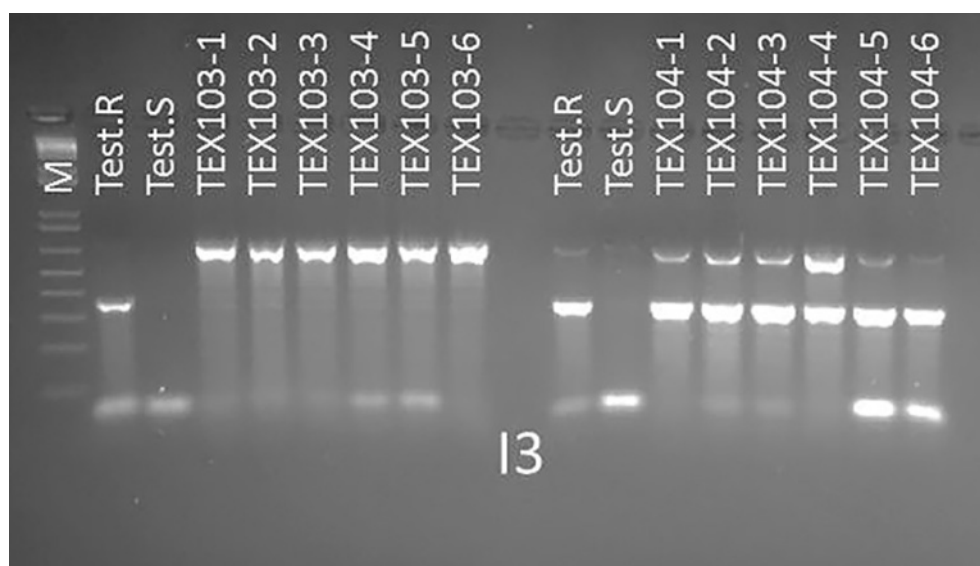
## 8. Exemplos de seleção assistida por marcadores (SAM) moleculares para diferentes patossistemas do tomateiro

A seleção assistida por marcadores consiste na identificação precoce de plantas que apresentam fenótipo desejável pela análise molecular de seu genótipo, o chamado **melhoramento genético acelerado** (Gosal & Wani, 2020) que também está sendo exercitado com o tomateiro (Kaushal et al., 2020). Os três requisitos básicos de um marcador para contribuir para SAM são: **(1)** O marcador deve estar fortemente associado ao gene de interesse; **(2)** A técnica deve ser eficiente para a avaliação de grandes populações e, preferencialmente, baseada em PCR; **(3)** A técnica deve mostrar-se altamente reproduzível entre laboratórios, ser econômica e de fácil condução (Mohan et al., 1997). O desenvolvimento de mapas genéticos extremamente densos tem permitido a localização genômica/isolamento de genes e a identificação de diversos marcadores moleculares com essas propriedades desejadas para emprego em SAM (Barone et al., 2009, Foolad & Panthee, 2012). SAM tem sido utilizada com sucesso para vários caracteres de herança simples (monogênicos), fazendo o processo de seleção mais rápido e eficiente. Vários marcadores moleculares em estreita ligação ou mesmo dentro de alguns desses genes (marcadores funcionais) já estão disponíveis para ser utilizados em seleção assistida. Regiões do genoma que possuem genes controlando a expressão de características complexas (poligênicas = QTLs) também têm sido mapeadas (Tanksley & Fulton, 2007). Os QTLs associados com uma dada característica quantitativa podem estar localizados em diferentes cromossomos e apresentar diferentes contribuições na expressão do fenótipo em estudo. O tomateiro é uma das plantas que serviram de modelo para o isolamento dos primeiros QTLs envolvendo tamanho e massa do fruto (Tanksley & Fulton, 2007). Vários QTLs associados com diferentes caracteres de efeito quantitativo já foram identificados e mapeados tais como: rendimento, qualidade de fruta, tolerância a estresses e **resistência horizontal** a diferentes doenças (Young, 1996). A seguir, vamos apresentar alguns exemplos da utilização de SAM no melhoramento genético do tomateiro.



## 8.1. Seleção assistida para fatores de resistência contra raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL)

A doença murcha vascular é causada por raças do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). Quatro genes da série I (*Immunity*, designados como *I-1*, *I-2*, *I-3* e *I-7*) foram caracterizados conferindo tanto resistência do tipo raça-específica quanto resistência de amplo espectro contra isolados de FOL. O primeiro gene identificado (*I-1*) apresenta resistência restrita a isolados de FOL raça 1, tendo sido introgridido da espécie silvestre *Solanum pimpinellifolium* e mapeado no cromossomo 11. Um segundo gene (*I-2*) se mostrou efetivo contra isolados de FOL raça 1, sendo introgridido do acesso *S. pimpinellifolium* PI 126915. O segmento genômico portando o gene *I-2* já foi clonado e isolado (Simons et al., 1998), sendo localizado também no cromossomo 11. Um novo gene de resistência efetivo contra isolados de FOL raça 3 foi introgridido a partir do acesso de *S. pennellii* ‘LA-716’ e se localiza no cromossomo 7 (Panthee & Chen, 2010). Posteriormente foi verificado que esse gene introgridido a partir de um acesso *S. pennellii* (denominado *I-3*) confere resistência a isolados FOL raça 2 e raça 3 (Catanzariti et al., 2015). O gene *I-3* pertence à família de genes do tipo “S-receptor-like kinase” (SRLK), constituindo uma nova classe de genes de resistência (Catanzariti et al., 2015). O gene dominante *I-7* (localizado no cromossomo 8) funciona contra isolados de todas as raças FOL, tendo sido introgridido de *S. pennellii* PI 414773 (Gonzalez-Cendales et al., 2016). O gene *I-7* foi isolado com o auxílio de análise de transcrito (Gonzalez-Cendales et al., 2016) e codifica uma proteína do tipo “leucine-rich repeat receptor-like protein” (LRR-RLP). Marcadores moleculares ainda não estão disponíveis para o gene *I-7*, que foi apenas recentemente clonado (Gonzalez-Cendales et al., 2016). No entanto, sistemas de marcadores moleculares específicos foram desenvolvidos e já se encontram disponíveis para monitorar as regiões genômicas que contêm os fatores de resistência *I-1* (Parmar & Subramanian, 2011), *I-2* (El Mohtar et al., 2007) e *I-3* (Lim et al., 2006; 2008). Um protocolo para detecção simultânea dos genes *I-1*, *I-2* e *I-3* via PCR multiplex já está disponível e pode ser empregado para auxiliar o processo de seleção (Carrer Filho et al., 2016). Um exemplo de detecção do específica do gene *I-3* é ilustrado na **Figura 14**.



**Figura 14.** Marcador molecular codominante para detecção do gene *I-3* no cromossomo 7 (introgredido a partir do acesso de *Solanum pennellii* 'LA-716') que confere resistência a isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* classificados dentro das raças 2 e 3. As linhagens TEX104-1 até TEX104-4 são homocigotas resistentes, enquanto as linhagens TEX104-5 e TEX104-6 são heterocigotas para o gene *I-3*. Para os detalhes metodológicos deste marcador ver Barillas et al. (2008).

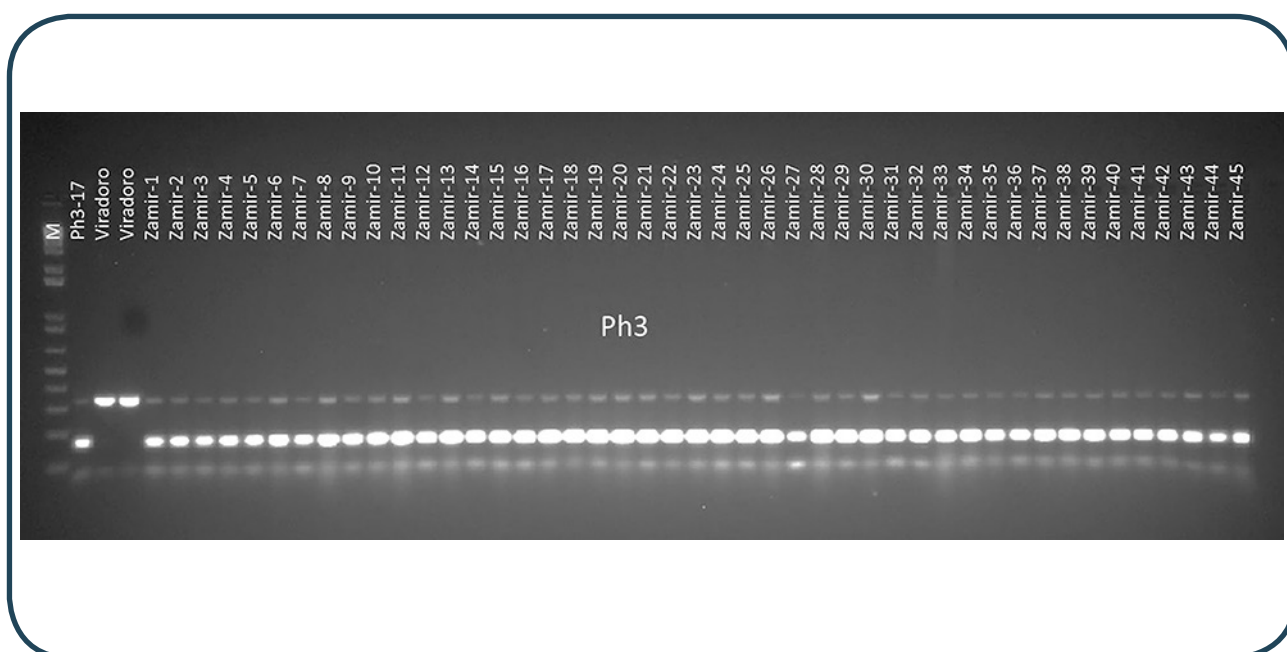
## 8.2. Seleção assistida resistência à podridão de co-roa causada por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Um gene dominante (*Frl*) de resistência a isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* foi introgredido de *S. peruvianum*, estando presente nos acessos PI 126944, PI 128650 e PI 126926. O gene *Frl* está localizado no cromossomo 9 e ligado com os genes/alelos do gene *Tm-2/Tm-2<sup>2</sup>* que controlam resistência a patótipos de tomate mosaic virus – ToMV (Fazio et al., 1999). Esse gene ainda não foi clonado e apenas marcadores RAPD e SCAR estão disponíveis para esse locus (Fazio et al., 1999).

## 8.3. Seleção assistida para fatores de resistência contra a requeima (*Phytophthora infestans*)

O primeiro gene de resistência para *P. infestans* descrito no tomateiro foi o locus *Ph-1* introgredido de um acesso de *S. pimpinellifolium* que se mostrou efetivo contra um

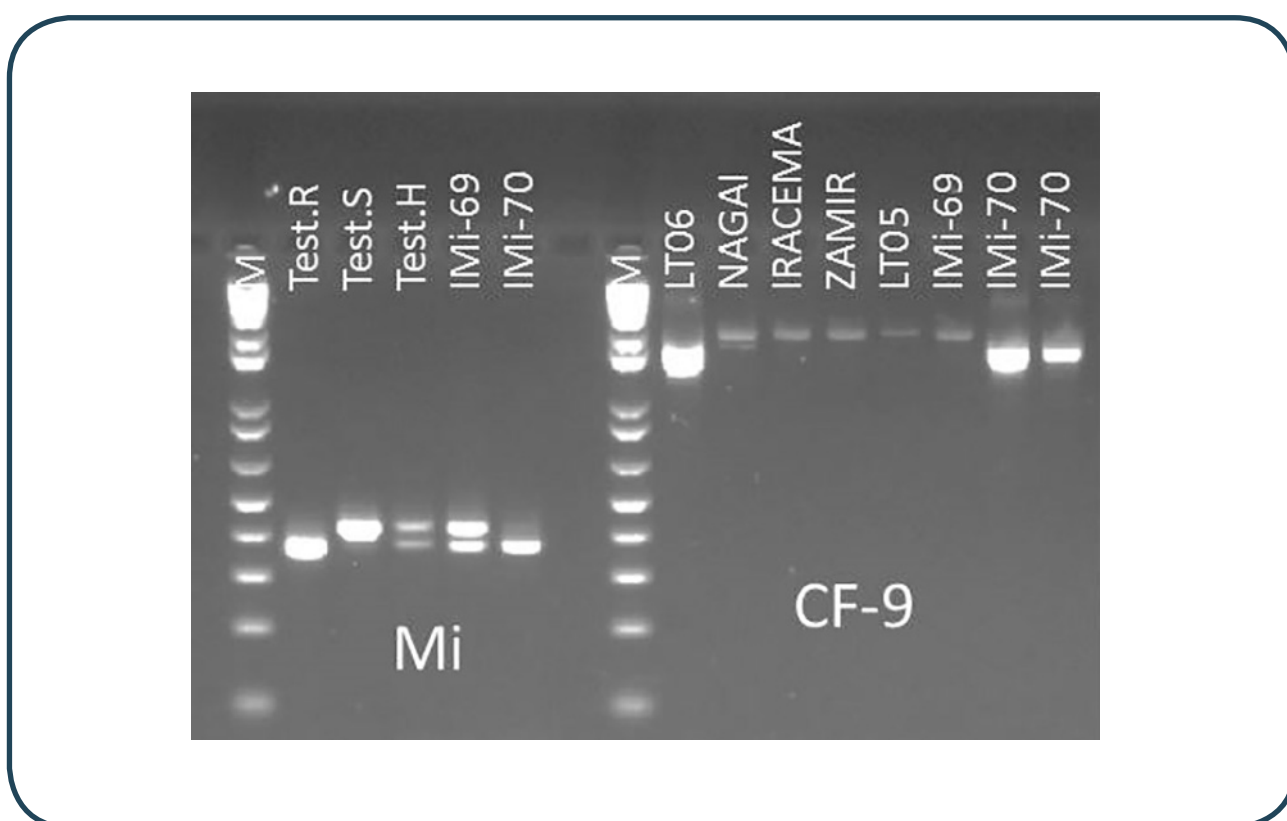
número limitado de raças/variantes do patógeno. Essa resistência foi mapeada no cromossomo 7, mas não se mostra efetiva em condições amplamente favoráveis ao patógeno (Panthee & Chen, 2010). O gene *Ph-2* (também oriundo de *S. pimpinellifolium*) foi descrito posteriormente e apresenta dominância parcial contra alguns isolados de *P. infestans*. Este gene está localizado no cromossomo 10 em estreita associação com os marcadores moleculares TP105 e TG233, mas apresenta certa instabilidade térmica (Panthee & Chen, 2010). O gene de resistência a *P. infestans* mais utilizado em programas de melhoramento é o *Ph-3* (também introgridido de *S. pimpinellifolium*) que apresenta o mais amplo espectro de eficiência. O gene *Ph-3* está localizado no cromossomo 9 em estreita associação com o marcador molecular TG591A (Panthee & Chen, 2010). Mais recentemente, o gene *Ph-3* foi isolado via clonagem posicional (Zhang et al., 2014). A análise de sua sequência apresentou as características típicas de um gene R contendo os domínios conservados CC-NB-LRR. Novos marcadores derivados da própria sequência do gene que estão disponíveis após a clonagem deste fator de resistência (Zhang et al., 2014). Uma análise de um marcador ligado com o gene *Ph-3* é apresentada na **Figura 15**. QTLs controlando uma resistência horizontal de amplo a isolados de *P. infestans* foram também mapeados em cruzamentos envolvendo a fonte original da resistência (*S. habrochaites*) e com linhagens de tomateiro cultivado (Li et al., 2011).



**Figura 15.** Marcador codominante para detecção do gene *Ph-3* no cromossomo 9 (introgridido de *Solanum pimpinellifolium*), que confere resistência contra um amplo espectro de isolados do oomiceto *Phytophthora infestans* (Zhang et al., 2014). A cultivar 'Viradoro' é suscetível ao oomiceto enquanto que a linhagem *Ph3-17* e o híbrido BRS Zamir são resistentes. Esse marcador codominante também serve para checar a pureza do híbrido BRS Zamir. No exemplo, dez plantas desse híbrido foram amostradas e 100% delas se mostraram heterozigotas para o gene *Ph-3*.

## 8.4. Seleção assistida para fatores de resistência à mancha foliar de *Cladosporium*

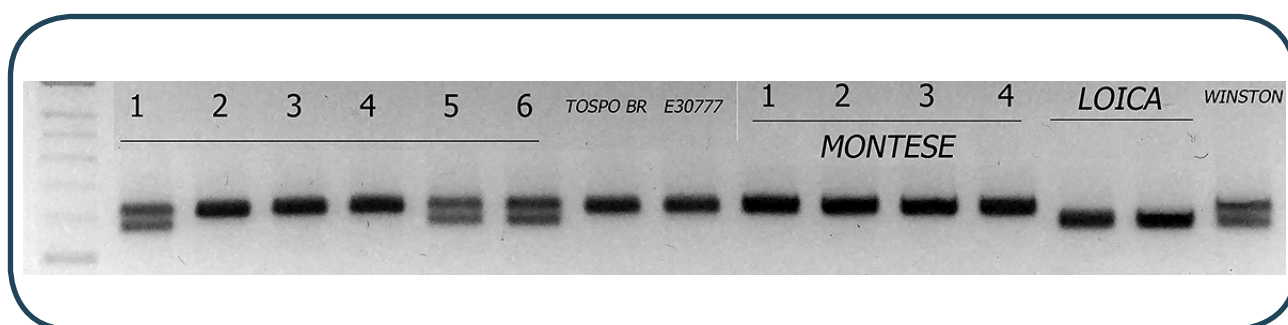
Alelos e genes (*Cf-1* até *Cf-9*) que controlam resistência a diferentes raças de *Pas-salora fulva* (= *Cladosporium fulvum*). Os genes *Cf-2* e *Cf-5* estão no cromossomo 6 ligados em associação com o gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides das galhas (Dixon et al., 1996). Por sua vez, os genes *Cf-1*, *Cf-4* e *Cf-9* estão localizados no cromossomo 1 (Jones et al., 1994; Thomas et al., 1997). Todos esses genes já foram clonados bem como os genes de avirulência correspondentes no patógeno (Medina et al., 2015). Uma análise de um marcador associado com o gene *Cf-9* é apresentada na **Figura 16** junto com um gel com o marcador molecular ligado gene *Mi-1.2* (que funciona também como marcador para a presença dos genes *Cf-2* e *Cf-5*) devido ao fato desse bloco gênico residir em um segmento cromossômico com uma frequência de recombinação extremamente reduzida (Rossi et al., 1998; Vos et al., 1998).



**Figura 16.** Uma análise de um marcador dominante associado com o gene *Cf-9* (localizado no cromossomo 1) apresentada junto de um gel com o marcador molecular codominante ligado gene *Mi-1.2*. Os genes/alelos *Cf-2* e *Cf-5* estão no cromossomo 6 ligados em associação com o gene *Mi-1.2* de resistência aos nematoides das galhas. Marcador ligado ao gene *Mi-1.2* é detectado diretamente via PCR devido a presença de um INDEL entre os sítios de anelamento dos primers Mi23F: 5'-TGG-AAA-AAT-GTT-GAA-TTT-CTT-TTG-3' e Mi23R: 5'-GCA-TAC-TAT-AT-G-GCT-TGT-TTA-CCC-3' (ver detalhes metodológicos em Bhavana et al., 2019). A linhagem LT-06 apresenta o gene *Cf-9* assim como a linhagem IMI-70. As demais linhagens não possuem o gene. A linhagem IMI-70 também é homocigota para o gene de resistência *Mi-1.2* enquanto a linhagem IMI-69 é heterocigota.

## 8.5. Seleção assistida para fatores de resistência contra *Verticillium dahliae* raça 1

Resistência a isolados de *Verticillium* foi inicialmente identificada em 1932 no acesso *S. lycopersicum* var. *cerasifore* 'Peru Wild (Kawchuk et al., 2001). Esta resistência é raça 1-específica, apresentando herança simples, monogênica e dominante (Kawchuk et al., 2001). A resistência derivada de 'Peru Wild' é condicionada por um locus complexo composto por dois genes *Ve-1* e *Ve-2* que se localizam no cromossomo 9 do tomateiro (Diwan et al., 1999; Kawchuk et al., 2001). Experimentos posteriores a clonagem desse locus, indicaram que apenas o gene *Ve-1* é o responsável pela expressão da resistência (Fradin et al., 2009). Um marcador codominante ligado ao gene *Ve-1* é apresentado na **Figura 17**. Esse sistema de marcadores não apresenta estabilidade e pode ser resultado de depósitos de sequência errôneos como sugerido por Arens et al. (2010).



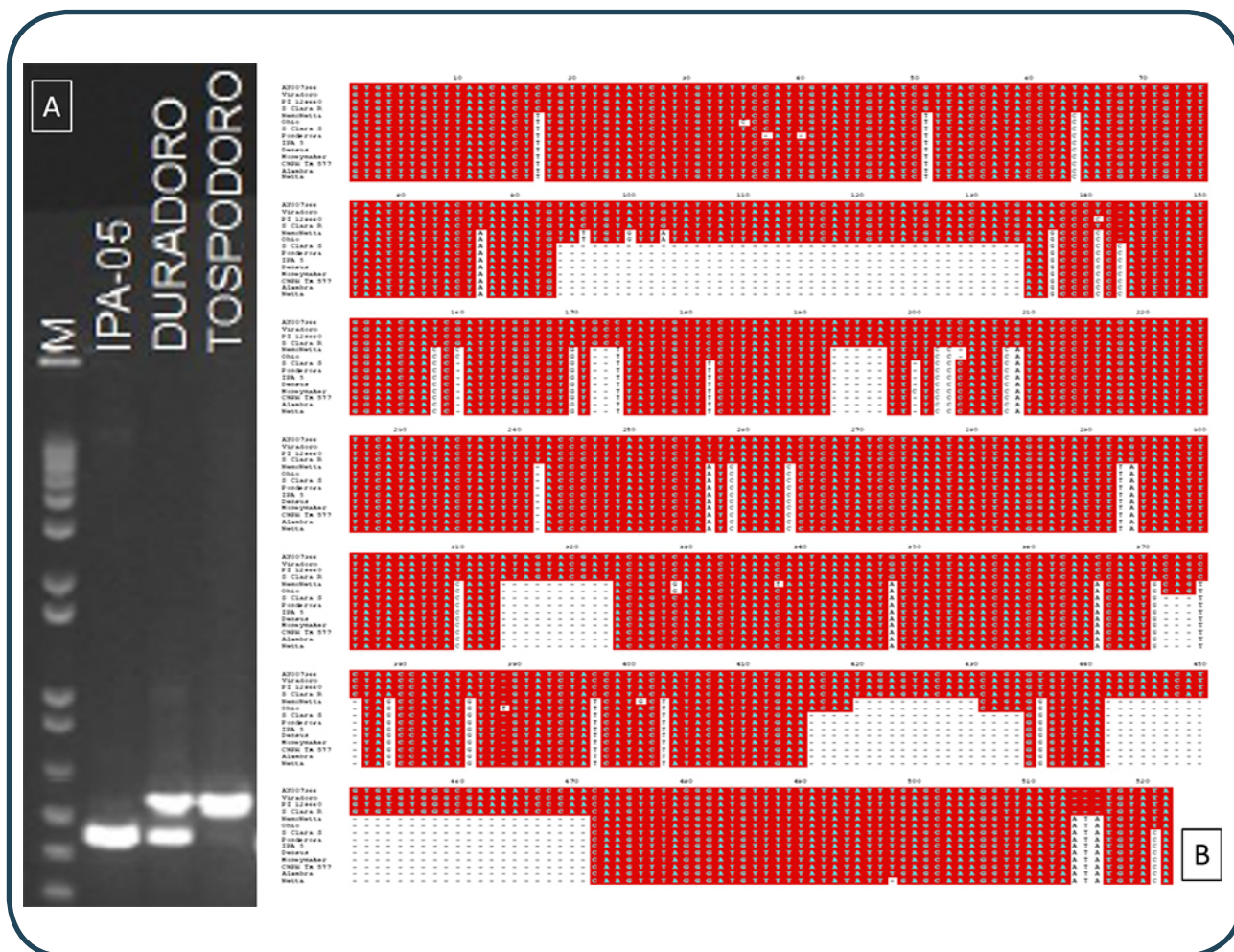
**Figura 17.** Gel de agarose (2%) para detecção do marcador molecular codominante derivado de informação genética do locus complexo (*Ve-1* e *Ve-2*) no cromossomo 9 que controla resistência a isolados de *Verticillium dahliae* raça 1 no tomateiro (Kawchuk et al., 2001; Arens et al., 2010). Dados recentes indicam que apenas o gene *Ve-1* é o responsável pela expressão da resistência ao fungo. O híbrido BRS Montese é resistente a *V. dahliae* raça 1 (banda alta), enquanto a cultivar 'Loica' é suscetível (banda baixa). O híbrido 'Winston' é heterozigoto para o gene *Ve-1* (presença das duas bandas).

## 8.6. Seleção assistida para resistência a orthospovirus

As três espécies predominantes de *Orthospovirus* que causam a doença conhecida como “vira-cabeça” do tomateiro no Brasil são: tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato chlorotic spot virus (TCSV) e groundnut ringspot virus (GRSV). O gene *Sw-5b* confere resistência de tipo imunidade para quase todas as variantes genéticas dentro do gênero e tem sido o fator mais utilizado no desenvolvimento de cultivares resistentes (Oliveira et al., 2018). Esse locus foi introgridido de *S. peruvianum* e apresenta um amplo espectro de ação contra distintas espécies de *Tospovirus* que infectam tomateiro (Dianese et al., 2011) O gene *Sw-5b* é um típico membro da família de genes R do classe CC-NBS-LRR (Brommonschenkel et al., 2000). O gene *Sw-5b* foi mapeado no



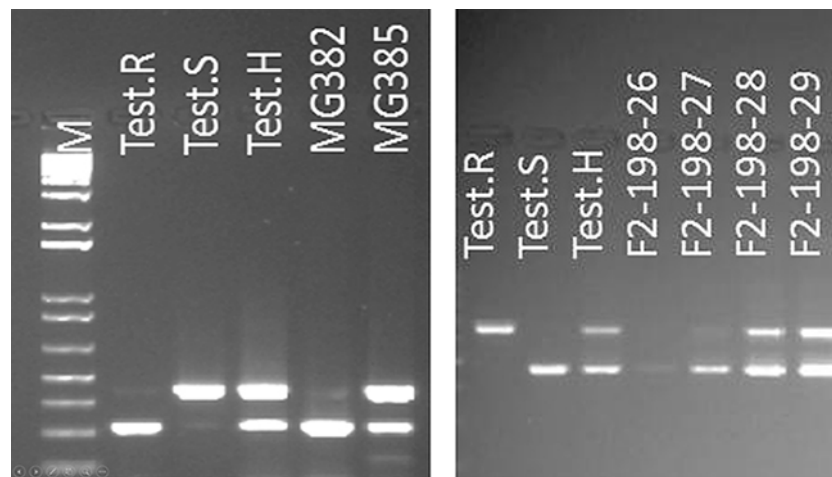
cromossomo 9 e gene reside dentro de um complexo gênico formado por cinco cópias análogas de um mesmo gene ancestral, denominadas *Sw-5a* até *Sw-5e* (Spasova et al., 2001). Um sistema de seleção assistida por um marcador funcional e codominante foi desenvolvido por Dianese et al. (2010). Este sistema permite a discriminação em gel de agarose do alelo resistente e duas variantes alélicas do gene *Sw-5b* associadas com suscetibilidade, devido a presença de variáveis níveis de deleção na região amplificada dos alelos de suscetibilidade (**Figura 18**).



**Figura 18.** Painel A: Gel de agarose exemplificando um sistema de seleção assistida por um marcador funcional e codominante (para detalhes metodológicos ver Dianese et al., 2010) usado para detecção do alelo resistente e duas variantes alélicas associadas com suscetibilidade do gene *Sw-5b* (que condiciona resistência a diferentes espécies de orthospovírus). M= marcador de peso molecular; IPA-5 = cultivar suscetível; Duradoro = híbrido heterozigoto e Tospodoro = cultivar homozigota resistente. Painel B: Representação esquemática do alinhamento das sequências de 14 cultivares/acessos de tomateiro na região genômica flanqueada pelos primer e que engloba um segmento do gene *Sw-5b*. As regiões assinaladas em vermelho correspondem a nucleotídeos conservados e as regiões assinaladas em branco representam polimorfismos em relação ao alelo de resistência presente nas cultivares resistentes (Linha 1 até Linha 4). As cultivares suscetíveis (Linha 5 até Linha 14) apresentam variáveis níveis de deleção na região amplificada.

## 8.7. Seleção assistida para resistência a geminivírus (=begomovírus)

Os programas de melhoramento dispõem de distintas fontes de resistência contra begomovirose, muitas delas mapeadas e com os seus produtos gênicos caracterizados (**Tabela 1**). O gene *Ty-1* controla resistência parcial ao begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* (De Castro et al., 2007). O gene *Ty-1* também é efetivo contra espécies virais de genoma bipartido do Brasil (Boiteux et al., 2012b), sendo localizado no cromossomo 6 em repulsão com o gene *Mi-1.2* (De Castro et al., 2007). Análise com um sistema de marcador molecular ligado ao locus *Ty-1* está ilustrado na **Figura 19**. Trabalhos de mapeamento genético conduzidos por Verlaan et al. (2011) permitiram isolar o gene *Ty-1* e confirmar que ele codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RDR) pertencente ao tipo RDRy, representando uma nova classe de fatores de resistência inteiramente nova que confere esse fenótipo através da intensificação dos níveis do silenciamento gênico transcricional (Butterbach et al., 2014). O gene *Ty-2* (localizado no cromossomo 11) foi introgridido de *S. habrochaites* (Yang et al., 2014) e funciona também contra espécies de genoma bipartido do Brasil (Boiteux et al., 2012b). Recentemente se determinou que o gene *Ty-2* pertence à classe de genes R contendo os domínios conservados NB-LRR (Yamaguchi et al., 2018). O gene *Ty-3* foi introgridido dos acessos de *S. chilense* 'LA-1932' e 'LA-2779' (Hutton et al., 2012) e está ligado ao locus *Ty-1* no cromossomo 6 (Ji et al., 2007). Estudos moleculares demonstraram que os genes *Ty-1* e *Ty-3* são muito provavelmente alélicos (Verlaan et al., 2013). O gene *Ty-4* foi introgridido de *S. chilense* 'LA-1932', localizado no cromossomo 3 (Ji et al., 2009). Estudos de mapeamento e validação funcional do gene recessivo *ty-5* (Hutton et al., 2012) demonstraram que este fator corresponde a um gene *Pelota* (envolvido na fase de reciclagem do ribossomo na síntese de proteína). Silenciamento desse gene em uma linhagem suscetível tornou as plantas transgênicas altamente resistentes ao TYLCV. O gene *Pelo* oferece, portanto, uma rota alternativa para promover a resistência ao TYLCV e outros vírus relacionados ou não (Lapidot et al., 2015; Wang et al., 2018). O gene recessivo *tcm-1* condiciona um amplo espectro de resistência contra distintas espécies de begomovírus com genoma bipartido e monopartido (Giordano et al., 2005) e está localizado no cromossomo 6 (Machado, 2013).



**Figura 19.** Análise com marcadores codominantes ligados ao locus *Ty-1* (marcador do tipo CAPS) e ao locus *Ty-3* (marcador codominante obtido diretamente via PCR devido a presença de um INDEL na região interna ao sítio de anelamento dos primers). O gene *Ty-1* controla resistência parcial ao begomovírus *Tomato yellow leaf curl virus* e contra espécies virais de genoma bipartido que ocorrem no Brasil. O gene *Ty-3* foi introgridido dos acessos de *S. chilense* 'LA-1932' e 'LA-2779' está ligado ao locus *Ty-1* no cromossomo 6. Estudos moleculares demonstraram que os genes *Ty-1* e *Ty-3* são muito provavelmente alélicos. Para detalhes metodológicos ver Machado (2013).

**Tabela 1.** Genes de resistência a espécies de *Begomovirus* utilizados em sistemas de seleção assistida por marcadores no melhoramento genético do tomateiro.

Gene	Localização cromossômica	Mecanismo de resistência	Espectro de eficiência (contra quais begomovírus a resistência foi avaliada)	Fontes de resistência
<i>Ty-1</i>	6 (Verlaan et al., 2013)	DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerase (Verlaan et al., 2013)	TYLCV (Vidasky et al., 2008); ToCMoV, ToRMV, ToSRV ToY-VSV (Boiteux et al., 2012b).	<i>S. chilense</i> LA 1969
<i>Ty-2</i>	11 (Yang et al., 2014)	Proteína contendo domínios <i>nucleotide-binding site</i> (NB) & <i>leucine rich repeat</i> (LRR) (Yamaguchi et al., 2018)	TYLCV (Yamaguchi et al., 2018); ToSRV (Boiteux et al., 2012b)	<i>S. habrochaites</i> B6013 e H-24
<i>Ty-3</i>	6 (Verlaan et al., 2013)	Variante alélica de <i>Ty-1</i> (Verlaan et al., 2013)	TYLCV & ToMoV (Vidasky et al., 2008)	<i>S. chilense</i> LA 1932
<i>Ty-4</i>	3 (Ji et al., 2009)	Ainda não caracterizada	TYLCV & ToMoV (Vidasky et al., 2008)	<i>S. chilense</i> LA 1932
<i>ty-5</i>	4 (Lapidot et al., 2015)	Gene codificador de um homólogo do mRNA surveillance factor <i>Pelota</i> ( <i>Pelo</i> ) (Lapidot et al., 2015).	TYLCV (Gill et al., 2019). Não funciona para isolados de ToMoV da Flórida (Gill et al., 2019).	<i>S. peruvianum</i>

Gene	Localização cromossômica	Mecanismo de resistência	Espectro de eficiência (contra quais begomovírus a resistência foi avaliada)	Fontes de resistência
<b>Ty-6</b>	10 (Gill et al., 2019)	Ainda não caracterizada	<b>TYLCV &amp; ToMoV</b> (Gill et al., 2019)	<i>S. chilense</i>
<b>tcm-1</b>	6 (Machado, 2013)	Menor acumulação & replicação viral (Boiteux et al., 2012b)	<b>ToCMoV</b> (Giordano et al., 2005); <b>ToSRV; ToRMV; ToYVSV</b> (Machado, 2013); <b>ToYLCV</b> (Garcia-Cano et al., 2008)	'TX-468'
<b>tgr-1</b>	6 (Bian et al., 2007)	Ainda não caracterizada	<b>TYLCV</b> (Bian et al., 2007)	'FLA 653'

## 8.8. Seleção assistida para resistência à mancha-bacteriana

Um complexo de espécies e patovares dentro do gênero *Xanthomonas* está associado com a mancha-bacteriana no tomateiro. As diferentes espécies/patovares de *Xanthomonas* são classificadas em cinco raças (T1 até T5) de acordo a sua capacidade (ao não) de induzir reações de hipersensibilidade em diferentes genótipos de referência. A correspondência raça/espécie é a seguinte: *X. vesicatoria* (raça T2), *X. euvisicatoria* pv. *euvisicatoria* (raça T1), *X. euvisicatoria* pv. *perforans* (raças T3, T4 e T5) e *X. cynarae* pv. *gardneri* (também raça T2). Estas bactérias podem atacar todas as partes vegetativas da planta, reduzindo a produtividade pela destruição da folhagem e queda de flores e frutos em formação. Os danos diretos e indiretos provocados por esse grupo de patógenos também têm grandes efeitos na redução da qualidade do produto processado. Diferentes fatores de resistência e QTLs com efeitos importantes contra diferentes espécies/raças já foram descritos nesse patossistema. Alguns desses fatores apresentam marcadores moleculares ligados o que possibilita o monitoramento da região de interesse, facilitando o processo de “piramidização” (Yang & Francis, 2005). Três QTLs (*Rx-1*, *Rx-2* e *Rx-3*) controlam tolerância/hipersensibilidade (HS) a isolados de *X. euvisicatoria* pv. *euvisicatoria* raça T1 no acesso ‘Hawaii-7998’. Os QTLs *Rx-1* e *Rx-2* estão localizados no cromossomo 1 (Hutton, 2008). QTL *Rx-3* está em repulsão com o “cluster” *Pto/Fen/Prf* no cromossomo 5 (Yang & Francis, 2005). Um gene dominante e raça-T4 específico (denominado *Bs-4*) introgridido de *S. pennellii* ‘LA-716’ foi localizado no cromossomo 5. O gene *Bs-4* confere resistência a isolados de *X. perforans* raça T4 (Ballvora et al., 2001). Análise usando todos os marcadores polimórficos associados com o gene *Xv3* (que controla uma resposta hipersensível a isolados de *X. euvisicatoria* pv. *perforans* raça T3) indicaram que a resistência está localizada no cromossomo 11. Os testes de alelismo foram realizados em cruzamentos entre linhagens portadoras do gene *Xv3* (derivado da linhagem ‘Hawaii 7981’), do gene *Rx-4* (derivado do PI 128216) e da resistência derivada do acesso PI 126932. Esses testes indicaram que os loci que condicionam HR para *X. euvisicatoria* pv. *perforans* raça T3 estão ligados dentro de um intervalo de 0,1 cM ou são alélicos ou são o mesmo gene (Wang et al., 2011).



## 8.9. Seleção assistida para resistência à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*)

As linhagens ‘Hawaii 7997’ e ‘Hawaii 7996’ apresentam os melhores níveis de resistência e os mais amplos espectros de ação contra diferentes isolados de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* (Carmeille et al., 2006; Geethanjali et al., 2010). Quatro QTLs (denominados de *Bwr*) foram identificados no acesso ‘Hawaii 7996’ e numerados de acordo com a sua posição cromossômica. Essas regiões explicaram entre 3,2% e 29,8% da variação fenotípica da resistência. Um QTL de maior efeito está no cromossomo 6 (*Bwr-6*) e um de menor efeito está no cromossomo 3 (*Bwr-3*) (Carmeille et al., 2006; Geethanjali et al., 2010). Os QTLs *Bwr-4* e *Bwr-8* foram detectados apenas sob elevada temperatura (Carmeille et al., 2006).

## 8.10. Seleção assistida para resistência aos nematoides-das-galhas (gênero *Meloidogyne*)

O tomateiro é uma das mais importantes hospedeiras dos nematoides das galhas. *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* são as espécies de mais ampla distribuição geográfica em cultivos de tomateiro no mundo. No Brasil, levantamentos conduzidos indicaram a presença das seguintes espécies infectando o tomateiro: *M. javanica*, *M. incognita* (EST I1 e I2), *M. ethiopica*, *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *M. morocciensis*. A resistência genética se constitui na estratégia mais eficiente e de maior sustentabilidade para o controle dos nematoides das galhas no tomateiro. Atualmente a resistência disponível para o melhoramento genético do tomateiro é baseada em um gene dominante *Mi-1.2* que foi introgridido do acesso da espécie selvagem *S. peruvianum* PI 128657. Esse gene se localiza no braço curto do cromossomo 6 e tem sido amplamente empregado em cultivares e híbridos comerciais uma vez que confere resistência a distintas populações/raças de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e mais dez outras espécies de *Meloidogyne* (Gabriel et al., 2020). SAM para o gene *Mi-1.2* foi inicialmente conduzida com sucesso utilizando marcadores bioquímicos (isoenzimas) codificadas pelos diferentes alelos do gene da enzima fosfatase ácida 1 (**Figura 6**). Posteriormente, o gene *Mi-1.2* foi isolado via clonagem posicional (Rossi et al., 1998; Vos et al., 1998). Análises genômicas adicionais indicaram que o gene *Mi-1.2* faz parte de um “cluster” de sete cópias homólogas que estão presentes nos genomas de acessos suscetíveis e resistentes. Todos os membros do “cluster” do gene *Mi-1.2* são classificados na família de genes R contendo os elementos conservados CC–NB–LRR. No entanto, a função destes outros genes homólogos do “cluster” permanece ainda por ser elucidada. Marcadores moleculares codominantes com estreita ligação ao gene *Mi-1.2* foram desenvolvidos e estão sendo empregados em sistemas aplicados de seleção assistida e para checagem de pureza genética de híbridos (Bhavana et al., 2019). Uma análise de um desses marcadores codominantes está ilustrada na **Figura 16**. O gene *Mi-1.2* apresenta um interessante efeito pleiotrópico, controlando resistência também contra populações do afídeo *Macrosiphum euphorbiae* e da mosca-branca *Bemisia tabaci*. Como men-



cionado, outro aspecto positivo associado ao locus contendo o gene *Mi-1.2* é a presença de uma estreita ligação como os genes *Cf-2* e *Cf-5* (que controlam resistência contra algumas raças do fungo *Cladosporium*). Entretanto, o gene *Mi-1.2* não é efetivo em temperaturas acima de 28° C e também não tem efeito contra populações de *M. hapla* e *M. enterolobii*. Além disso, já existem registro de isolados virulentos de *M. incognita* e *M. javanica*. Outro problema em termos de melhoramento genético é o fato do gene *Mi-1.2* se encontrar em uma região genômica em forte repulsão com o gene dominante *Ty-1* e o gene recessivo *tcm-1* (que controlam resistência a diferentes espécies de *Begomovirus*), dificultando, desta forma, a obtenção de linhagens puras contendo esses fatores em homozigose. Mais recentemente, um novo gene de resistência denominado de *Mi-9* (introgredido da espécie selvagem *S. arcanum* ‘LA 2157’) foi clonado e caracterizado. O gene *Mi-9* é um homólogo do gene *Mi-1.2* e está também localizado no cromossomo 6. Um aspecto diferencial do *Mi-9* é o fato desse gene apresentar maior estabilidade térmica que o gene *Mi-1.2* (Jablonska et al., 2007).

## 9. Considerações finais

Como mostrado na **Figura 5** e exemplificado ao longo desse capítulo, os marcadores moleculares representam uma tecnologia crucial no melhoramento genético de nova geração e na biotecnologia do tomateiro. Embora o tomateiro tenha sido utilizado como exemplo, todos os aspectos positivos dos marcadores moleculares descritos aqui já estão sendo capitalizados pelos programas de melhoramento genético das principais hortaliças e de todas as importantes culturas alimentares, viabilizando sistemas de SAM e o “melhoramento acelerado” de novas cultivares e híbridos (Gosal & Wani, 2020).

## 10. Referências bibliográfica

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131–1139, 1992.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: Editora UFV. 1998. 574 p.
- ARENS, P. et al. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 655–664, 2010.
- BAGGS, E.; DAGDAS, G.; KRASILEVA, K.V. NLR diversity, helpers and integrated domains: Making sense of the NLR Identity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 59–67, 2017.
- BALLVORA, A.; SCHORNACK, S.; BAKER, B.J.; GANAL, M.; BONAS, U.; LAHAYE, T. Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 266, 639–645, 2001.

- BARILLAS, A.C.; MEJIA, L.; SANCHEZ-PEREZ, A.; MAXWELL, D.P. CAPS and SCAR markers for detection of *I-3* gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* race 3. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, v. 58, p.11–17, 2008.
- BARONE, A.; DI MATTEO, A.; CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. **Current Genomics**, v. 10, p. 1–9, 2009.
- BERED, F.; NETO, J.F.B.; CARVALHO, F.I.F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, 513–520, 1997.
- BHAVANA, P. et al. Identification of resistance in tomato against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and comparison of molecular markers for *Mi* gene. **Australasian Plant Pathology**, v. 48, p. 93–100, 2019.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIEIRA, J.V.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. Melhoramento para resistência a doenças virais. In: BORÉM A; FRITSCH-NETO, R. (eds). **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos**. Visconde de Rio Branco, MG: Editora Suprema, 2012b. p. 89-119.
- BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; GONZÁLEZ-ARCOS, M. Melhoramento de tomate para processamento industrial. In: NICK, C.; BORÉM, A. (eds). **Melhoramento de Hortaliças**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2016. p. 432–464.
- BOMBARELY, A. et al. The Sol genomics network (solgenomics.net): Growing tomatoes using Perl. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D1149–D1155, 2010.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314–331, 1980.
- BROMMONSCHENKEL, S.H.; FRARY, A.; TANKSLEY, S.D. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p. 1130–1138, 2000.
- BUTTERBACH, P. et al.. *Tomato yellow leaf curl virus* resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, p. 12942–12947, 2014.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOFF, P.M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, v. 9, p. 553–556, 1991.
- 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.
- CARRER FILHO, R. et al. Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 925–932, 2016.
- CATANZARITI, A.M.; LIM, G.T.; JONES, D.A. The tomato  $\bar{I}3$  gene: A novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. **New Phytologist**, v. 207, p. 106–118, 2015.
- CHEN, A.L. et al. Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. **PloS One**, v. 9, p. e96417, 2014.
- COLLARD, B.C.Y.; JAHUFER, M.Z.Z.; BROUWER, J.B.; PANG, E.C.K. An introduction to markers, quantitative loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica**, v.142, p.169–196, 2005.
- DE CASTRO, A.P.; BLANCA, J.M.; DÍEZ, M.J.; VINÁLS, F.N. Identification of a CAPS marker tightly linked to the *Tomato yellow leaf curl* disease resistance gene *Ty-1* in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 347–356, 2007.

- DIANESE, E.C. et al. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. **Molecular Breeding**, v. 25, p. 133–142, 2010.
- DIANESE, E. C.; FONSECA, M.E.N.; INOUE-NAGATA, A. K.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L.S. Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species. **Euphytica**, v. 180, p. 307–319, 2011.
- DIWAN, N.; FLUHR, R.; ESHED, Y.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. Mapping of *Ve* in tomato: A gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p. 315–319, 1999.
- DIXON, M.S.; JONES, D.A.; KEDDIE, J.S.; THOMAS, C.M.; HARRISON, K. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. **Cell**, v. 84, p. 451–459, 1996.
- EL MOHTAR, C.A.; ATAMIAN, H.S.; DAGHER, R.B.; ABOU-JAWDAH, Y.; SALUS, M.S.; MAXWELL, D.P. Marker-assisted selection of tomato genotypes with the *I-2* gene for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2. **Plant Disease**, v.91, p.758–762, 2007.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 112–117, 2002.
- ELSHIRE, R.J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PloS One**, v. 6, p. e19379, 2011.
- ESHED, Y.; ZAMIR, D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. **Genetics**, v. 141, p.1147–1162, 1995.
- FAZIO, G; STEVENS, M.R.; SCOTT, J.W. Identification of RAPD markers linked to *Fusarium* crown and root rot resistance (*Fr1*) in tomato. **Euphytica**, v.105, p. 205–210, 1999.
- FEHR, W.F. **Principles of cultivar development: Theory and technique**. Macmillan, New York. 1987
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- FERRO, D. D. X. **Estudos com o locus *Ty-1* do tomateiro e busca por novos marcadores moleculares para tolerância ao *Tomato severe rugose virus***. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (UnB), 2013.
- FOOLAD, M.R.; PANTHEE, D.R. Marker-assisted selection in tomato breeding. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, p. 93–123, 2012.
- FRADIN, E.F. et al. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. **Plant Physiology**, v. 150, p. 320–332, 2009.
- GABRIEL, M.; KULCZYNSKI, S.M.; MUNIZ, M.F.; BOITEUX, L.S.; CARNEIRO, R.M. Reaction of a heterozygous tomato hybrid bearing the *Mi1.2* gene to 15 *Meloidogyne* species. **Plant Pathology**, v. 69, p. 944–952, 2020.
- GEETHANJALI, S.; CHEN, K.Y.; PASTRANA, D.V.; WANG, J.F. Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. **Euphytica**, v. 173, p. 85–97, 2010
- GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA, F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. **Euphytica**, v. 143, p. 27–33, 2005.

- GONZÁLEZ-ARCOS, M. et al. A loss-of-function allele of a TAC1-like gene (SITAC1) located on tomato chromosome 10 is a candidate for the *Erectoid leaf* (*Erl*) mutation. **Euphytica**, v. 215, p. 95, 2019.
- GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A.M.; BAKER, B.; McGRATH, D.J.; JONES, D.A. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to Fusarium wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, p. 448–463, 2016.
- GOSAL, S.S.; WANI, S.H. Accelerated Plant Breeding. v. 2 (Vegetable Crops). Switzerland: Springer Nature Cham, 2020. 457 p.
- GUPTA, P. et al. Reanalysis of genome sequences of tomato accessions and its wild relatives: Development of tomato genomic variation (TGV) database integrating SNPs and INDELS polymorphisms. **bioRxiv** (no prelo), 2020.
- HAMILTON, J.P. et al. Single nucleotide polymorphism discovery in cultivated tomato via sequencing by synthesis. **The Plant Genome**, v. 5, p. 17–29, 2012.
- HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 761–769, 1986.
- HUTTON, S.F. **Inheritance and mapping of resistance to bacterial spot race T4 (*Xanthomonas perforans*) in tomato, and its relationship to race T3 hypersensitivity, and inheritance of race T3 hypersensitivity from PI 126932**. Ph.D. Thesis, University of Florida, 2008.
- 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.
- JABLONSKA, B. ET AL. The *Mi-9* gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of *Mi-1*. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1044–1054, 2007.
- JI, Y.; SCHUSTER, D.J.; SCOTT, J.W. *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. **Molecular Breeding**, v. 20, p. 271–284, 2007.
- JI Y, SCOTT J, SCHUSTER D. Molecular mapping of *Ty-4*, a new Tomato yellow leaf curl virus resistance locus on chromosome 3 of tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 134, p. 281–288, 2009.
- JONES, D.A.; THOMAS, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; JONES, J.D.G. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, v. 266, p. 789–793, 1994.
- JONES, N.; OUGHAM, H.; THOMAS, H.. Markers and mapping: We are all geneticists now. **New Phytologist**, v. 137, p.165–177, 1997.
- KAUSHAL, A. et al. **A Rapid Disease Resistance Breeding in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)**. In: GOSAL, S.S.; WANI, S.H. (eds) Accelerated Plant Breeding. v. 2 (Vegetable Crops). Switzerland: Springer Nature Cham, , 2020. p. 17-55.
- KAWCHUK, L.M. et al. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 98, p. 6511–6515, 2001.
- KELLY, J.D.; MIKLAS, P.N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 1–11, 1998.
- KIM, C. et al. Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. **Plant Science**, v. 242, p. 14–22, 2016.



- LANDER, E.S. et al. Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174–181, 1987.
- LAPIDOT, M. et al.. A novel route controlling begomovirus resistance by the messenger RNA surveillance factor pelota. **PLoS Genetics**, v. 11, p. e1005538, 2015.
- LI, J ET AL. Identification and mapping of quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in *Solanum habrochaites* LA1777. **Euphytica**, v. 179, p. 427–438, 2011.
- LIM, G.T.T. et al. Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p.671–680, 2006.
- LIM, G.T.T.; WANG, G.-P.; HEMMING, M.N.; MCGRATH, D.J.; JONES, D.A. High resolution genetic and physical mapping of the *I-3* region of tomato chromosome 7 reveals almost continuous microsynteny with grape chromosome 12 but interspersed microsynteny with duplications on *Arabidopsis* chromosomes 1, 2 and 3. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 57–75, 2008.
- LIN, T et al. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics**, v. 46, p. 1220–1228, 2014.
- LINNARSSON, S. Recent advances in DNA sequencing methods—general principles of sample preparation. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 1339–1343, 2010.
- LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 56–60, 2012.
- MACHADO, M.R. **Eficiência de novas fontes de resistência em tomateiro contra diferentes espécies de Begomovirus bipartidos e localização cromossômica do locus *tem-1***. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (UnB), 2013.
- MANLY, K.F.; CUDMORE, J.R.; R.H.; MEER, J.M. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. **Mammalian Genome**, v. 12, p. 930–932, 2001.
- MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: Issue, ontogenetic and species-specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 45, p. 753–763, 1959.
- 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.
- MEDINA, R., LÓPEZ, S. M., FRANCO, M. E., ROLLAN, C., RONCO, B. L., SAPARRAT, M. C., BALATTI, P. A. A survey on occurrence of *Cladosporium fulvum* identifies race 0 and race 2 in tomato-growing areas of Argentina. **Plant Disease**, v. 99, p. 1732–1737, 2015.
- MEDINA-FILHO, H. P. **An electrophoretic variant as a tool for breeding tomatoes for nematode resistance**. Ph.D. Thesis. University of California, 1980.
- MENDA, N.; STRICKLER, S.R.; MUELLER, L.A. Advances in tomato research in the post-genome era. **Plant Biotechnology**, v. 30, p. 243–256, 2013.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 88, p. 9828–9832, 1991.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, p. 14–17, 1998.
- MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, v.3, p. 87–103, 1997.



- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.
- NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F.F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33 p. 10–13, 2004.
- OLIVEIRA, A.S.; BOITEUX, L.S.; KORMELINK, R.; RESENDE, R.O. The *Sw-5* gene cluster: Tomato breeding and research toward orthotospovirus disease control. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1055, 2018.
- ORSI, I.; MALATRASI, M.; BELFANTI, E.; GULLÌ, M.; MARMIROLI, N. Determining resistance to *Pseudomonas syringae* in tomato, a comparison of different molecular markers. **Molecular Breeding**, v. 30, p. 967–974, 2012.
- PANTHEE, D.R.; CHEN F. Genomics of fungal disease resistance in tomato. **Current Genomics**, v. 11, p. 30–39, 2010.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 985–993, 1993.
- PARMAR, P.; SUBRAMANIAN, R.B. PCR based method for testing *Fusarium* wilt resistance of tomato. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p. 219–222, 2011.
- PATERSON, A.H. Making genetic maps. In: A.H. Paterson (ed.), **Genome Mapping in Plants**, p. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, 1996. Austin, Texas.
- REBRIKOV, D.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: A review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 455–463, 2006.
- RICK, C.M.; FOBES, J. Association of an allozyme with nematode resistance. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, v. 24, p. 25, 1974.
- RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: Highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 281–300, 1988.
- ROSSI, M. et al. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 9750–9754, 1998.
- ROTHAN, C.; DIOUF, D.; CAUSSE, M. Trait discovery and editing in tomato. **The Plant Journal**, v. 97, p. 73–90, 2019.
- SALIBA-COLOMBANI, V.; CAUSSE, M.; GERVAIS, L.; PHILOUZE, J. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. **Genome**, v. 43, p. 29–40, 2000.
- SALMERON, J.M et al. Tomato *Prf* is member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, v. 86, p. 123–133, 1996.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 5463–5467, 1977.
- SAYED, H.; KAYYAL, H.; RAMSEY, L.; CECCARELLI, S.; BAUM, M. Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat markers. **Euphytica**, v. 225, p. 265–272, 2002.
- SEMAGN, K.; BABU, R.; HEARNE, S.; OLSEN, M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. **Molecular Breeding**, v. 33, p. 1–14, 2014.
- SHENDURE, J; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1135–1145, 2008.

- SHIRASAWA, K; HIRAKAWA, H. DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato. **Breeding Science**, v. 63, p. 21–30, 2013.
- SIM, S.C. et al. Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. **PLoS One**, v. 7, p. e40563, 2012.
- SIMONS, G. ET AL.. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene. **Plant Cell**, v. 10, p. 1055–1068, 1998.
- SOLLER, M.; BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 67, p. 25–33, 1983.
- SPASSOVA, M.I. et al.. The tomato gene *Sw-5* 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.
- SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, v. 54, p. 43–61, 2005.
- STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **The Plant Journal**, v. 3, p. 739–744, 1993.
- SUN, X.; LIU, D.; ZHANG, X.; LI, W.; LIU, H.; HONG, W.; ZHENG, H. SLAF-seq: An efficient method of large-scale *de novo* SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. **PLoS One**, v. 8, p. e58700, 2013.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205–233, 1993
- TANKSLEY, S.D.; FULTON, T.M. Dissecting quantitative trait variation – examples from the tomato. **Euphytica**, v. 154, p. 365–370, 2007
- TANKSLEY, S.D. et al. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes **Genetics**, v. 132, p. 1141–1160, 1992
- THOMAS, C.M. et al. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. **The Plant Cell**, v. 9, p. 2209–2224, 1997.
- TOMATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, p. 635–641, 2012.
- TOMATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. **The Plant Journal**, v. 80, p. 136–148, 2014.
- TOMITA, R. et al. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 24, p. 108–117, 2011.
- VERLAAN, M.G. et al. Chromosomal rearrangements between tomato and *Solanum chilense* hamper mapping and breeding of the TYLCV resistance gene *Ty-1*. **The Plant Journal**, v. 68, p. 1093–1103, 2011.
- VERLAAN, M.G. et al. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. **PLoS Genetics**, v. 9, e1003399, 2013.
- VOS, P. et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.
- VOS, P. et al. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 1365–1369, 1998.

- 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, Y. et al. Application of whole genome resequencing in mapping of a Tomato yellow leaf curl virus resistance gene. **Scientific Reports**, v. 8, p. 9592, 2018.
- WATSON, J.D.; CRICK, F.H. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7213–7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531–6535, 1990.
- WILLIAMSON, V.M.; COLWELL, G. Acid phosphatase-1 from nematode resistant tomato: Isolation and characterization of its gene. **Plant Physiology**, v. 97, p. 139-146, 1991.
- WIN, K.T; VEGAS, J.; ZHANG, C.; SONG, K.; LEE, S. QTL mapping for downy mildew resistance in cucumber via bulked segregant analysis using next-generation sequencing and conventional methods. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, p. 199–211, 2017.
- XU, Y.; ZHU, L.; XIAO, J.; HUANG, N.; MCCOUCH, S.R. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F<sub>2</sub>, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular and General Genetics**, v. 253, p. 535–545, 1997.
- YAMAGUCHI, H. et al. An NB-LRR gene, TYNBS1, is responsible for resistance mediated by the *Ty-2* begomovirus resistance locus of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v.131, p. 1345–1362, 2018.
- YANG, W.; FRANCIS, D.M. Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, v. 130, p. 716–721, 2005.
- YANG, X. et al. Fine mapping of the tomato yellow leaf curl virus resistance gene *Ty-2* on chromosome 11 of tomato. **Molecular Breeding**, v. 34, p. 749–760, 2014.
- YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 479–501, 1996
- YOUNG, N.D.; TANKSLEY, S.D. Restriction fragment length polymorphisms maps and the concept of graphical genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, p. 95–101, 1989.
- ZAMIR, D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 983–989, 2001.
- WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57, 2009.
- ZHANG, C. et al. The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, p. 1353–1364, 2014
- ZHAO, T et al. Mapping and candidate gene screening of tomato *Cladosporium fulvum*-resistant gene *Cf-19*, based on high-throughput sequencing technology. **BMC Plant Biology**, v.16, p. 51, 2016.

Fabrizio Ávila Rodrigues

## 1. Introdução

A resistência das plantas à infecção por patógenos de diferentes estilos de vida (ex. biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos) é regra enquanto que a suscetibilidade é exceção (Debona & Rodrigues, 2018). Isso se deve a ocorrência de vários mecanismos de defesa (ex. anatomia dos estômatos, espessura da cutícula, formação de papilas, lignificação e suberização de tecidos, presença de tricomas e produção de compostos antimicrobianos) que afetam o processo infeccioso dos patógenos e, conseqüentemente, os componentes de resistência (ex. aumento do período de incubação e do período latente, lesões menores, redução na taxa de expansão das lesões e menor produção de esporos em cada sítio de infecção) (Debona & Rodrigues, 2018). Entretanto, se os mecanismos de defesa pós-formados, às custas de um metabolismo secundário mais atuante, são ativados tardiamente e mesmo assim não são efetivos em conter a colonização dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, esses poderiam ser induzidos, antes da sua chegada, utilizando-se os indutores de resistência.

Aspectos relacionados com a indução de resistência em plantas a patógenos datam das primeiras décadas do século XX (Hammerschmidt, 2007). Todavia, a sistemicidade dessa indução não era mencionada ou estudada a nível bioquímico e molecular. O pesquisador Bernard trabalhou com orquídeas e fungos de solo e constatou que seções de bulbos sadios transferidas para meio de cultura onde esses fungos estavam sendo cultivados não eram infectadas, mas que a infecção ocorria caso os bulbos fossem previamente mantidos a 55°C por 35 minutos (Hammerschmidt, 2007). Na época, Bernard hipotetizou que os segmentos de bulbos não submetidos ao tratamento térmico não eram infectados porque seus tecidos respondiam às secreções produzidas pelos fungos com a síntese de substâncias antimicrobianas. Essa talvez seja a primeira vez em que se aventou a possibilidade de plantas possuírem mecanismos de defesa que podiam ser ativados por um fator exógeno. Müller & Börger (1940) inocularam seções de tubérculos de batata com uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* e observaram ausência de sintomas causados por esse patógeno. Após certo tempo, reinocularam essas mesmas seções com uma raça virulenta do mesmo patógeno observando que a raça avirulenta aparentemente protegia os tecidos contra infecção pela raça virulenta. Influenciados pelos avanços da ciência da época, quando imunologia e vacinas estavam sendo mais bem entendidas e em voga, os autores chegaram a postular a possibilidade de haverem conseguido ativar um mecanismo de natureza semelhante (Müller & Börger, 1940).

Outras publicações pioneiras mencionam a indução de resistência sempre a nível local sem, contudo, mencionar a natureza sistêmica desse fenômeno (Hammerschmidt, 2007). Averre & Kelman (1964) foram capazes de induzir resistência localizada em



tecidos de fumo pela co-inoculação de isolados virulentos e avirulentos de *Ralstonia solanacearum*. De acordo com Klement et al. (1966), a infiltração de células da bactéria saprófita *Pseudomonas fluorescens*, tanto vivas como mortas pelo calor, em folhas de fumo, induziu resistência ao TMV, inibindo a multiplicação do vírus e a formação de lesões. Tecidos de fumo foram protegidos contra isolados virulentos de *R. solanacearum* após inoculação de células, mortas pelo calor, dessa mesma bactéria (Sequeira & Hill, 1974). Lovrekovich & Farkas (1965) conseguiram induzir resistência localizada, ainda que eficiente, em folhas de fumo contra *Peronospora tabacina*, previamente infiltradas com células do próprio patógeno mortas pelo calor. A exposição de tecido de vagens de feijoeiro às hifas do patógeno incompatível *Sclerotinia fructicola* induziu a síntese de fitoalexinas (Müller, 1958).

A importância da indução de resistência em plantas a patógenos, sua amplitude de efetividade e sua potencialidade futura foi documentada por Chester (1933) e Gaümann (1954). Esses pesquisadores, embora trabalhando com patossistemas diferentes, demonstraram que plantas inoculadas com microrganismos atenuados tornavam-se protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros semelhantes. Nessa época a Fitopatologia enquanto ciência passou a ter a percepção de que a resistência induzida poderia ter caráter de multiplicidade de proteção. Cruickshank & Mandryk (1960) injetaram esporângios de *Peronospora tabacina* em hastes de fumo e observaram indução de resistência nas folhas contra o mesmo patógeno. Ross (1961, 1966) demonstrou que a infecção localizada pelo TMV induziu a resistência de plantas de fumo à uma ampla gama de patógenos, além de ser expressa sistemicamente. A descoberta e elucidação dessas duas características fundamentais da resistência induzida – amplitude de efetividade e caráter sistêmico – foi o marco inicial de uma das mais importantes linhas de pesquisa em Fitopatologia por suas óbvias implicações e incomensurável potencialidade no controle de doenças de plantas.

A indução de resistência consiste em aumentar o nível de resistência basal da planta em resposta à infecção pelo patógeno utilizando-se a aplicação exógena de um indutor (Hammerschmidt, 1999; Hutcheson, 1998). A indução de resistência pode ocorrer na forma de resistência sistêmica adquirida (RSA) ou resistência sistêmica induzida (RSI) (Bostock, 2005; Métraux et al., 2002). Tratam-se de dois fenômenos distintos tanto pela forma como são induzidos (se por agente abiótico (ácido salicílico) ou biótico (bactérias promotoras do crescimento de plantas) ou pelas rotas bioquímicas ativadas, embora apresentem natureza sistêmica (Bostock, 2005; Métraux et al., 2002). A natureza local ou sistêmica; a velocidade com que a planta reconhece a presença do indutor que determinará o tempo de resposta à invasão pelo patógeno desencadeando uma ou mais respostas de defesa; a ativação de mecanismos latentes de resistência da planta; a dependência do intervalo de tempo entre a aplicação do indutor e a deposição do inóculo do patógeno na planta e quando as plantas são expostas ao indutor abiótico ou biótico tornando-se protegidas contra os patógenos são as principais características da resistência induzida (Bostock, 2005; Hammerschmidt, 1999; Métraux et al., 2002). A ativação de mecanismos de defesa pode ser alcançada por rotas que atuam isoladas ou interconectadas. Entretanto, a velocidade com que a planta reconhece a presença do indutor é que desencadeará uma ou mais respostas de defesa e a percepção ocorre quando moléculas indutoras de defesa na planta se ligam às moléculas receptoras que



se encontram na membrana plasmática das células (Métraux et al., 2002). É interessante notar que vírus, bactérias, fungos, nematóides, células vivas e intactas ou seus extratos e frações, além de produtos químicos dos mais variados grupos, podem atuar como indutores de mecanismos de defesa nas plantas (Bostock, 2005; Hammerschmidt, 1999). A indução de resistência em plantas a patógenos vem sendo alvo de atenção de inúmeros pesquisadores mundialmente devido o potencial que esse fenômeno apresenta dentro do contexto de uma agricultura sustentável que almeja ser cada vez menos dependente da utilização de agrotóxicos.

Neste capítulo, será discutido o fenômeno da resistência induzida reconhecendo a sua importância para o manejo integrado das doenças de plantas.

## 2. A indução de resistência

A indução de resistência consiste em aumentar o nível de resistência basal da planta em resposta à infecção por um patógeno mediante aplicação exógena de um indutor (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015; Hammerschmidt, 1999). Define-se como indutor qualquer composto ou substância capaz de ativar mecanismos de defesa na planta e o elicitor nada mais é do que a molécula, em específico, que compõe o indutor (Lyon, 2007). Após expostos a um indutor de resistência, os tecidos das plantas reagem mais rapidamente e com mais eficiência em resposta à infecção pelo patógeno (Conrath et al., 2015). Assim, podemos dizer que a planta atingiu o estado de indução. Então, o contato entre a molécula elicitora com receptores inespecíficos presentes tanto na parede celular ou na membrana plasmática da planta desencadeia a sinalização para ativação de genes relacionados com a defesa da planta (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015).

Quando as plantas após serem expostas a agentes abióticos ou bióticos com potencial de induzir resistência apresentam redução na intensidade de uma determinada doença não se pode inferir que ocorreu indução de resistência (Lyon, 2007). Pode ser que o indutor ou a molécula elicitora esteja atuando diretamente sobre o patógeno. O suposto aumento na resistência pode também ser devido a fatores como escape, inoculações mal conduzidas, perda de patogenicidade da cultura do patógeno, influência do meio ambiente e até mesmo a utilização de produtos comerciais alterados quimicamente. Uma outra observação importante é que a indução de resistência não pode ser atribuída exclusivamente a um determinado mecanismo de defesa da planta como, por exemplo, o aumento da atividade da enzima fenilalanina-amônia-liase (FAL) importante para a síntese de compostos fenólicos (Bostock, 2005).

As principais características da indução de resistência podem ser assim definidas: caráter local ou sistêmico; a velocidade com que a planta reconhece a presença do agente eliciador determinará o tempo de resposta à invasão pelo patógeno, desencadeando uma ou mais respostas de defesa; a resistência induzida envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência da planta; é dependente do intervalo de tempo que ocorre entre o tratamento com o indutor e a subsequente chegada do patógeno na planta; quando as plantas são expostas aos indutores abióticos ou bióticos e ficam

protegidas contra patógenos, isso não implica que a indução tenha ocorrido (Hammerschmidt, 1999). O agente de controle tanto pode estar induzindo resistência ou atuando diretamente sobre o patógeno ou ambos ao mesmo tempo; a ativação de mecanismos de defesa pode ser alcançada por vias que atuam isoladas ou conectadas; a velocidade com que a planta reconhece a presença do indutor ou eliciador é que desencadeará uma ou mais respostas de defesa e a percepção se dá quando moléculas indutoras de defesa nas plantas se ligam a moléculas receptoras situadas, provavelmente, na membrana plasmática da célula vegetal (Hammerschmidt, 1999).

A RSA e a RSI são fenômenos distintos quanto à forma pela qual são induzidos e pelos mecanismos bioquímicos envolvidos, mas similares pelo caráter sistêmico (Métraux et al., 2002). O termo RSA foi descrito inicialmente em 1966 ao se referir à resistência induzida em folhas do dossel superior de plantas de fumo em resposta a inoculação de folhas do dossel inferior com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (Ross, 1966). Ross (1966) observou a ocorrência do que conhecemos como reação de hipersensibilidade em locais distantes da infecção pelo vírus. Em outras palavras, houve um aumento na capacidade da planta em expressar o seu nível basal de resistência à outros patógenos supostamente condicionada pelo sinal sistêmico levado aos tecidos saudáveis.

O uso de alguns indutores da RSA como o ácido salicílico (AS), o INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) e o Acibenzolar-S-Metil (ASM) potencializam a produção de peróxido de hidrogênio, a expressão do gene *FAL* e a produção de algumas proteínas relacionadas com a patogênese (PRP) (Lyon, 2007). Plantas transgênicas expressando o gene *NahG* produzem reduzido nível de AS uma vez que o AS é convertido a catecol pela enzima salicilato hidroxilase (Conrath et al., 2015). O óxido nítrico (ON) induz o acúmulo de AS (Conrath et al., 2015). A indução de PRP pelo ON é mediada pelo AS e a concentração do ON é totalmente dependente do AS. É sabido ocorrer o acúmulo de AS no sítio de infecção bem como em locais distantes da colonização pelo patógeno, o qual é originado do ácido benzóico ou do isochorismato (Conrath et al., 2015). Acredita-se que a percepção do etileno (ET) pela planta é necessária para que ocorra a geração, liberação e transporte da molécula sinalizadora da RSA para tecidos distantes do local de infecção (Conrath et al., 2015). Contudo, a verdadeira natureza da molécula sinalizadora da RSA ainda permanece desconhecida.

Para que um produto químico possa ser considerado como indutor de RSA, o mesmo deve atender a três critérios básicos: nem o composto nem os metabólitos dele derivados podem exibir atividade antimicrobiana “*in vitro*” ou “*in vivo*”; o composto deve modificar a natureza da interação planta-patógeno de tal forma que, fenotipicamente, ocorra uma interação incompatível associada à ativação de mecanismos de defesa e o composto deve ser capaz de proteger as plantas contra um ou mais patógenos, dependendo da magnitude dos mecanismos de defesa decorrentes da interação (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015).

O ASM, comercializado no Brasil com o nome de BION, é um exemplo de indutor de resistência que tem se mostrado eficiente no controle de inúmeras doenças de etiologia fúngica, bacteriana e virótica (Lyon, 2007). O ASM não tem apresentado atividade de inibição “*in vitro*” sobre patógenos tais como *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), *Corynespora cassicola* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,

*Pseudocercospora griseola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Uromyces appendiculatus* (Lyon, 2007). Todavia, o ASM pode afetar o crescimento de alguns patógenos “*in vitro*” desclassificando-o como um indutor de resistência (Lyon, 2007). Aparentemente, o ASM tem ação sistêmica, rápida translocação e persistência variável nos tecidos da planta. O ASM apresenta toxidez às plantas em função da espécie e da concentração utilizada (Lyon, 2007).

Certas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (“*plant growth-promoting rhizobacteria*” - PGPR) parecem desencadear a RSI no sentido em que a planta fica sistemicamente protegida contra mais de um patógeno ao contrário do controle biológico que resulta no controle de forma mais específica (Kloepper et al., 1997; Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2003; Walters & Daniell, 2007). Alguns isolados de *Pseudomonas* spp. são capazes de reduzir a severidade de algumas doenças fúngicas, bacterianas e viróticas em feijão, cravo, pepino, rabanete, fumo, tomate e *Arabidopsis* através da RSI (Kloepper et al., 1997; Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2003; Walters & Daniell, 2007). Os elicitores da RSI são usualmente os componentes da parede celular da bactéria (lipo-polissacarídeos e flagelos), além de metabólitos como sideróforos e antibióticos (Kloepper et al., 1997; Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2003; Walters & Daniell, 2007). Os sinais, provavelmente jasmonatos ou ET, produzidos por esses elicitores translocam-se até sítios distantes do local de síntese e alguns genes relacionados com a defesa da planta são expressos sistemicamente (Kloepper et al., 1997; Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2003; Walters & Daniell, 2007). A literatura registra que algumas bactérias isoladas da rizosfera e rizopiano de plantas saudáveis de tomateiro, quando utilizadas na microbiolização de sementes saudáveis por meio da embebição, foram capazes de induzir resistência à *Pst* em plantas originadas dessas sementes. Sabe-se, há décadas, que certas bactérias benéficas, quando em contato com as plantas, sejam através da microbiolização de sementes ou outros métodos, são capazes de promover o controle de doenças tanto por antagonismo direto como por indução de resistência (Kloepper et al., 1997; Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2003; Walters & Daniell, 2007).

Alguns critérios devem ser observados para confirmar se a resistência exibida pela planta foi realmente induzida ou foi devido a outros fatores que, de alguma forma, contribuíram para reduzir a intensidade da doença (Lyon, 2007; Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). O indutor não pode ter efeito tóxico sobre o patógeno. Caso o agente indutor tenha efeito deletério sobre o patógeno e não há separação espacial entre eles, fica difícil falar em indução de resistência utilizando apenas esse critério. Em contraposição, não se havendo detectado atividade ou efeito tóxico do indutor de “*per si*” ou de substâncias por ele produzidas contra o patógeno, pode ter ocorrido indução de resistência. Em certos casos, é natural a compartimentalização ou separação espacial entre o local em que se aplica o indutor e o sítio de infecção do patógeno como nas situações em que o agente de indução é uma rizobactéria aplicada no sistema radicular e o patógeno é inoculado nas folhas. Por outro lado, se tanto a rizobactéria como o patógeno estão na rizosfera, fica impossível a compartimentalização a não ser pelo uso de procedimentos específicos tais como a separação espacial das raízes. Ainda assim, o agente indutor pode ter efeito deletério sobre o patógeno e haver separação espacial entre eles. Porém, não se pode descartar a hipótese de um indutor abiótico ser absorvido pela planta e nela se deslocar até onde está o patógeno ou substâncias

antimicrobianas produzidas pelo indutor biótico poderem fazer o mesmo. Adicionalmente, não se pode deixar de lado a possibilidade do indutor atuar de outras formas. Se for um indutor abiótico, mesmo não atuando diretamente sobre o patógeno, ele pode atuar sobre a flora microbiana presente no local de inoculação ou ser absorvido e se translocar na planta até o sítio de infecção do patógeno favorecendo a predominância daqueles microrganismos que são naturalmente antagônicos ao patógeno. Se for um indutor biótico (uma rizobactéria, por exemplo), outros mecanismos de antagonismo podem atuar e não a produção de substâncias antimicrobianas. Por esta e por muitas outras razões, não se deve utilizar apenas um critério para verificar a ocorrência da indução de resistência. A resistência induzida é suprimida pela exposição prévia da planta às substâncias que inibem a expressão dos seus genes de defesa a exemplo da actinomicina D que afeta vários processos fisiológicos na planta, além de ter ação sobre muitos microrganismos. Deve existir um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência. Esse estado de indução pode demorar de alguns dias a uma semana para ocorrer. Por exemplo, a indução de resistência à murcha-de-Fusário em rabanete pelo uso de *P. fluorescens* demorou pelo menos um dia. A expressão da resistência induzida em berinjela pela exposição ao ASM, um indutor abiótico, a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, demorou 3 dias. Assim, se a redução na intensidade da doença for imediata, outros mecanismos e, ou, fatores podem ser os responsáveis pelo fenômeno. Não deve existir uma relação entre a magnitude da resistência expressa e as quantidades crescentes do indutor aplicado à semelhança do que se observa para os agrotóxicos. Caso o indutor seja biótico, há necessidade de uma quantidade mínima de células em contato com a planta para ocorrência da indução de resistência. Porém, aumentos da quantidade de células do indutor não correspondem a um aumento na resistência no hospedeiro. Deverá existir inespecificidade da proteção. A planta estaria protegida contra a infecção por patógenos de diferentes estilos de vida. A resistência sistêmica induzida em rabanete por *P. fluorescens* mostrou-se efetiva contra a murcha-de-Fusário e ao ataque da bactéria *Pst*. A resistência deve ser expressa local e sistemicamente. A resistência induzida não tem que ser necessariamente sistêmica. Porém, em muitos casos, o caráter sistêmico é o que persiste. Tanto no caso da RSA quanto da RSI, um sinal é gerado no sítio de contato entre o elicitor e o órgão vegetal, sinal esse que se move para outros órgãos, desencadeando eventos que culminam com a ativação de genes de resistência da planta. Um dos grandes problemas é acontecer do presumido indutor biótico atuar por antibiose direta conduzindo à errônea conclusão que houve indução. A resistência induzida pode ser dependente do genótipo da planta. As rizobactérias *P. putida* e *Serratia marcescens* foram testadas como potenciais agentes de indução de resistência em quatro cultivares de pepino (três suscetíveis e um resistente) e, nesse caso, apenas *P. putida* induziu resistência nas três cultivares suscetíveis enquanto que *S. marcescens* em apenas duas cultivares suscetíveis. As duas rizobactérias não induziram resistência na cultivar resistente. Como todas colonizaram com eficiência o sistema radicular das cultivares testadas, a redução na colonização não explicou os resultados obtidos.



### 3. Hormônios envolvidos na indução de resistência

Alguns hormônios das plantas estão envolvidos na ocorrência da indução de resistência. O AS, cujo precursor é o ácido benzóico na rota dos fenilpropanóides, está possivelmente envolvido na RSA (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). Plantas de fumo expressando o gene *NahG*, obtido da bactéria *Pseudomonas putida*, o qual codifica para a enzima salicilato hidroxilase que converte o AS para catecol, deixaram de exibir RSA (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). Mutantes recessivos de *Arabidopsis* com alteração na rota do AS apresentaram aumento na suscetibilidade a patógenos (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). Os mutantes *sid1*, *sid2* e *pad4* deficientes na produção do AS foram mais suscetíveis à *Pst* DC3000 e *Hyaloperonospora parasitica* (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). Plantas transgênicas de fumo com níveis reduzidos de AS, obtidas através do silenciamento do gene *FAL*, apresentaram alteração na manifestação da RSA contra o TMV, mas maior resistência contra a herbivoria das larvas de *Heliothis virescens* (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). Plantas transgênicas de fumo super-expressando o gene *FAL* apresentaram RSA contra o TMV e maior suscetibilidade a insetos (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015).

O ácido jasmônico (AJ) tem papel importante na RSI contra patógenos biotróficos e necrotróficos (Bostock, 2005; Conrath et al., 2015). O mutante *jar1* com sensibilidade reduzida ao metil jasmonato (MeJA) apresentou maior suscetibilidade à *Fusarium oxysporum* (Métraux et al., 2002). O mutante triplo *fad3fad7fad8* deficiente na biosíntese do AJ foi mais suscetível à *Pythium*, o qual não é um patógeno de *Arabidopsis* (Métraux et al., 2002). O mutante *coi1* (insensível ao AJ) é altamente suscetível à *Erwinia carotovora*, *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea* (Métraux et al., 2002). A super-expressão do gene que codifica para a enzima carboxil-metil-transferase aumentou o nível de metil-jasmonato nos tecidos da planta e, conseqüentemente, a resistência à *B. cinerea* (Métraux et al., 2002). O mutante *cev1* possui ativação constitutiva da rota do AJ e maior resistência contra *P. syringae*, *Erysiphe cichoracearum*, *E. oronhi* e *Oidium lycopersicum* (Métraux et al., 2002).

O papel do ET na resistência basal das plantas à patógenos é controverso, pois existem casos de resistência e também de aumento em suscetibilidade (Métraux et al., 2002). Mutantes de *Arabidopsis* insensíveis ao ET apresentam maior suscetibilidade à *B. cinerea*, *Pst* DC3000 e *E. carotovora* retratando a importância desse hormônio na resistência basal contra esses patógenos (Métraux et al., 2002). Mutantes de soja insensíveis ao ET foram suscetíveis à *Septoria glycines* e *Rhizoctonia solani* (Métraux et al., 2002). Plantas de fumo transformadas com o gene *etr1-1* de *Arabidopsis* (receptor do ET) foram mais suscetíveis à *Pythium sylvaticum*, antes não patogênico ao fumo (Métraux et al., 2002). Isso demonstra que o ET também tem efeito na resistência de plantas não hospedeiras à patógenos. Acredita-se que o ET tem maior importância na expressão dos sintomas da doença do que no aumento na resistência a patógenos (Métraux et al., 2002).

A comunicação entre as rotas de sinalização mediadas pelo AS, AJ e ET ocorre nas plantas infectadas e em estado de indução (Métraux et al., 2002; Conrath et al., 2015). Por exemplo, no patossistema *Arabidopsis-Pst* DC3000, a indução da RSA ocorreu simultaneamente com a RSI que é dependente do ET e do AJ (Métraux et al.,



2002; Conrath et al., 2015). A rota dependente do AJ pode inibir a rota dependente do AS, priorizando a rota governada pelo AS que é mais efetiva contra patógenos em comparação a rota do AJ que garante uma maior resistência contra a herbivoria por insetos (Métraux et al., 2002; Conrath et al., 2015).

## 4. Indutores de resistência com potencial para o manejo de doenças de plantas

A literatura registra vários tipos de indutores com potencial para reduzir a intensidade de doenças em várias culturas agronomicamente importantes (Lyon, 2007), os quais apresentam potencial para serem utilizados na agricultura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Exemplos de compostos e substâncias com potencial de induzir a resistência.

Categorias	Exemplos
Produtos obtidos de fungos, bactérias e bactérias promotoras do crescimento de plantas	Antibióticos obtidos de isolados fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> spp.; quitina ( $\beta$ -1,4- <i>N</i> -acetilglucosamina) e <i>N</i> -acetil-quitto-oligosacarídeos; ergosterol; glucanas (hepta- $\beta$ -glucopiranosídeo) obtido de micélio de <i>P. megasperma</i> ; liposacarídeos e lipo-oligosacarídeos obtidos de bactérias gram negativas; proteínas com atividade enzimática e peptídeos; extratos de leveduras como <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; ácido salicílico produzido por algumas rizobactérias; esfingolipídeos da membrana de células eucarióticas de fungos como <i>F. oxysporum</i> e <i>Pythium</i> e compostos orgânicos voláteis produzidos por bactérias
Extratos e outros produtos obtidos de plantas	Brassinólídeos conhecido como regulador do crescimento de plantas; jasmônatos e compostos relacionados produzidos em respostas a ferimentos na planta; oligo-galactoronídeos obtidos da degradação da parede celular da planta por enzimas pécticas ou hidrólise ácida de polissacarídeos pécticos; oxalato obtido de plantas como o espinafre e o ruibarbo; extratos de espécies de plantas como <i>Hedera helix</i> e <i>Reynoutria sachalinensis</i> ; espermina (poliamina); etileno e outros compostos orgânicos voláteis
Carboidratos	Quitosana (fragmentos deacetilados de polissacarídeo derivados da quitina extraída de camarão e caranguejo); trehalose encontrada no micélio de algumas espécies de fungos; a sacarina que é um metabólito do probenazole e a laminarina ( $\beta$ -1,3-glucana) obtida da alga <i>Laminaria digitata</i>
Minerais e íons	Fosfitos, fosfatos e fosfanatos; silício

No caso de minerais e íons, parece não ser muito comum à indução de RSA por compostos minerais, embora resultados de pesquisa possam ser encontrados na literatura. Plantas de pepino manifestaram RSA contra *Colletotrichum lagenarium* após a aplicação de fosfatos. Plantas de milho também exibiram RSA e foram resistentes a *Puccinia sorghi* com redução de 98% no número de pústulas com uma única aplicação de  $K_2HPO_4$  a 0,1M. A aplicação de fosfatos em pepino reduziu as severidades da antracnose e oídio em pepino acompanhada por um aumento na atividade de enzimas

relacionadas com a defesa da planta como peroxidases e polifenoloxidasas. A aplicação de fosfatos também se mostrou eficiente em controlar doenças em pimentão, uva, arroz e cevada. Fosfanatos, obtido pela hidrólise do ácido fosfórico, também aumenta a resistência das plantas a patógenos a exemplo do Phytogard® (58% de fosfanato de potássio -  $K_2HPO_3$ ) no controle do míldio em couve-flor. A forma pela qual os fosfatos atuam como ativadores de resistência ainda não está totalmente elucidada. Acredita-se que a quelatação de íons cálcio no sítio de aplicação de fosfatos poderia gerar um sinal bioquímico endógeno para a ocorrência da RSA. Os íons fosfato sequestram cálcio no apoplasto, alterando a integridade da membrana e afetando a atividade de enzimas tais como poligalacturonases, liberando elicitores latentes na parede celular da planta (oligo-galacturonídeos). Íons fosfato em pepino causam a morte localizada de células, contribuem para a geração de espécies reativas de oxigênio e aumento dos níveis de AS tanto livre quanto conjugado. Aplicação de fosfato em folhas baixas aumentou a resistência das folhas superiores através do aumento na atividade das enzimas FAL, peroxidase e lipoxigenase.

Existem relatos na literatura da potencialização da resistência de plantas, principalmente monocotiledôneas, pelo silício (Si). Existem evidências citológicas de que o aumento na resistência do arroz a brusone mediada pelo Si foi devido ao acúmulo de compostos fenólicos (Rodrigues et al., 2003). Observações ultraestruturais de amostras de folhas coletadas de plantas que não receberam Si revelou que inúmeras células da epiderme e do mesófilo foram desprovidas de organelas funcionais, além de terem a parede celular completamente degradada por enzimas produzidas pelo fungo *Pyricularia grisea* (Rodrigues et al., 2003). Além disso, a presença de material osmiofílico associado às células fúngicas foi raramente observada nas células da epiderme e do mesófilo de arroz. Em plantas que receberam Si, as hifas do fungo presentes nas células da epiderme, do mesófilo e do sistema vascular estavam vazias e foram circundadas por uma camada densa de material osmiofílico (Rodrigues et al., 2003). Marcação citoquímica de quitina na parede das células do fungo não revelou nenhuma diferença no padrão de localização desse material nas amostras obtidas de plantas recebendo ou não Si no período de 96 h após a inoculação das plantas com *M. grisea* (Rodrigues et al., 2003). Isso indica que a produção de quitinases como um mecanismo de defesa do arroz a brusone não foi importante. De um outro lado, a ocorrência de células fúngicas vazias circundadas por material amorfo (osmiofílico) em amostras de plantas recebendo Si sugere claramente que compostos fenólicos ou fitoalexinas tiveram um papel crucial na resistência do arroz a brusone. Existe também a hipótese de que uma alteração no desenvolvimento de *P. grisea* nas células das folhas de arroz recebendo Si poderia estar associado com um aumento na produção de fitoalexinas. Isso foi comprovado uma vez que momilactonas A e B foram produzidas em pequenas quantidades em plantas não inoculadas sem ocorrer nenhuma diferença entre plantas recebendo ou não a aplicação de Si (Rodrigues et al., 2004). Ao contrário, a indução dessas momilactonas foi de 2,5 vezes maiores em extrato de plantas recebendo Si e inoculadas com *P. grisea* do que no extrato de plantas inoculadas sem receberem Si (Rodrigues et al., 2004). Plantas não recebendo Si e inoculadas com *P. grisea*, mesmo que produzissem compostos anti-fúngicos incluindo essas duas momilactonas, não foram eficientemente protegidas da colonização pelo fungo ao contrário de plantas recebendo Si e

inoculadas com *P. grisea* (Rodrigues et al., 2004). Aspectos citológicos e moleculares de interações compatíveis e incompatíveis arroz- *P. grisea* na presença do Si foram discutidos por Rodrigues et al. (2005). A cultivar resistente Katy respondeu à raça IB-49 de *P. grisea* através do desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade (granulação intensa do citoplasma e autofluorescência das células da epiderme), indução de mRNA dos genes *PR-1* e *POX* bem como acumulação de elevados níveis de compostos fenólicos solúveis e lignina o que acarretou numa redução do crescimento da hifa do fungo dentro das células da epiderme (Rodrigues et al., 2005). Essas respostas de defesa foram similares nos tratamentos com e sem a aplicação de Si. De um outro lado, plantas da cultivar M201, altamente susceptível à brusone, mas recebendo a aplicação de Si, responderam à infecção pelo patógeno através da acumulação de transcritos dos genes *GLU*, *POX* e *PR-1*, além da produção de compostos fenólicos solúveis e lignina contribuindo para restringir o crescimento das hifas nas células da epiderme (Rodrigues et al., 2005). Ao contrário, em plantas da cultivar M201 que não receberam Si, as hifas do fungo ramificaram dentro da célula da epiderme penetrada e colonizaram células adjacentes, mesmo com a indução dos genes que codificam para *QUI*, *GLU*, *CHS*, *FAL* e *PR-1* e produção de elevados níveis de compostos fenólicos solúveis e lignina (Rodrigues et al., 2005). A autofluorescência das células da epiderme em plantas da cultivar M201 que não receberam Si tornou-se opaca à medida que as lesões se expandiram em comparação com plantas da mesma cultivar recebendo Si (Rodrigues et al., 2005).

Outros tipos de indutores também foram relatados na literatura. O ácido *DL*-3-amino-butírico (BABA), aminoácido não protéico, é um dos poucos compostos que apresenta eficiência em induzir resistência em solanáceas. Tratamento local com BABA protegeu sistemicamente tomate e batata contra *Phytophthora infestans* e fumo contra *Peronospora tabacina*. Não se observa atividade “*in vitro*” ou “*in planta*” contra patógenos fúngicos, mas o composto pode ter atividade inclusive curativa, o que é pouco comum entre os indutores de RSA. A exposição pós-infecional de plantas de tomateiro ao BABA inibiu o desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* nas raízes. O BABA também foi eficiente em proteger *Arabidopsis thaliana* contra *Peronospora parasitica*. O BABA potencializa o acúmulo de mRNA do gene *PR-1*, considerado um marcador da ocorrência de RSA. Em Israel, por exemplo, pulverizações de videiras com BABA, isoladamente ou em combinação com fungicidas, controlou eficientemente o míldio.

O INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico e seu metil ester) proporciona proteção eficiente contra patógenos fúngicos e bacterianos em pepino, arroz e em outras culturas, tanto em condições controladas como em campo. Apresenta proteção semelhante aos dos microrganismos indutores de RSA e não possui atividade “*in vitro*” contra patógenos. Estudos histológicos mostraram que plantas de *Arabidopsis* expostas a INA responderam à infecção por *P. parasitica* com necrose no sítio de penetração. O INA pode vir a ser um dos ativadores químicos de RSA promissores para uso prático. Podemos citar também os lipídeos e ácidos graxos; o óxido nítrico (embora com grande ação citotóxica); vitaminas B1 (tiamina), B2 e K3 e o ácido cólico extraído da bile de animais como o boi.

É conhecido o potencial do ABA (ácido *DL*-3-amino-n-butanóico) em induzir resistência em tomateiro contra a requeima. Acredita-se que a resistência sistêmica induzida pelo ABA deve-se a translocação do composto para folhas distantes do local

de aplicação. Apesar de induzir a síntese de PRP, provavelmente os compostos atuam por alterar a estrutura ou o metabolismo da parede celular do hospedeiro, tornando os tecidos mais resistentes ao ataque de enzimas do patógeno. Estudos “*in vitro*” demonstraram que a atividade antifúngica do composto é baixa. Há relato na literatura de que o ABA é capaz de promover a ocorrência da RSA em tomateiro uma vez que por métodos imunocitoquímicos foi detectado uma PRP, mais precisamente uma P14, em sítios distantes do local de aplicação do indutor.

O Messenger obtido da proteína harpina isolada da bactéria *Erwinia amylovora* e os fungicidas Oxycom™ (ácido peracético, ácido acético, peróxido de hidrogênio e alguns nutrientes capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio), probenazole (Oryzmate®), azoxistrobin, metalaxil, piraclostrobin, proquinazid, fosetil-Al e hidróxido de cobre são também capazes de induzir resistência. Ainda não foi demonstrado se o fosetil-Al preenche todos os requerimentos para ser considerado um ativador químico indutor de RSA, embora esse fungicida pouco inibe o crescimento fúngico em ensaios “*in vitro*” e é um potente elicitador de fitoalexinas. Isso leva a crer que esse composto seria um indutor de resistência. Esse composto foi eficiente no controle da podridão mole (*Phytophthora nicotianae*) em tomateiro cultivado em hidroponia quando o mesmo foi aplicado na forma preventiva ou curativa. O probenazole é utilizado com eficiência no controle da brusone e da queima das folhas em arroz. Também nesse caso, seu modo de ação ainda não é bem compreendido. Isso porque em arroz, a RSA ainda não foi bem estudada, já que essa planta acumula altos teores de AS. O probenazole potencializa de forma mais rápida as defesas de cultivares de arroz suscetíveis à brusone. O DCP (ácido 2,2-dichloro-3,3-dimetilciclopropano carboxílico) é outro composto usado para o controle da brusone. Esse composto apresenta reduzida atividade antifúngica “*in vitro*”, mas ocasiona aumento na atividade de peroxidases e acúmulo de fitoalexinas.

## 5. O custo da resistência induzida

Qualquer gasto energético indispensável para o metabolismo primário da planta desviado, nem que seja parcialmente, para ser investido na ativação de mecanismos de defesa (ativação de genes envolvidos em diferentes rotas) pode comprometer o crescimento e a produção (Reglinski et al., 2007; Reignault & Walters, 2007; Walters et al., 2005). Isso se torna mais problemático especialmente quando se aplica um indutor e ocorre a ativação de alguns mecanismos de defesa sem a ocorrência da doença. Num outro cenário, a doença ocorre, porém em baixa intensidade que não justificaria a utilização do indutor. Nessa condição, o emprego do indutor representará um custo adaptativo para a planta, principalmente quando, dependendo da dose empregada, ocorrer problemas de fitotoxidez (Reglinski et al., 2007; Reignault & Walters, 2007; Walters et al., 2005). A concentração do elicitador a ser empregada, a sua forma de aplicação, a ausência de outros tipos de elicitores, a espécie da planta hospedeira e o seu estágio fenológico devem ser atentamente observados para que os resultados obtidos em condições controladas possam se confirmar em nível de campo (Reglinski et al.,

2007; Reignault & Walters, 2007; Walters et al., 2005). Caso isso ocorra, o emprego dos indutores de resistência no controle de doenças, considerando ocorrer um equilíbrio entre os gastos energéticos empregados no crescimento da planta, na produção e ativação de mecanismos de defesa, seria altamente justificável.

## 6. Conclusão

Atualmente, várias culturas economicamente importantes estão sendo cultivadas com eficiência devido à aplicação de vários agrotóxicos visando o controle de doenças. A contaminação do meio ambiente, a intoxicação do aplicador, a seleção de isolados resistentes do patógeno, a ingestão de alimentos com resíduos de pesticidas pelo homem e o alto custo de produção são fatores que nos fazem refletir sobre a necessidade de se pesquisar alternativas no controle dessas doenças. Essas alternativas, almejadas que sejam mais eficientes no controle e menos agressivas à saúde do homem e ao ambiente, podem ser através da utilização dos indutores de resistência. Assim, se os indutores de resistência forem corretamente empregados nas nossas práticas agrícolas, estaremos trabalhando dentro da filosofia de uma Agricultura sustentável que almeja ser cada vez menos dependente da utilização de agrotóxicos. Nesse contexto, o mais importante seria a qualidade do produto final do que o ganho em produção que às vezes não paga o custo com os agrotóxicos.

## 7. Referências bibliográficas

- AVERRE, C.W.; KELMAN, A. Severity of bacterial wilt as influenced by ration of virulent to avirulent cells of *Pseudomonas solanacearum* in inoculum. **Phytopathology**, v. 54, p. 779-783, 1964.
- BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 545-580, 2005.
- CHESTER, K.S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **The Quarterly Review of Biology**, v. 8, p. 275-324, 1933.
- CONRATH, U.; BECKERS, G.J.M.; LANGENBACH, C.J.G., JASKIEWICZ, M.R. Priming for enhanced defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 97-119, 2015.
- CRUICKSHANK, I.A.M.; MANDRYK, M. The effect of stem infection of tobacco with *Peronospora tabacina* on foliage reaction to blue mold. **Journal of Australian Institute of Agricultural Research**, v. 26, p. 369-372, 1960.
- DEBONA, D., RODRIGUES, F.A. Alterações bioquímicas e estruturais em plantas induzidas após a detecção do patógenos. In: DALLAGNOL, L.J. (org.). **Resistência Genética de Plantas a Patógenos**. 1ª Ed., Pelotas: UFPel, 2018, p. 150-193.
- GAÜMANN, E. Toxins and Plant Diseases. **Endeavour**, v. 13, p. 198-204, 1954.
- HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.



- HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (eds.). **Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, 2007, p. 1-8.
- HUTCHESON, S.W. Current concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 59-90, 1998.
- KLEMENT, Z.; KIRÁLY, Z.; POZSAR, B. Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophyte bacterium. **Acta Phytopathologica Hungariae**, v. 1, p. 11-18, 1966.
- KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G.W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. **Phytopathology**, v. 87, p. 136-137, 1997.
- LOON, L.C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- LOVREKOVICH, I.; FARKAS, G.L. Induction of protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. **Nature**, v. 205, p. 823-824, 1965.
- LYON, G. Agents that can elicit induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (eds.). **Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, 2007, p. 9-29.
- MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C.; GENOUD, T. Systemic acquired resistance. **Euphytica**, v. 124, p. 237-243, 2002.
- MÜLLER, K.O. Studies on phytoalexins: I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infections with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. **Australian Journal of Biological Science**, v. 11, p. 275-300, 1958.
- MÜLLER, K.O.; BÖRGER, H. Experimentelle untersuchungen über die *Phytophthora* - resistenz der kartoffel. **Arbeiten der Biologischen Reichsaustalt, Land-und Forstwirtschaft**, v. 23, p. 189-231, 1940.
- PIETERSE, C.M.J. et al. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbiosis**, v. 35, p. 39-54, 2003.
- REGLINSKI, T.; DANN, E.; DEVERALL, B. Integration of induced resistance in crop production. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (eds.). **Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, 2007, p. 201-228.
- REIGNAULT, P.; WALTERS, D. Topical application of inducers for disease control. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (eds.). **Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, 2007, p. 179-200.
- RODRIGUES, F.A.; BENHAMOU, N.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; BÉLANGER, R.R. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicon-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, p. 535-546, 2003.
- RODRIGUES, F.A.; JURICK II, W.M.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, p. 144-159, 2005.
- RODRIGUES, F.A. et al. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. **Phytopathology**, v. 94, p. 177-183, 2004.
- ROSS, A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection. **Virology**, v. 14, p. 340-358, 1961.

- ROSS, A.F. Systemic effects of local lesion formation. In: BEEMSTER, A.B. R.; DIJKSTRA, J. (eds.). **Viruses of Plants**. Amsterdam, North-Holland, 1966, p. 127-150.
- SEQUEIRA, L.; HILL, I.M. Resistance in tobacco leaves: the growth of *P. solanacearum* in protected tissues. **Phytopathology**, v. 64, p. 447-455, 1974.
- WALTERS, D.; DANIELL, T. Microbial induction of resistance to pathogens. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (eds.). **Induced Resistance for Plant Defence: a Sustainable Approach to Crop Protection**. Blackwell Publishing, 2007, p. 143-156.
- WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, v. 95, p. 1368-1373, 2005.

Camila de Moraes Rêgo-Machado  
Francisco de Assis dos Santos Diniz  
Alice Kazuko Inoue-Nagata  
Eduardo Chumbinho de Andrade  
Thaís Ribeiro Santiago

## 1. Introdução

Fitopatógenos causam sérios problemas em culturas de exploração agrícola, resultando em redução substancial na produtividade e na qualidade final do produto. Estima-se que cerca de 10 a 16% do custo de produção de uma lavoura é destinado aos gastos para controle de doenças (Strange & Scott, 2005; Oerke, 2006; Savary et al., 2019). Atualmente, a principal medida utilizada para o manejo de fitopatógenos consiste na aplicação de produtos agroquímicos, porém, esta estratégia, além de contribuir para o aumento do custo de produção, pode resultar na emergência de isolados resistentes ou tolerantes ao princípio ativo e também provocar danos ao meio ambiente, à saúde humana e aos animais (Nelson, 2020). Assim sendo, há uma forte demanda para o desenvolvimento de novas ferramentas que contribuam para o controle eficiente dos fitopatógenos de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável.

Nos últimos anos, o fenômeno conhecido como RNA de interferência (*RNA interference*, RNAi) tem recebido grande destaque em nível mundial como potencial ferramenta para o controle de patógenos, por apresentar como principais características uma maior especificidade ao alvo, alta eficiência no controle e menor impacto sobre o ambiente (Rosa et al., 2018). RNAi é um mecanismo de regulação da expressão gênica e defesa antiviral em organismos eucariotos desencadeado pela presença de duplexes de RNA, comumente denominados como moléculas de RNA dupla fita (*double-strand RNA*, dsRNA), resultando no silenciamento gênico transcricional (*Transcriptional Gene Silencing*, TGS) e/ou pós-transcricional do gene homólogo (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS) (Zhang et al., 2019).

A aplicação do mecanismo de RNAi para a proteção de plantas foi um dos grandes marcos para a agricultura na última década. O desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas expressando duplexes de RNA específicos de patógenos foi o método inicialmente utilizado para a produção das moléculas de RNA nas plantas visando a indução de RNAi e, conseqüentemente, a proteção contra a infecção por patógenos-alvos. Essa estratégia biotecnológica é conhecida como silenciamento gênico induzido pelo hospedeiro (*Host-Induced Gene Silencing*, HIGS) (Koch & Kogel, 2014). Nos últimos anos, muito se avançou no estudo sobre este tema e inúmeros trabalhos confirmaram a eficiência de HIGS para a proteção de plantas contra patógenos, notadamente via produção de plantas transgênicas (revisados por Ghag, 2017). Entretanto, o

processo de obtenção, avaliação e regulamentação de uma planta transgênica é demorado, com complicadas etapas de transformação, seleção e caracterização, seguido de um rígido protocolo de avaliação de biossegurança, além da existência de uma fração do público desfavorável a esta tecnologia.

Diante dessas barreiras, novas metodologias para entrega de duplexes de RNA têm sido estudadas visando a introdução direta de moléculas de forma exógena em plantas, isto é, a aplicação tópica das moléculas puras ou associadas a um agente carreador/estabilizante. O uso dessa estratégia apresenta vantagens importantes, como a rapidez no seu desenvolvimento, customização em seu desenho, otimização e produção, facilidade de aplicação e a maior aceitação pelos consumidores, por não envolver modificações genéticas artificiais. Contudo, a instabilidade das moléculas no ambiente e o seu custo são fatores ainda altamente limitantes (Fletcher et al., 2020). Felizmente, a síntese de dsRNAs está sendo barateada consideravelmente ao longo dos anos (Zotti et al., 2018). De acordo com nossas pesquisas, entre os anos de 2008 a 2020, o grama de dsRNA passou de US\$ 12.500 para US\$ 45. A redução do custo deve-se, principalmente, ao aprimoramento de métodos para a produção em larga escala de dsRNA com maior pureza e qualidade.

Acredita-se que a aplicação de produtos baseados em duplexes de RNA podem se tornar uma solução nova e/ou complementar ao manejo de fitopatógenos, com eficiência e especificidade superiores aos métodos convencionais (Joga et al., 2016; Zotti et al., 2018). Entretanto, desafios como a estabilidade das moléculas no ambiente, a entrega no sítio específico, a eficiência de proteção e o custo do produto ainda precisam ser superados para garantir não apenas uma função protetora, mas também o efeito sistêmico duradouro e curativo dos produtos. Neste capítulo, serão abordados o histórico da tecnologia de RNAi, a via de silenciamento gênico induzido com a aplicação tópica de RNA, além dos principais avanços na produção, entrega e efetividade das moléculas de RNA para o controle de fitopatógenos.

## 2. Histórico

Como muitas outras descobertas na ciência, o silenciamento gênico foi observado a partir de um resultado inesperado, com um experimento realizado por Matzke e colaboradores (1989) envolvendo a transformação de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com duas construções. Neste trabalho, os autores transformaram tabaco com uma construção e, após seleção dos transformantes, realizaram uma segunda transformação. Então, eles observaram que a presença de um T-DNA afetava o estado de metilação e expressão de genes do segundo T-DNA. Mais tarde, Napoli e colaboradores (1990) observaram o fenômeno de silenciamento por RNA quando realizaram um estudo visando intensificar a coloração das flores de petúnia por meio da superexpressão de um gene endógeno que codifica a chalcona sintase (CHS), enzima associada à biossíntese de antocianinas. O objetivo era produzir flores quase negras. Para isso, os pesquisadores aumentaram o número de cópias do gene usando uma construção química da região codante de CHS via transgenia. Contudo, ao contrário do esperado,

o experimento resultou em linhagens transgênicas que produziam flores de petúnia com diferentes padrões de coloração, incluindo flores variegadas e totalmente brancas, resultantes aparentemente do silenciamento parcial ou total, respectivamente, dos transcritos de CHS. O fenômeno responsável pela redução no acúmulo do transcrito, tanto do transgene quanto do gene endógeno pré-existente nas plantas, foi denominado como cossupressão (Napoli et al., 1990).

Visando desvendar os mecanismos moleculares envolvidos nesse fenômeno, ensaios subsequentes demonstraram que plantas transgênicas com fenótipo de flores brancas continham um número similar de transcritos de CHS no núcleo quando comparadas com as plantas controles, porém, menor na região citoplasmática (Van Blokland et al., 1994). Essa nova descoberta constatada em petúnias foi denominada como PTGS, diferenciada de TGS cuja redução dos transcritos ocorre unicamente na região nuclear.

Paralelamente, estudos realizados em diversas instituições constataram que plantas geneticamente modificadas contendo fragmentos genômicos de fitopatógenos apresentavam resistência aos seus respectivos alvos. Em sua maioria, os trabalhos científicos tinham como objetivo a proteção de plantas contra viroses contendo uma cópia da região codificante da capa proteica (CP) viral inserida no material genético vegetal. Estas plantas apresentavam altos níveis de resistência à infecção pelos vírus homólogos (Lindbo & Dougherty, 1992; Lindbo et al., 1993). Sanford & Johnston (1985) nomearam o fenômeno como resistência derivada do patógeno (*Pathogen-Derived Resistance*, PDR).

Embora ambos os fenômenos, a supressão de gene endógeno em célula vegetal e a resistência à infecção viral, tenham como base o envolvimento das moléculas de RNA, a associação entre a cossupressão e PDR foi confirmada posteriormente com a utilização de vetores virais modificados expressando sequências homólogas aos genes endógenos de plantas (Ruiz et al., 1998). Esta descoberta demonstrou que os vírus internalizados na planta poderiam tanto induzir a proteção da planta como serem alvos de PTGS.

Ainda na década de 90, Romano & Macino (1992) verificaram que a regulação gênica mediada por RNA não era restrita apenas às plantas, mas também ocorria em fungos. Os pesquisadores reportaram que após a transformação de um isolado do organismo modelo *Neurospora crassa* com plasmídeo contendo duas cópias extras do gene *albino-1* (*al-1*), gene ligado à coloração alaranjada envolvida na síntese de carotenóide, observou-se colônias transgênicas com fenótipos semelhantes aos das estirpes com o gene mutado. Em fungos, o mecanismo de degradação citoplasmática dos transcritos, similar ao mecanismo de cossupressão em plantas relacionado ao PTGS, recebeu a denominação de *quelling* (repressão, em português). Além disso, estudos complementares demonstraram que a transformação de *N. crassa* expressando porções genômicas não codificantes, como promotores, não resultava na ocorrência de *quelling* (Cogoni et al., 1996).

Outros trabalhos importantes que contribuíram para uma melhor compreensão do mecanismo de silenciamento por RNA foram realizados por Guo & Kemphues (1995) e Fire et al. (1998) utilizando o nematoide modelo *Caenorhabditis elegans*. O primeiro trabalho constatou que a aplicação de injeções de RNA fita simples (*single-strand RNA*, ssRNA) antissenso no nematoide foi capaz de suprimir o acúmulo de mRNA complementar ao ssRNA. Neste mesmo estudo, experimentos adicionais comprovaram



que as moléculas de ssRNA, senso ou antissenso, eram capazes de silenciar o gene-alvo (Guo & Kemphues, 1995). Pouco foi explicado e detalhado sobre o fato observado, surgindo a necessidade de uma melhor averiguação até mesmo da possibilidade e consequência de hibridização das moléculas de RNA, resultando em dsRNAs.

Na tentativa de avançar na compreensão dos achados iniciais em *C. elegans*, Fire & colaboradores (1998) injetaram nos nematoides, separadamente, moléculas senso, anti-senso e dsRNA (senso e antisenso hibridizadas) com alta identidade a um gene essencial para os nematoides. Após as injeções, houve uma redução significativa na detecção do transcrito-alvo em todos os tratamentos, principalmente quando moléculas de dsRNA foram utilizadas. Assim, foi constatado o fenômeno de silenciamento gênico em nível pós-transcricional, sem alteração na sequência do DNA. Esse foi o primeiro relato de PTGS desencadeado por interferência de dsRNA e o fenômeno foi denominado de RNAi (Fire et al., 1998). A partir desses resultados, propôs-se que PTGS era ativado pela presença de duplexes de RNA, que, por sua vez, levavam à formação de um complexo proteico, naquele momento ainda não conhecido, responsável por escanear RNAs, encontrar sequências homólogas e degradá-las devido à sua atividade nucleolítica (Montgomery et al., 1998). Posteriormente, outros pesquisadores foram desvendando mais detalhes dos complexos proteicos envolvidos no mecanismo de RNAi.

Vários estudos comprovaram que RNAi desencadeado por duplexes de RNA é um mecanismo conservado em diferentes eucariotos, desde organismos unicelulares como *Paramecium*, aos pluricelulares como protozoários, vermes e mamíferos (e.g., Churikov et al., 2000; Yao et al., 2003; Morris et al., 2004). Esses trabalhos sugerem o enorme potencial do uso de RNAi como uma ferramenta para o silenciamento de genes, contribuindo para estudos de genômica funcional visando a determinação de funções gênicas, geração de organismos com características alteradas conforme nosso interesse, e desenvolvimento de terapias para prevenção e cura de doenças degenerativas e infecciosas em animais, humanos e plantas. Devido à importância da descoberta e perspectivas da tecnologia, Fire e Mello receberam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 2006, e a revista *Economist* descreveu os pequenos RNAs como o “Big Bang da Biologia”.

Atualmente, a tecnologia de RNAi vem sendo muito utilizada em diferentes áreas da agricultura, mas muito ainda precisa ser realizado para o seu uso no manejo de doenças de plantas em campo (Rosa et al., 2018). Pelo nosso conhecimento, nenhum produto protetor à base de duplex de RNA encontra-se disponível comercialmente para o controle de fitopatógenos. No entanto, plantas transgênicas com resistência a doenças, que têm como base o mecanismo de RNAi, já são comercialmente disponíveis desde o final do século XX. Um caso de sucesso é o mamoeiro transgênico resistente à infecção pelo vírus do anel do mamoeiro (*Papaya ringspot virus*, PRSV), causador da mancha anelar, e que foi liberado comercialmente no Havaí, EUA, em 1998 (Gonsalves, 2002; 2006). A planta transgênica foi modificada para expressar uma sequência parcial do gene do capsídeo do PRSV, seguindo o conceito de PDR, sendo posteriormente confirmado que a resistência era mediada pelo mecanismo de PTGS (Kung et al., 2015). Mais recentemente, uma planta de milho geneticamente modificada de acordo com a tecnologia de RNAi para o controle da vaquinha (*Diabrotica virgifera*) foi liberada para comercialização no Canadá e Brasil em 2016, e nos Estados Unidos em 2017. No Brasil, foi desenvolvido um feijão transgênico modificado com a introdução de parte do genoma

do vírus do mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus*, BGMV), um patógeno altamente agressivo (Aragão et al., 2013). A planta é imune à infecção pelo BGMV.

Esses eventos de liberação comercial foram um marco para a agricultura, uma vez que o RNAi, antes tão distante de ser aplicado em campo, agora está disponível aos produtores como uma ferramenta para o manejo de doenças e pragas. Contudo, o desenvolvimento e sucesso na utilização desta tecnologia em plantas transgênicas são limitados por diversos fatores, entre os quais se destacam: (i) características intrínsecas de cada planta que dificultam sua transformação genética; (ii) fatores políticos; e (iii) a falta de confiança do consumidor em relação aos produtos transgênicos (Popek & Halagarda, 2017; Zotti et al., 2018). Por isso, a entrega tópica de duplexes de RNA vem sendo amplamente estudada e explorada como uma ferramenta alternativa para proteção de plantas.

O primeiro trabalho de sucesso usando moléculas de RNA aplicadas topicamente em plantas foi realizado para controle dos vírus das espécies *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco etch virus* (TEV) e *Alfalfa mosaic virus* (AMV) em *Nicotiana benthamiana*, tabaco e pimenta (*Capsicum chinense*) (Tenllado & Diaz-Ruiz, 2001). Duas décadas após o trabalho de Tenllado & Diaz-Ruiz (2001), muitos estudos vêm sendo realizados para aprimorar o conhecimento da rota biológica dos duplexes de RNA exógenos, metodologias de aplicação e viabilização da produção, conforme será apresentado adiante neste capítulo.

### 3. Via de silenciamento mediada por moléculas de RNA exógenas em plantas

O mecanismo de RNAi está envolvido em diversas rotas biológicas responsáveis pela estabilidade genética, regulação epigenética, desenvolvimento, reprodução e defesa das plantas (Wang & Chekanova, 2016). Como mencionado anteriormente, as vias de RNAi são desencadeadas pela presença de duplexes de RNA, isto é, moléculas de RNA de fita dupla que são reconhecidas e processadas em pequenos RNAs (*small RNA*, sRNA) pela maquinaria da célula eucariótica (Borges & Martienssen, 2015). Estes duplexes de RNA podem ser gerados como um intermediário durante a replicação viral, pela hibridização de RNAs endógenos complementares presentes no genoma da planta, por uma construção gênica desenhada em orientações invertidas ou pelo emparelhamento de uma fita simples de RNA contendo sequências complementares nas extremidades com um espaçador no meio, resultando na formação de uma estrutura em forma de grampo (*hairpin RNA*, hpRNA) (Parent et al., 2012).

Em plantas, há duas categorias principais de sRNAs: micro RNA (miRNA) e pequeno RNA interferente (*small interfering RNA*, siRNA). Estas moléculas diferem entre si em alguns aspectos, como a biogênese, o modo de regulação gênica e as funções biológicas em que estão envolvidas. Contudo, apesar das diferenças, são bioquimicamente próximas e suas vias são interconectadas e/ou sobrepostas (Ghildiyal & Zamore, 2009; Guleria et al., 2011; Axtell, 2013).

Na via de RNAi induzida pela aplicação tópica de RNA, na qual estão envolvidos os siRNAs, ocorre uma cascata de respostas que é igualmente ativada quando as plantas detectam moléculas de ácido nucleico invasores. Múltiplos componentes estão envolvidos nesta rota de silenciamento em plantas, entre eles pode-se destacar as proteínas *Dicer-Like* (DCL, nomeadas como DCL1 a DCL4), o complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-Induced Silencing Complex*, RISC), as proteínas Argonautas (AGO) e as enzimas RNA polimerases dependentes de RNA (*RNA-Dependent RNA Polymerase*, RDR) (Jacobsen et al., 1999; Dalmay et al., 2000; Schauer et al., 2002; Liu et al., 2004; Baumberger & Baulcombe, 2005).

DCL é uma ribonuclease (RNase III) que foi observada pela primeira vez com atividade endonucleolítica de RNAs em *Escherichia coli* (Robertson et al., 1968). Trata-se de uma proteína da família de endoribonuclease que contém na sua estrutura os domínios *Piwi-Argonaute-Zwille* (PAZ), *DExD-box Helicase-C*, RNase III e um com afinidade de ligação a moléculas de dupla fita de RNA (*dsRNA-binding domain*, dsRBDs) (Carmell & Hannon, 2004; Margis et al., 2006).

Uma vez reconhecidos e em contato com uma DCL, os duplexes de RNA são processados em siRNAs com tamanho entre 21 a 24 pares de bases (pb) (Carmell & Hannon, 2004). O comprimento da sequência dos siRNAs é determinado pela DCL que os clivou, e diferentes funções são assumidas de acordo com o tamanho dos siRNAs. Por exemplo, DCL4 processa siRNAs de 21 pb, DCL2 de 22 pb e DCL3 de 24 pb de comprimento (Hohn & Vazquez, 2011). As moléculas de siRNA são então associadas a proteínas AGO. Estas proteínas pertencem a uma família multigênica, compostas por três domínios conservados: PAZ, *Middle* (MID) e *P-element induced wimpy* (PIWI). O domínio PAZ reconhece a extremidade 3' do siRNA, enquanto os domínios MID e PIWI ancoram a extremidade 5' do siRNA.

As proteínas AGO, por si só, não conseguem acoplar completamente os siRNAs a sua estrutura. Para que isso ocorra, é necessário a presença do RISC (Pham et al., 2004; Kawamata & Tomari, 2010). Essa associação resulta na ocorrência de várias etapas que culminam na alteração da estrutura do siRNA para que o RISC esteja completamente maduro e funcional (Kobayashi & Tomari, 2016).

Após a incorporação do siRNA ao complexo RISC, a AGO, que contém um domínio catalítico de RNase, cliva uma das fitas do siRNA, e a que permanece recebe o nome de fita guia. Qualquer uma das fitas do siRNA pode ser utilizada como fita guia, e, em geral, a escolha da fita que permanece no complexo RISC está associada à cadeia que apresenta menor estabilidade termodinâmica na extremidade 5' (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Após o acoplamento da fita guia, o RISC é considerado funcional, sendo a fita capaz de guiar o silenciamento de RNAs homólogos (Kawamata & Tomari, 2010; Ketting, 2011; Kwak & Tomari, 2012). O silenciamento ocorre pela clivagem e degradação sequência-específica do mRNA ou inibição da sua tradução na região citoplasmática (Song et al., 2004; Wang et al., 2009; Parker, 2010; Borges & Martienssen, 2015). O processo de PTGS não ocorre apenas em nível celular, uma vez que as moléculas de RNA podem se translocar célula-a-célula ou sistemicamente na planta.

## 4. Translocação célula-a-célula e sistêmica de RNAs em plantas

Em plantas, assim como em alguns animais, diferentes moléculas de RNA funcionam como sinais móveis da via de RNAi, que são translocadas por curtas ou longas distâncias, levando ao silenciamento de RNA com sequências homólogas em uma área limitada ou em toda a planta, respectivamente (Mermigka et al., 2016). Dessa forma, após ser iniciado em células de um tecido específico, o processo de interferência pode ser expandido para outras células de tecidos adjacentes e resultar em RNAi sistêmico (Melnik et al., 2011; Mermigka et al., 2016).

Um dos trabalhos pioneiros na demonstração da natureza móvel do silenciamento por RNA foi realizado em plantas transgênicas expressando o gene da proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) (Voinnet & Baulcombe, 1997). Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo uma construção com o gene GFP e, após 18 dias, observou-se que a expressão do transgene foi silenciada nas folhas de brotos axilares e superiores da planta. Os autores sugeriram que esta interferência seria causada por uma molécula-sinal transportada para fora da folha infiltrada, provavelmente um fragmento de ácido nucleico (Voinnet & Baulcombe, 1997). No mesmo ano, Palauqui & colaboradores (1997) demonstraram, por meio de experimentos de enxertia em tabaco, que o sinal do silenciamento podia ser eficientemente transmitido de um porta-enxerto com um transgene silenciado para o enxerto que expressava o transgene correspondente, resultando no silenciamento do transgene no enxerto. Hoje, sabe-se que pequenas moléculas de RNA, como siRNAs, são predominantemente responsáveis pela distribuição do sinal de RNAi, sendo transportadas a curta distância (movimento célula-a-célula) por meio de canais denominados como plasmodesmata (PD), e a longa distância (movimento sistêmico) através do floema (Dunoyer et al., 2010; Melnik et al., 2011; Mermigka et al., 2016; Wang & Dean, 2020).

PD interconecta a maioria das células vegetais, gerando um contínuo citoplasmático que permite o tráfego de moléculas dentro das plantas (Kitagawa & Jackson, 2017). Existem vários estudos sobre o transporte celular via PD, incluindo o envolvimento de proteínas que podem se associar ao PD para alterar a sua condutividade em função de estresses abióticos e bióticos (Heinlein & Epel, 2004; Lee et al., 2005; Fernandez-Calvino et al., 2011; Kitagawa & Jackson, 2017), porém, o conhecimento sobre o mecanismo do movimento intercelular de sRNAs via PD ainda é limitado. Somente recentemente uma quinase receptora, a *Barely Any Meristem-1* (BAM1), foi identificada em PD e associada à disseminação de RNAi, assim como sua enzima homóloga, a BAM2, que também desempenha papel redundante na sinalização célula-a-célula (Rosas-Diaz et al., 2018).

Com relação ao transporte sistêmico, diferentes classes de RNA – como siRNA, miRNA, RNA ribossomal, RNA transportador e RNA mensageiro – têm sido encontradas em amostras de floema (Kehr & Kragler, 2018), mas pouco se sabe como a translocação destas moléculas ocorre especificamente. É possível que o acesso de RNA ao floema seja seletivo (Maizel et al., 2020) e envolva fatores que facilitam a sua



transferência, como sequências específicas padronizadas conhecidas como *motifs* (Ding et al., 2005; Kehr & Kragler, 2018). Contudo, apesar de alguns trabalhos terem associado a presença de *motifs* de RNA com o seu transporte nas células vegetais (Ham et al., 2009; Zhang et al., 2016), nem todos os RNAs que translocam parecem contê-los (Kehr & Kragler, 2018).

O transporte à longa distância de grandes duplexes de RNA aplicados topicamente em plantas ainda é controverso, embora existam publicações envolvendo essa movimentação sistêmica de RNAs derivados de vírus (Konakalla et al., 2016; Gogoi et al., 2017; Kaldis et al., 2018; Namgial et al., 2019) e fungo (Koch et al., 2016). Em estudo com dsRNA de 666 pb homólogo ao gene *p126* (supressor de silenciamento) de *Tobacco mosaic virus* (TMV), Konakalla & colaboradores (2016) sugeriram que o dsRNA utilizado poderia conter *motifs* que interagiram com proteínas celulares vegetais e facilitaram seu transporte sistêmico em tabaco. Em contrapartida, dsRNAs complementares a sequências de outros fitovírus ficaram restritos ao local de aplicação na planta e não translocaram sistemicamente (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020). Logo, mais estudos são necessários para elucidar o movimento sistêmico de duplexes de RNA longos, especialmente sobre interações entre possíveis *motifs* de RNA, se houverem, e proteínas vegetais (Konakalla et al., 2016), a fim de esclarecer os resultados contraditórios sobre o transporte destas moléculas.

É importante destacar que, em plantas, nematoides e fungos, siRNAs secundários têm papel essencial na amplificação, transitividade e disseminação do silenciamento (Vazquez & Hohn, 2013). Para tanto, siRNAs primários – oriundos da clivagem dos duplexes de RNA primários que ativam a via de RNAi – iniciam a síntese de moléculas de dsRNA a partir do mRNA alvo pela ação de enzimas RDR. Estas novas moléculas são, então, clivadas em siRNAs secundárias por enzimas DCL (Voinnet, 2008; Vazquez & Hohn, 2013). O efeito do tamanho de siRNAs sobre a ocorrência de RNAi local e sistêmico em plantas transgênicas de *N. benthamiana* expressando GFP foi estudado e os autores constataram que a aplicação por pulverização de siRNAs de 21, 22 e 24 pb complementares ao GFP silenciou localmente a fluorescência verde, enquanto o silenciamento sistêmico foi observado após aplicação de siRNAs de 22 pb (Dalakouras et al., 2016). Acredita-se, portanto, que siRNAs de 22 pb são os principais indutores de RNAi sistêmico nas plantas, provavelmente devido à sua capacidade de recrutar uma RDR para o seu mRNA alvo e levar à biogênese de siRNAs secundários (Dalakouras et al., 2020). Esta amplificação do silenciamento por RDR é importante na defesa efetiva de plantas contra patógenos (Wang et al., 2010; Song et al., 2018a).

Uma potencial alternativa ao transporte de RNA entre células e via floema é através de vesículas extracelulares (*Extracellular Vesicles*, VE) (Kehr & Kragler, 2018), uma vez que diversos tipos de sRNA foram identificados em VE de plantas de *Arabidopsis* (Baldrich et al., 2019). Segundo Wang & Dean (2020), estes sRNAs podem ser translocados intercelularmente (através de PD) e entre organismos filogeneticamente diferentes dentro de VE. Como exemplo, foi reportada a secreção de VE do tipo exossomo em plantas de *Arabidopsis* para entrega de RNAs ao patógeno *Botrytis cinerea*. As vesículas se acumularam nos tecidos infecciosos da planta e foram, então, absorvidas pelas células fúngicas, resultando na indução do silenciamento de genes relacionados à patogenicidade do fungo (Cai et al., 2018).



Existe também relato do transporte de siRNA e hpRNA através do xilema de macieiras, videiras e *N. benthamiana* (Dalakouras et al., 2018). A aplicação tópica destas moléculas por meio de injeções no tronco e absorção por pecíolos das plantas restringiu sua translocação ao xilema e apoplasto. Porém, após a entrega de hpRNA, não foram detectados siRNAs, sugerindo que o transporte pelo xilema não leva o RNA fornecido exogenamente para o interior das células onde ocorre o processamento por enzimas DCL e, conseqüentemente, não desencadeia o RNAi na planta (Dalakouras et al., 2018). Portanto, o floema deve ser, de fato, a via mais importante de RNAi sistêmico para controle de fitopatógenos.

## 5. Seleção do alvo e produção de duplexes de RNA

A estratégia de aplicação tópica de duplexes de RNA para o manejo de fitopatógenos possui três pontos críticos que devem ser levados em consideração a fim de minimizar os impactos no ecossistema e controlar eficientemente o patógeno-alvo: (i) identificação do gene-alvo adequado; (ii) produção de RNA em larga escala e com baixo custo para uso em campo; e (iii) desenvolvimento de uma metodologia de entrega das moléculas adequada ao patógeno-alvo (Kaur et al., 2016).

Inicialmente, deve-se fazer um estudo criterioso na busca de genes candidatos a serem silenciados no fitopatógeno, de forma que o dsRNA desenvolvido não encontre alvos em plantas cultivadas ou organismos benéficos (efeito fora do alvo ou *off-target*). No geral, os genes devem estar envolvidos em processos biológicos essenciais ao patógeno, de modo que, ao serem silenciados, gerem um fenótipo preferencialmente letal. Genes ligados ao crescimento, movimento, reprodução ou sobrevivência são frequentemente selecionados (Dubrovina & Kiselev, 2019). Alguns exemplos estão listados na Tabela 1.

Adicionalmente, a escolha da região gênica com homologia ao duplex de RNA também é determinante para a especificidade ao alvo. Moléculas de amplo espectro requerem que o desenho do dsRNA ocorra em regiões conservadas do gene, como os *motifs*; enquanto o controle espécie-específico baseia-se em regiões variáveis que diferem em nível de espécie ou mesmo entre indivíduos de uma mesma população (Gatta et al., 2018). Dessa maneira, é possível ajustar a especificidade do silenciamento ao nível taxonômico desejado, sendo também necessário investigar todo o contexto ambiental (genoma da planta hospedeira e de organismos benéficos associados) para garantir a ausência de efeito *off-target* (Mogren et al., 2017). A escolha de um gene e/ou uma região genômica eficaz e com um alto nível de silenciamento resultará na morte ou interrupção do ciclo de vida apenas do(s) patógeno(s)-alvo(s).

Atualmente, três tipos de duplexes de RNA vêm sendo utilizados com sucesso em estudos de indução tópica de RNAi para o controle de fitopatógenos: dsRNA, hpRNA e siRNA (Tabela 1) (Dubrovina & Kiselev, 2019). Os dsRNA e hpRNA variam entre 300-800 pb de comprimento (Watson et al., 2005). Além do tamanho, dsRNA e hpRNA são funcionalmente semelhantes, mas diferem em suas estruturas. Enquanto hpRNA é formado por uma única sequência de RNA contendo uma região espaçadora que

mantém as fitas senso e antisense fisicamente unidas, dsRNA é composto por duas fitas complementares independentes (Watson et al., 2005). Embora estas moléculas mais longas e complexas sejam muito utilizadas e apresentem maior eficiência em induzir o silenciamento gênico (Zhang, 2014), elas podem ter algumas limitações. Por exemplo, duplexes de RNA muito grandes, após serem processados por DCL, dão origem a inúmeros e variados fragmentos de siRNA, aumentando as chances destes pequenos RNAs terem identidade com outros genes e, dessa forma, causarem efeito *off-target* (Jackson et al., 2003; Bartoszewski & Sikorski, 2019). Além disso, o uso de longas fitas de dsRNA torna desafiador o silenciamento de uma sequência específica dentro de uma família gênica, devido ao alto grau de similaridade das sequências (Zhang, 2014).

Os siRNAs são moléculas que apresentam fita dupla e variam de 21 a 24 pb de comprimento, contendo dois nucleotídeos livres na extremidade 3' e um grupo fosfato na extremidade 5' (Watts et al., 2008; Dong et al., 2019). A comprovação de que siRNAs são capazes de induzir o silenciamento gênico foi realizada pela primeira vez por Elbashir & colaboradores (2001) em células de drosófila no começo do século XXI. Hoje, sabe-se que um grupo de siRNAs é capaz de silenciar um único alvo, mas podem apresentar diferenças na efetividade do silenciamento (Holen et al., 2002).

Além da seleção do alvo, outro gargalo no uso de RNAi é a produção dos duplexes de RNA em larga escala para a viabilidade econômica da estratégia de aplicação tópica em campo. A quantidade, integridade e pureza dos dsRNAs estão entre os principais requisitos para o sucesso da tecnologia. Assim, a otimização dos processos de produção e purificação em larga escala é necessária. As moléculas de dsRNA, hpRNA e siRNA podem ser produzidas quimicamente, biologicamente e *in vitro* (Micura, 2002; Sohail et al., 2003; Dubrovina & Kiselev, 2019), sendo as três sínteses amplamente utilizadas, cada uma apresentando suas particularidades.

No processo de triagem de um alvo, quando uma pequena quantidade de dsRNA, hpRNA ou siRNA é necessária para os testes, é comum que a síntese ocorra utilizando kits comerciais, onde a transcrição do RNA é realizada a partir de uma fita molde de DNA por meio de uma RNA polimerase dependente de DNA (Niehl et al., 2018). Esses kits são caros, laboriosos e permitem a produção de uma limitada quantidade de moléculas de dsRNA de forma pura, rápida e confiável.

A síntese química é capaz de produzir os duplexes de RNA em larga escala por um processo livre de clonagem em células eucariontes ou procariontes, ou seja, um processo muito semelhante à transcrição *in vitro*. As construções que darão origem aos duplexes de RNA devem ser clonadas em vetores comerciais que permitem a sua multiplicação por meio da polimerização de nucleotídeos. Essa transcrição pode ser realizada em biorreatores contendo a enzima RNA polimerase dependente de DNA e outros componentes. A principal limitação para esta metodologia é o alto custo de produção. Por exemplo, atualmente, a empresa AgroRNA oferece 100 gramas de dsRNA por US\$ 4.500 ([http://www.agroRNA.com/sub\\_05.html](http://www.agroRNA.com/sub_05.html)). O ponto positivo do processo de produção química é a geração de moléculas de dsRNA livres de qualquer contaminação com outros ácidos nucleicos ou proteínas. A síntese química consiste na principal forma de produção de siRNAs (Palli, 2014). Além disso, modificações químicas na estrutura das moléculas de RNA, objetivando aumentar a sua estabilidade,

podem ser rapidamente introduzidas, embora não sejam prontamente realizadas em laboratório e apresentem um custo elevado, o que inviabiliza a aplicação em campo (Braasch et al., 2003).

Já a produção de dsRNA e hpRNA por células procariontes é uma estratégia sustentável e capaz de gerar um grande volume de moléculas por baixo custo (Huang et al., 2013). A síntese biológica de duplexes de RNA pode ocorrer em leveduras ou bactérias deficientes na expressão de RNase III, enzima capaz de clivar moléculas dupla fita de RNA (Huang et al., 2013). A estirpe bacteriana mais frequentemente usada é a L1440-HT115 (DE3) engenheirada para a expressão da enzima T7 RNA polimerase visando a síntese de duplexes de RNA a partir de um plasmídeo (Arhancet et al., 2013, 2014; Huang et al., 2013). Nesse caso, a bactéria é cultivada em meio de cultura e, após sua multiplicação e indução da expressão da T7 polimerase, as células bacterianas são concentradas e lisadas (Tenllado et al., 2003; Vatanparast & Kim, 2017). Opcionalmente, as bactérias podem ter o RNA total extraído e purificado para obtenção dos dsRNAs. Bactérias ou duplexes de RNA purificados são aplicados diretamente nas plantas. Trata-se da síntese mais barata e interessante para produção de dsRNA em grande concentração, porém, apresenta uma menor pureza e maior tempo despendido na produção e clonagem dos alvos.

Uma estratégia mais elaborada consiste na transfecção da bactéria simultaneamente com dois plasmídeos, um para a expressão do dsRNA e outro para a expressão e tradução de uma proteína capsidial de um bacteriófago (Aalto et al., 2007; Hone, 2009). O dsRNA a ser expresso obrigatoriamente deve conter um domínio conservado que permita a interação entre o dsRNA com a proteína capsidial, possibilitando, assim, a sua encapsidação (i.e., encapsulamento). A encapsidação das moléculas de dsRNA garante maior estabilidade e possibilita seu uso para os mais diversos fins. Contudo, em se tratando de moléculas para aplicações agrícolas, algumas restrições referentes a essa abordagem têm sido reportadas, como por exemplo, a pulverização de plantas com partículas semelhantes a fitovírus pode possibilitar a heteroencapsidação de outros vírus fitopatogênicos que estão no ecossistema. No mesmo sentido, a aplicação de uma proteína exógena pode caracterizar uma tecnologia similar a transgênicos ou que tenha efeitos potenciais semelhantes, com restrições de uso e probabilidade de efeitos alergênicos aos seres humanos ou a outros seres vivos que compõem a cadeia alimentar. O ponto favorável desta metodologia é a facilidade de otimização do processo de produção e purificação em larga escala que permite menor perda de dsRNA por degradação.

Um outro método de produção de dsRNA que tem sido eficaz para o silenciamento gênico envolve a seleção de bactérias simbiotes capazes de colonizar e reproduzir no organismo alvo e, posteriormente, a transformação desse simbiote para expressar a molécula de RNA de interesse (Keates et al., 2008; Xiang et al., 2009). A aplicação das células vivas tem como vantagem a duração e o efeito do silenciamento, além da redução de pulverizações e do custo para implementação da tecnologia em campo (Goodfellow et al., 2019). Essas bactérias apresentam rápido crescimento em meio de cultura e, além disso, estão adaptadas às condições ambientais e ao hospedeiro eucariótico, e observa-se um menor nível da degradação das moléculas de duplex de RNA (Liu et al., 2017). Em contrapartida, por envolver a geração de um organismo geneticamente modificado, a sua liberação no ambiente exige a aprovação pelas agências regulatórias

governamentais (no caso do Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), processo que pode requerer alguns anos entre a solicitação e aprovação, além de elevar o custo da tecnologia. Embora não esteja claro como bactérias translocam RNAs exógenos para organismos eucariotos, acredita-se que isso ocorra por meio de vesículas, que podem carrear diversas moléculas, como outros RNAs. Dessa forma, a interação ocorre por meio da endocitose ou fusão das vesículas com a membrana receptora. Uma vez em contato com a membrana receptora, o conteúdo contido na vesícula é liberado no citoplasma eucarioto. Portanto, as bactérias não apenas produzem os dsRNAs como também facilitam a entrega dos dsRNA *in loco* (Ghosal et al., 2015).

## 6. Métodos de aplicação tópica de RNAs e formulações

Independente do duplex de RNA e de como ele foi sintetizado, a obtenção de bons resultados no silenciamento varia de acordo com o método de entrega da molécula selecionada. A escolha correta do sistema de entrega pode agilizar todo o processo e economizar anos de desenvolvimento e comercialização (Andrade & Hunter, 2016). Na Tabela 1 estão resumidos os métodos de aplicação tópica de duplexes de RNA que vêm sendo utilizados para o controle de fitopatógenos em diferentes espécies vegetais.

O silenciamento gênico induzido por spray (*Spray-Induced Gene Silencing*, SIGS) é considerado a estratégia mais promissora para a proteção de culturas (Morozov et al., 2019), pois pode ser facilmente implementado em campo. Além disso, SIGS tem sido bastante explorado devido ao seu potencial para controlar diversos patógenos que infectam a parte aérea de plantas. Como exemplo, a pulverização de RNA total contendo siRNA e dsRNA direcionados aos genes *DCL1* e *DCL2* de *B. cinerea* – envolvidos na produção de efetores de RNA que silenciam os genes de imunidade da hospedeira – inibiu significativamente o desenvolvimento do fungo em frutos (tomate, morango e uva), vegetais (alface e cebola) e pétalas de rosas (Wang et al., 2016). Em cevada, a aplicação foliar de dsRNAs homólogos a genes relacionados a biossíntese de ergosterol de *Fusarium graminearum* resultou na inibição do crescimento fúngico tanto em folhas pulverizadas diretamente, quanto em folhas distais não pulverizadas (Koch et al., 2016). A eficiência de SIGS também é relatada para o controle de fitovírus, como TMV, *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Bean common mosaic virus* (BCMV) (Niehl et al., 2018; Worrall et al., 2019; Rêgo-Machado et al., 2020). Adicionalmente, os resultados satisfatórios com a aplicação mecânica de dsRNAs em folhas de diferentes plantas (Tabela 1) têm aumentado a perspectiva da pulverização foliar como uma potente ferramenta para o manejo de vírus em campo (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020).

O silenciamento gênico induzido por vírus (*Virus-Induced Gene Silencing*, VIGS) é outro método promissor para entrega de duplexes de RNA às plantas (Cagliari et al., 2019). Nesse caso, uma espécie de vírus selecionada é modificada molecularmente para carregar o fragmento de RNA do gene-alvo, tornando-se um vetor viral recombinante. Depois de ser inoculado, este vetor inicia sua replicação ativando o RNAi na



planta por meio da produção contínua de dsRNA à medida que segue seu ciclo replicativo no hospedeiro (Wani et al., 2010). Porém, o tipo de vírus utilizado e a sua engenharia podem interferir na eficácia e estabilidade do silenciamento (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Alguns exemplos de vetores virais são: TMV, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Potato virus X* (PVX) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Senthil-Kumar & Mysore, 2011). Esta estratégia tem sido usada em diferentes espécies vegetais para estudar genes envolvidos em resistência a fungo (van der Linde et al., 2011), nematoide (Mao et al., 2011) e inseto (Mantelin et al., 2011).

Segundo Nandety e colaboradores (2015), VIGS baseado em vírus de plantas é uma ferramenta eficaz para atingir pragas que se alimentam do floema, pois quase todos os fitovírus infectam e se movem sistemicamente via floema. *Diaphorina citri*, por exemplo, inseto sugador de seiva e transmissor das bactérias causadoras do *huanglongbing* dos citros (também conhecido como *greening*), foi afetado pelo uso de um vetor de *Citrus tristeza virus* (CTV) recombinante contendo uma sequência de RNA do gene *abnormal wing disc* (*Awd*) do psilídeo. A alimentação das ninfas em plantas infectadas com CTV recombinante resultou no silenciamento do gene-alvo, *Awd*, levando à má formação das asas e aumento de mortalidade dos insetos adultos (Hajeri et al., 2014). Outros estudos mostram a eficiência de VIGS para controlar diferentes pragas agrícolas (Kumar et al., 2012; Wuriyanghan & Falk, 2013; Taning et al., 2018), confirmando o potencial deste método que pode ser expandido para o manejo de fitopatógenos habitantes do floema. Além dos vírus, a entrega de duplexes de RNA expressos em bactérias também já foi investigada, com obtenção de resultados positivos para a proteção de culturas (Yin et al., 2009; Gan et al., 2010; Shen et al., 2014).

Estratégias adicionais envolvendo a aplicação tópica de RNAs em plantas têm sido testadas para controle de insetos-praga, como a entrega de dsRNA por sistemas radiculares e troncos. A irrigação das raízes de arroz e milho com soluções de dsRNAs direcionados a genes de duas pragas agrícolas, *Nilaparvata lugens* e *Ostrinia furnacalis*, aumentou a taxa de mortalidade dos insetos após alimentação nas plantas tratadas (Li et al., 2015a). De forma semelhante, moléculas de dsRNA foram eficientemente aplicadas em árvores cítricas e videiras via irrigação das raízes e injeções nos troncos, reduzindo a sobrevivência de psilídeos e cigarrinhas (Hunter et al., 2012). Ghosh e colaboradores (2017) observaram que a expressão dos genes *juvenile hormone acid O-methyltransferase* (*JHAMT*) e *vitellogenin* (*Vg*) reduziram significativamente quando ninfas do percevejo marmorado marrom (*Halyomorpha halys*) se alimentaram de feijões verdes imersos em uma solução contendo dsRNAs homólogos a estes dois genes-alvos.

O método de infiltração direta de moléculas de dsRNA em planta usando seringa sem agulha foi utilizado para silenciamento de genes em *Arabidopsis thaliana* (Numata et al., 2014). Este e os demais métodos mencionados anteriormente visando o controle de pragas podem ser adaptados para outros modelos de estudo, incluindo fitopatógenos que colonizam raízes e sistemas vasculares. Contudo, o sucesso de qualquer estratégia para indução tópica de RNAi depende da entrada eficiente e transporte sistêmico dos duplexes de RNA, garantindo a proteção da planta inteira contra o patógeno. Além disso, a estabilidade das moléculas também interfere na eficácia do silenciamento e durabilidade da proteção. De acordo com Goodfellow et al. (2019), seja no interior da planta ou apenas depositados sobre ela, os RNAs podem ser degradados por meio fí-



sicos e biológicos e, conseqüentemente, perder a capacidade de protegê-la. Para resolver esse problema, alguns trabalhos foram desenvolvidos com compostos ou materiais aditivos que aumentam a estabilidade ou facilitam a adesão aos tecidos vegetais e penetração das moléculas, como oligopeptídeos catiônicos (Unnamalai et al., 2004), nanopartículas de fluorescência catiônica (Jiang et al., 2014), peptídeos carreadores (Numata et al., 2014) e nanoestruturas de DNA (Zhang et al., 2019).

Formulações de RNAs com nanopartículas estão sendo amplamente investigadas. As nanopartículas são materiais promissores para entrega de biomoléculas em plantas devido a sua capacidade de atravessar a parede celular vegetal sem força externa (entrada passiva) e por possuírem propriedades físico-químicas ajustáveis, possibilitando sua aplicabilidade em uma ampla gama de hospedeiras (Cunningham et al., 2018). Um trabalho recente mostrou que nanopartículas de argila com dupla camada de hidróxido (*Layered Double Hydroxide*, LDH) como carreadores de dsRNA protegeram as moléculas da degradação por nucleases, proporcionaram estabilidade prolongada e promoveram uma liberação lenta do dsRNA na superfície da planta; tecnologia que foi denominada como BioClay (Mitter et al., 2017a). A entrega de dsRNA em BioClay por pulverização estendeu a proteção viral de 5 dias para pelo menos 20 dias utilizando PMMoV e CMV como vírus modelos em plantas de tabaco (Mitter et al., 2017a; 2017b), e o dsRNA foi detectado na superfície de folhas tratadas mesmo 30 dias após a aplicação (Mitter et al., 2017a). É importante destacar que o LDH é biocompatível e se degrada com segurança na presença de condições levemente ácidas, minimizando o risco de persistência excessiva do dsRNA no ambiente (Fletcher et al., 2020).

Uma outra classe de nanopartículas, chamadas de pontos quânticos de carbono (*Carbon Quantum Dots*, CQD) ou nanopartículas de carbono, foi utilizada para entregar moléculas de siRNA em linhagens de tomate e *N. benthamiana* expressando GFP. A pulverização de siRNAs formulados com CQD e um surfactante de propagação resultou no silenciamento dos transgenes de GFP em ambas as espécies. A eficiência da formulação foi igualmente demonstrada para genes endógenos de *N. benthamiana* relacionados à síntese de clorofila, com o fenótipo de branqueamento das folhas indicando a redução no acúmulo do pigmento (Schwartz et al., 2020). Em estudos direcionados a pragas agrícolas, relatou-se uma maior estabilidade das moléculas de RNA associadas a nanopartículas de carbono e conseqüente aumento na eficácia do silenciamento (Edwards et al., 2020; Kaur et al., 2020).

A entrega de dsRNA através de lipossomos também tem sido explorada. Lipossomos são vesículas nanométricas esféricas constituídas principalmente por fosfolipídeos, onde uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais bicamadas lipídicas. Estas vesículas podem englobar ácidos nucleicos ou princípios ativos e os liberar nos sítios de ação sem danificá-los (Edwards & Baeumner, 2006). Por serem biodegradáveis e biocompatíveis, os lipossomos são altamente versáteis para pesquisas. Como exemplo, a encapsulação de dsRNAs em lipossomos melhorou a estabilidade das moléculas e sua captação em insetos (Whyard et al., 2009; Lin et al., 2017). Em *Euschistus heros*, uma importante praga da soja, os complexos de lipossomos aumentaram a mortalidade das ninfas que se alimentaram das formulações em comparação com o dsRNA puro (Castellanos et al., 2019).

É evidente que as formulações de duplexes de RNA com compostos ou materiais estabilizadores, como os lipossomos e nanopartículas mencionados aqui, podem ser facilmente expandidas para o controle de fitopatógenos. Sem dúvida, essas biotecnologias são importantes para garantir a integridade das moléculas, penetração nos tecidos vegetais, longevidade da resistência induzida e, principalmente, para viabilizar a estratégia de uso tópico em campo.

## 7. Controle de fitopatógenos por indução tópica de RNAi

Exemplos de estudos bem sucedidos envolvendo a indução tópica de RNAi para controle de patógenos vegetais estão listados na Tabela 1. Os fungos, com raras exceções, contêm os principais componentes das vias de silenciamento (DCL, AGO e RDR) e, portanto, possuem mecanismos ativos de RNAi (Dang et al., 2011). O uso tópico de duplexes de RNA interfere na infecção fúngica de diferentes maneiras, tais como: inibição do crescimento, redução da patogenicidade, alteração na morfologia ou resultando em sintomas mais leves da doença (Dubrovina & Kiselev, 2019). Atualmente, a estratégia de SIGS é considerada potente e promissora para proteção de plantas contra fungos (Wang & Jin, 2017). Após a aplicação, as moléculas de RNA na superfície das plantas podem seguir duas possíveis vias: (i) dsRNA/siRNA externos são primeiro internalizados nas células vegetais e, posteriormente, transferidos para células fúngicas, sendo que os dsRNAs são processados em siRNAs tanto por enzimas DCL da planta quanto DCLs do patógeno; e (ii) dsRNA/siRNA externos são diretamente absorvidos pelas células fúngicas, e os dsRNAs são clivados em siRNAs somente por enzimas DCL do patógeno (Koch et al., 2016; Wang et al., 2016; Wang & Jin, 2017; Song et al., 2018a). É possível, ainda, que as duas vias ocorram simultaneamente (Wang & Jin, 2017).

A aplicação tópica de duplexes de RNA demonstrou ser eficiente para o controle de diferentes espécies fúngicas (Tabela 1). Além do silenciamento de genes essenciais aos fungos, os RNAs também são utilizados para interferir na resistência dos patógenos a fungicidas. Moléculas de dsRNA direcionadas a regiões do gene *Myosin5* de *F. asiaticum*, por exemplo, reduziram a resistência ao fenamacril tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Após a pulverização de dsRNA mais o fungicida em plantas de trigo, observou-se o controle mais eficiente da infecção de uma estirpe do fungo resistente a fenamacril (Song et al., 2018b). De forma semelhante, o dsRNA derivado de outro gene de *F. asiaticum* ( *$\beta$ 2-tubulin*) aumentou a sensibilidade do fungo a carbendazim, podendo ser usado como um agente redutor da resistência a este fungicida (Gu et al., 2019).

Com relação às viroses, trabalhos recentes mostram que a aplicação de dsRNA e hpRNA induzem proteção contra diferentes vírus em várias espécies vegetais (Tabela 1). Tenllado & Díaz-Ruiz (2001) foram os pioneiros em demonstrar que o uso de moléculas de dsRNA aplicadas exogenamente em plantas pode protegê-las contra infecções virais. Konakalla et al. (2016) relataram que a coinoculação mecânica de TMV e dsRNAs derivados dos genes *p126* e *CP* conferiram resistência ao vírus em tabaco. Em

2018, Kaldis e colaboradores observaram a resistência a *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) em pepino, melancia e abóbora mediante aplicação de dsRNAs direcionados aos genes *HC-Pro* (do inglês, *helper component-proteinase*) e *CP* de ZYMV. Mais recentemente, foi publicado o primeiro estudo mostrando a eficiência do uso tópico de dsRNA para proteção de tomateiros contra um vírus com genoma de DNA, o *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Namgial et al., 2019); sendo que todos os trabalhos publicados anteriormente foram realizados com vírus de RNA. Os termos “vacinação baseada em RNA” e “vacinação de dsRNA” têm sido utilizados em estudos envolvendo o controle de viroses com aplicação de duplexes de RNA exógenos (Kaldis et al., 2018; Niehl et al., 2018; Konakalla et al., 2019; Namgial et al., 2019).

Trabalhos resumidos na Tabela 1 confirmam que o efeito antiviral da maquinaria de RNAi é sequência-específica, uma vez que a indução da proteção não foi observada quando RNAs não virais ou RNAs de vírus não-alvos foram utilizados (a exemplo de Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Worrall et al., 2019; Rêgo-Machado et al., 2020). Além disso, a eficiência da aplicação tópica pode ser dependente da dose e do tamanho das moléculas de duplex de RNA (Tenllado & Díaz-Ruiz, 2001; Rêgo-Machado et al., 2020).

Quanto ao uso da tecnologia de RNAi para controle de nematoides, a estratégia de HIGS foi bastante explorada e plantas transgênicas foram desenvolvidas apresentando resistência a diversas espécies, como *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus vulnus* (Huang et al., 2006; Steeves et al., 2006; Walawage et al., 2013; Banerjee et al., 2018; Kohli et al., 2018; Joshi et al., 2019). Contudo, até o momento, não há relatos sobre a aplicação tópica direta de duplexes de RNA em plantas contra nematoides. A interferência por RNA nestes fitopatógenos vem sendo analisada *in vitro* através da microinjeção, alimentação ou imersão em solução de dsRNA. Como exemplo, a ingestão de dsRNA homólogo a um gene essencial para o parasitismo de *M. incognita* levou à sua menor infectividade. A inoculação de raízes de *Arabidopsis* com espécimes de *M. incognita* em estágio J2 que ingeriram o dsRNA *in vitro* resultou na supressão do desenvolvimento dos nematoides e formação de galhas em menor número e tamanho (Huang et al., 2006). Em outra pesquisa, o silenciamento de um gene-alvo por imersão de *Radopholus similis* em solução de dsRNA inibiu significativamente a sua eclosão e desenvolvimento, além de ter reduzido a sua patogenicidade (Li et al., 2015b).

Por serem, em sua grande maioria, patógenos radiculares, a entrega de RNAs exógenos às plantas para controle de nematoides torna-se um desafio. De acordo com Dubelman e colaboradores (2014), é improvável a persistência e acúmulo de dsRNAs no solo, sendo rapidamente degradados. Em contrapartida, sabe-se que duplexes de RNA são absorvidos por raízes (Hunter et al., 2012; Li et al., 2015a). Logo, formulações de RNAs com compostos estabilizadores capazes de proteger as moléculas e torná-las mais estáveis podem ser administradas através de irrigação do solo como uma alternativa ao manejo de nematoides (Dalakouras et al., 2020).

No que se refere às fitobactérias, tratam-se de organismos procariotos e, portanto, não possuem a maquinaria de RNAi. Entretanto, existem exemplos de sequências bacterianas antisense *trans* e *cis* que hibridizam com RNAs mensageiros e inibem a expressão dos genes-alvos de diferentes maneiras, principalmente por repressão da

tradução (Thomason & Storz, 2010; Georg & Hess, 2011; Good & Stach, 2011); um mecanismo de regulação gênica semelhante ao RNAi. Como uma alternativa para o controle de bactérias, a aplicação exógena de RNAs antisensos pode ser utilizada, embora essas moléculas de fita simples sejam mais suscetíveis a nucleases das plantas e, por isso, precisem de formulações adicionais (Dalakouras et al., 2020). Além disso, é possível realizar o manejo destes fitopatógenos usando estratégias indiretas baseadas em RNAi, como a aplicação de dsRNAs direcionados a insetos que são vetores de bactérias ou dsRNAs homólogos aos genes da planta hospedeira que são essenciais para a aderência, entrada nas células e replicação bacteriana.

## 8. Perspectivas e desafios

A maior parte das ferramentas de manejo fitossanitário visa a proteção de plantas tendo como base o combate às pragas e fitopatógenos. A abordagem explorada neste capítulo, por outro lado, aposta na indução e potencialização da resposta de defesa natural das plantas. Enquanto a agricultura caminhou no passado para a seleção de cultivares com grande produtividade e respostas positivas à adição de insumos agrícolas, como fertilizantes, percebe-se que houve uma tendência à seleção de plantas com baixa imunidade a fitopatógenos em geral. Ainda conhecemos pouco sobre a fisiologia das plantas, principalmente com relação às respostas aos estresses bióticos, mas sabemos da importância da interação entre elas e tudo que as cercam. A aplicação tópica de duplexes de RNA em plantas não resistentes a uma doença, desencadeando uma resposta natural e efetiva de proteção contra o patógeno, pode se tornar uma realidade em campo.

Será possível gerar uma planta resistente a todas as doenças? Difícil, por causa do custo energético para as células e a provável baixa eficiência para múltiplos alvos; mas certamente será possível proteger contra aquele patógeno mais frequente e mais devastador. Para tanto, é preciso aprofundar no conhecimento da relação patógeno-hospedeiro frente aos duplexes de RNA, como por exemplo, detalhes sobre: (i) melhor forma de entrega das moléculas; (ii) transporte, processamento e estabilidade das moléculas; (iii) velocidade de resposta; (iv) durabilidade da proteção; (v) especificidade; e (vi) sensibilidade. Além disso, é necessário selecionar genes-alvos efetivos e avançar nos estudos de síntese dos duplexes de RNA. Outro ponto importante é o custo da aplicação em campo, que precisa ser acessível ao produtor. Finalmente, é preciso regulamentar a comercialização e o uso tópico dos duplexes de RNA, que provavelmente não deverão ser categorizados como afins de agrotóxico e nem como transgênicos. Acreditamos que vale a pena o investimento nesta estratégia. O futuro nos dirá se, de fato, ela será consolidada como uma potente ferramenta de combate aos fitopatógenos.

**Tabela 1.** Estudos envolvendo a aplicação tópica de duplexes de RNA em plantas para o controle de fungos e vírus fitopatogênicos.

Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
<b>Fungos Fitopatogênicos</b>					
<i>Fusarium graminearum</i> (CYP51A, CYP51B, e CYP51C)	dsRNA e siRNA	Pulverização	Cevada	Redução do crescimento fúngico; sintomas mais leves; supressão dos transcritos alvos	Koch et al. (2016)
<i>Botrytis cinerea</i> (DCL1 e DCL2)	dsRNA e siRNA	Aplicação direta* e pulverização	Tomate, morango, uva, alface, cebola, rosa e <i>Arabidopsis</i>	Redução do crescimento fúngico; sintomas mais leves; supressão dos transcritos alvos	Wang et al. (2016)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (59 genes) <i>Botrytis cinerea</i> (5 genes homólogos)	dsRNA	Aplicação direta* + Silwet L-77	Canola e <i>Arabidopsis</i>	Redução da infecção por <i>S. sclerotiorum</i> e <i>B. cinerea</i> ; sintomas mais leves	McLoughlin et al. (2018)
<i>Fusarium asiaticum</i> (Myo5)	dsRNA	Pulverização	Trigo	Redução da patogenicidade e resistência ao fungicida fenamacril; supressão do transcrito alvo	Song et al. (2018b)
<i>Fusarium asiaticum</i> ( $\beta_2$ -tubulin)	dsRNA	Pulverização	Pepino, soja, cevada, trigo	Atividade antifúngica de amplo espectro contra <i>F. asiaticum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> e <i>Colletotrichum truncatum</i> ; sintomas mais leves; redução da resistência de <i>F. asiaticum</i> ao fungicida carbendazim	Gu et al. (2019)
<b>Vírus Fitopatogênicos<sup>†</sup></b>					
PMMoV (RP) TEV (HC) AMV (RNA3)	dsRNA	Mecânico	<i>N. benthamiana</i> , tabaco e pimenta	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); ausência de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis; sintomas sistêmicos ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Tenllado & Díaz-Ruiz (2001)
PMMoV (RP) PPV (HC e CP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	<i>N. benthamiana</i> e tabaco	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); ausência de lesões locais em hospedeira hipersensível; sintomas sistêmicos ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Tenllado et al. (2003)



Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
TMV (CP)	dsRNA e hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral; sintomas ausentes ou mais leves	Yin et al. (2009)
SCMV (CP)	hpRNA	Pulverização	Milho	Redução na incidência da doença; sintomas ausentes ou mais leves	Gan et al. (2010)
PVY (Nlb)	hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral; sintomas ausentes ou mais leves	Sun et al. (2010a)
PVY (HC-Pro, Nlb e CP) TMV (RP, MP e CP)	hpRNA	Mecânico	Tabaco	Redução dos títulos virais (vírus não detectados); sintomas ausentes ou mais leves	Sun et al. (2010b)
CymMV (CP)	dsRNA e ssRNA	Mecânico	Orquídea	Supressão do transcrito alvo; sintomas ausentes ou mais leves	Lau et al. (2014)
PSbMV (CP)	dsRNA	Bombardeamento	Ervilha	Redução do título viral; sintomas mais leves	Safarova et al. (2014)
PRSV (CP)	hpRNA	Mecânico	Mamão	Redução do título viral; sintomas ausentes ou desenvolvidos tardiamente	Shen et al. (2014)
TMV (p126 e CP)	dsRNA	Mecânico	Tabaco	Redução do título viral e incidência da doença; sintomas desenvolvidos tardiamente; aumento na biomassa das plantas	Konakalla et al. (2016)
PMMoV (RP) CMV (2b)	hpRNA**	Pulverização	Tabaco e feijão-caupi	Redução do título viral (vírus não detectado); menor porcentagem de infecção em curto e longo prazos; redução no número de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis	Mitter et al. (2017a)
ZYMV (HC-Pro e CP)	dsRNA	Mecânico	Pepino, melancia e abóbora	Redução do título viral (vírus não detectado) e incidência da doença; sintomas ausentes	Kaldis et al. (2018)
TMV (RP e rep-MP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	<i>N. benthamiana</i>	Redução da disseminação viral local e sistêmica; alterações nos sintomas	Niehl et al. (2018)
SeMV (CP e MP)	dsRNA	Mecânico	<i>Sesbania grandiflora</i>	Redução do título viral e incidência da doença; sintomas desenvolvidos tardiamente	Konakalla et al. (2019)

Patógeno e (Gene) Alvos	Duplex de RNA	Método de Aplicação	Planta Hospedeira	Efeito	Referência
ToLCV (AC1/AC4 e AV1/AV2) CMV(2b)	dsRNA	Mecânico	Tomate e tabaco	Redução do título viral (vírus não detectado) e incidência das doenças; sintomas ausentes	Namgial et al. (2019)
BCMV (Nib e CP)	dsRNA**	Pulverização	<i>N. benthamiana</i> e feijão-caupi	Redução do título viral (vírus não detectado) e da porcentagem de infecção	Worrall et al. (2019)
PRSV (CP e HC-Pro)	dsRNA	Mecânico	Mamão	Redução do título viral (vírus não detectado); sintomas ausentes ou mais leves	Vadlamudi et al. (2020)
ToMV (CP e MP) PVY (CP)	dsRNA	Mecânico e pulverização	Tomate, tabaco e <i>Chenopodium quinoa</i>	Redução dos títulos virais (vírus não detectados) e das taxas de infecção; menor número de lesões locais em hospedeiras hipersensíveis; sintomas ausentes ou mais leves; melhor desenvolvimento das plantas	Rêgo-Machado et al. (2020)

† *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Plum pox virus* (PPV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Potato virus Y* (PVY), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Sesbania mosaic virus* (SeMV), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), *Bean common mosaic virus* (BCMV) e *Tomato mosaic virus* (ToMV).

\*Entrega direta das moléculas na superfície da planta (sem mais especificações).

\*\* Moléculas puras ou carregadas em nanopartículas de argila com dupla camada de hidróxido (BioClay).

## 9. Referências bibliográficas

- AALTO, A.P. et al. Large-scale production of dsRNA and siRNA pools for RNA interference utilizing bacteriophage  $\phi 6$  RNA-dependent RNA polymerase. **Rna**, v. 13, p. 422-429, 2007.
- ANDRADE, E.C.; HUNTER, W.B. **RNA interference – Natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC)**. Ed. Abdurakhmonov, I. Y. (Croatia IntechOpen), p. 391-409, 2016.
- ARAGÃO, F.J.L.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; TINOCO, M.L.P.; FARIA, J.C. 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.
- AXTELL, M.J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 5.1-5.23, 2013.
- BALDRICH, P. et al. Plant extracellular vesicles contain diverse small RNA species and are enriched in 10 to 17 nucleotide “tiny” RNAs. **The Plant Cell**, v. 31, p. 315-324, 2019.
- BANERJEE, S. et al. Host delivered RNAi of two cuticle collagen genes, *Mi-col-1* and *Lemmi-5* hampers structure and fecundity in *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2266, 2018.

- BARTOSZEWSKI, R.; SIKORSKI, A.F. Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 24, p. 1-23, 2019.
- BAUMBERGER, N.; BAULCOMBE, D.C. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 11928-11933, 2005.
- BORGES, F.; MARTIENSSEN, R.A. The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 727-741, 2015.
- BRAASCH, D.A. et al. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. **Biochemistry**, v. 42, p. 7967-7975, 2003.
- CAGLIARI, D. et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1319, 2019.
- CAI, Q. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. **Science**, v. 360, p. 1126-1129, 2018.
- CARMELL, M.A.; HANNON, G.J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, p. 214-218, 2004.
- CASTELLANOS, N.L.; SMAGGHE, G.; SHARMA, R.; OLIVEIRA, E.E.; CHRISTIAENS, O. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. **Pest Management Science**, v. 75, p. 537-548, 2019.
- CHURIKOV, N.A.; CHISTIAKOVA, L.G.; ZAVIL'GEL'SKIĬ, G.B.; MANUKHOV, I.V. RNA interference in *Escherichia coli* cells: the expression of molecules that are complementary to the lon gene mRNA in parallel orientation. **Genetika**, v. 36, p. 23-27, 2000.
- COGONI, C. et al. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 3153-3163, 1996.
- CUNNINGHAM, F.J.; GOH, N.S.; DEMIRER, G.S.; MATOS, J.L.; LANDRY, M.P. Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 36, p. 882-897, 2018.
- DALAKOURAS, A. et al. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1253, 2018.
- DALAKOURAS, A. et al. Genetically modified organism-free RNA interference: exogenous application of RNA molecules in plants. **Plant Physiology**, v. 182, p. 38-50, 2020.
- DALAKOURAS, A. et al. Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of in vitro-synthesized small RNAs. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1327, 2016.
- DALMAY, T.; HAMILTON, A.; RUDD, S.; ANGELL, S.; BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. **Cell**, v. 101, p. 543-553, 2000.
- DANG, Y.; YANG, Q.; XUE, Z.; LIU, Y. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1148-1155, 2011.
- DING, B.; ITAYA, A.; ZHONG, X. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 606-612, 2005.
- DONG, Y.; SIEGWART, D.J.; ANDERSON, D.G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 144, p. 133-147, 2019.

- DUBELMAN, S. et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. **PLoS ONE**, v. 9, p. e93155, 2014.
- DUBROVINA, A.S.; KISELEV, K.V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 2282, 2019.
- DUNOYER, P. et al. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. **Science**, v. 328, p. 912-916, 2010.
- EDWARDS, C. H. et al. Dendrimer-coated carbon nanotubes deliver dsRNA and increase the efficacy of gene knockdown in the red four beetle *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 10, p. 12422, 2020.
- EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p. 1421-1431, 2006.
- ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, p. 494-498, 2001.
- FERNANDEZ-CALVINO, L. et al. *Arabidopsis* plasmodesmal proteome. **PLoS ONE**, v. 6, p. e18880, 2011.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FLETCHER, S.J.; REEVES, P.T.; HOANG, B.T.; MITTER, N. A perspective on RNAi-based biopesticides. **Frontiers in Plant Science**, v. 11 p. 51, 2020.
- GAN, D.; ZHANG, J.; JIANG, H.; JIANG, T.; ZHU, S.; CHENG, B. Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 1261-1268, 2010.
- GATTA, A.K.; HARIHARAPURA, R.C.; UDUPA, N.; REDDY, M.S.; JOSYULA, V.R. Strategies for improving the specificity of siRNAs for enhanced therapeutic potential. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, p. 709-725, 2018.
- GEORG, J.; HESS, W.R. *cis*-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, p. 286-300, 2011.
- GHAG, S.B. Host induced gene silencing, an emerging science to engineer crop resistance against harmful plant pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 100, p. 242-254, 2017.
- GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 94-108, 2009.
- GHOSAL, A. et al. The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. **Microbiologyopen**, v. 4, p. 252-266, 2015.
- GHOSH, S.K.B.; HUNTER, W.B.; PARK, A.L.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Double strand RNA delivery system for plant-sap-feeding insects. **PLoS One**, v. 12, p. e0171861, 2017.
- GOGOI, A.; SARMAH, N.; KALDIS, A.; PERDIKIS, D.; VOLOUDAKIS, A. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves. **Planta**, v. 246, p. 1233-1241, 2017.
- GONSALVES, D. Coat protein transgenic papaya: “acquired” immunity for controlling *Papaya ringspot virus*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 266, p. 73-83, 2002.
- GONSALVES, D. Transgenic papaya: development, release, impact and challenges. **Advances in Virus Research**, v. 67, p. 317-354, 2006.
- GOOD, L.; STACH, J.E.M. Synthetic RNA silencing in bacteria – antimicrobial discovery and resistance breaking. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 185, 2011.

- GOODFELLOW, S.; ZHANG, D.; WANG, M.B.; ZHANG, R. Bacterium-mediated RNA interference: potential application in plant protection. **Plants**, v. 8, p. 572, 2019.
- GU, K. X. et al. A  $\beta$ -*tubulin* dsRNA derived from *Fusarium asiaticum* confers plant resistance to multiple phytopathogens and reduces fungicide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 36-46, 2019.
- GULERIA, P.; MAHAJAN, M.; BHARDWAJ, J.; YADAV, S.K. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 9, p. 183-199, 2011.
- GUO, S.; KEMPHUES, K.J. *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. **Cell**, v. 81, p. 611-620, 1995.
- HAJERI, S.; KILLINY, N.; EL-MOHTAR, C.; DAWSON, W.O.; GOWDA, S. *Citrus tristeza virus*-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease (Huanglongbing). **Journal of Biotechnology**, v. 176, p. 42-49, 2014.
- HAM, B. K. et al. A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. **The Plant Cell**, v. 21, p. 197-215, 2009.
- HEINLEIN, M.; EPEL, B.L. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. **International Review of Cytology**, v. 235, p. 93-164, 2004.
- HOHN, T.; VAZQUEZ, F. RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, p. 588-600, 2011.
- HOLEN, T.; AMARZGUIOUI, M.; WIIGER, M.T.; BABAIE, E.; PRYDZ, H. Os efeitos posicionais de pequenos RNAs de interferência direcionados ao fator de tecido desencadeador da coagulação humana. **Pesquisa de Ácidos Nucleicos**, v. 30, p. 1757-1766, 2002.
- HONE, D. **Recombinant double-stranded RNA phage, and use of the same**. U.S. Patent n. 7, 569, 219, 2009.
- HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **PNAS USA**, v. 103, p. 14302-14306, 2006.
- HUANG, L. et al. Efficient and specific gene knockdown by small interfering RNAs produced in bacteria. **Nature biotechnology**, v. 31, p. 350-356, 2013.
- HUNTER, W.B.; GLICK, E.; PALDI, N.; BEXTINE, B.R. Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. **Southwestern Entomologist**, v. 37, p. 85-87, 2012.
- JACKSON, A. L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 635-637, 2003.
- JACOBSEN, S.E.; RUNNING, M.P.; MEYEROWITZ, E.M. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. **Development**, v. 126, p. 5231-5243, 1999.
- JIANG, L. et al. Systemic gene silencing in plants triggered by fluorescent nanoparticle-delivered double-stranded RNA. **Nanoscale**, v. 6, p. 9965-9969, 2014.
- JOGA, M.R.; ZOTTI, M.J.; SMAGGHE, G.; CHRISTIAENS, O. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 553, 2016.



- JOSHI, I. et al. Development of nematode resistance in *Arabidopsis* by HD-RNAi-mediated silencing of the effector gene *Mi-msp2*. **Scientific Reports**, v. 9, p. 17404, 2019.
- KALDIS, A. et al. Exogenously applied dsRNA molecules deriving from the *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) genome move systemically and protect cucurbits against ZYMV. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 883-895, 2018.
- KAUR, A.; KUMAR, A.; REDDY, M.S. RNA Interference (RNAi) and its role in crop improvement: a review. In: **Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement**. p. 379-394, 2016.
- KAUR, R.; GUPTA, M.; SINGH, S.; JOSHI, N.; SHARMA, A. Enhancing RNAi efficiency to decipher the functional response of potential genes in *Bemisia tabaci* AsiaII-1 (Gennadius) through dsRNA feeding assays. **Frontiers Physiology**, v. 11, p. 123, 2020.
- KAWAMATA, T.; TOMARI, Y. Making risc. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, p. 368-376, 2010.
- KEATES, A.C.; FRUEHAUF, J.; XIANG, S.; LI, C.J. TransKingdom RNA interference: a bacterial approach to challenges in RNAi therapy and delivery. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 25, p. 113-128, 2008.
- KEHR, J.; KRAGLER, F. Long distance RNA movement. **New Phytologist**, v. 218, p. 29-40, 2018.
- KETTING, R.F. The many faces of RNAi. **Developmental cell**, v. 20, p. 148-161, 2011.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, p. 209-216, 2003.
- KITAGAWA, M.; JACKSON, D. Plasmodesmata-mediated cell-to-cell communication in the shoot apical meristem: how stem cells talk. **Plants**, v. 6, p. 12, 2017.
- KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, p. 71-81, 2016.
- KOCH, A. et al. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. **PLoS Pathogens**, v. 12, p. e1005901, 2016.
- KOCH, A.; KOGEL, K.H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 821-831, 2014.
- KOHLI, D. et al. Host-mediated RNAi of a Notch-like receptor gene in *Meloidogyne incognita* induces nematode resistance. **Parasitology**, v. 145, p. 1896-1906, 2018.
- KONAKALLA, N.C.; KALDIS, A.; BERBATI, M.; MASARAPU, H.; VOLOUDAKIS, A.E. Exogenous application of double-stranded RNA molecules from TMV p126 and CP genes confers resistance against TMV in tobacco. **Planta**, v. 244, p. 961-969, 2016.
- KONAKALLA, N.C.; KALDIS, A.; MASARAPU, H.; VOLOUDAKIS, A.E. Topical application of double stranded RNA molecules deriving from *Sesbania mosaic virus* (SeMV) CP and MP genes protects Sesbania plants against SeMV. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 1345-1352, 2019.
- KUMAR, P.; PANDIT, S.S.; BALDWIN, I.T. *Tobacco rattle virus* vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. **PLoS One**, v. 7, p. e31347, 2012.
- KUNG, Y. et al. Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9804, 2015.
- KWAK, P. B.; TOMARI, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, p. 145, 2012.

- LAU, S.E. et al. Crude extracts of bacterially-expressed dsRNA protect orchid plants against *Cymbidium mosaic virus* during transplantation from *in vitro* culture. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, p. 569-576, 2014.
- LEE, J. Y. et al. Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. **The Plant Cell**, v. 17, p. 2817-2831, 2005.
- LI, H.; GUAN, R.; GUO, H.; MIAO, X. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, p. 2277-2285, 2015a.
- LI, Y. et al. Cathepsin B cysteine proteinase is essential for the development and pathogenesis of the plant parasitic nematode *Radopholus similis*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 1073-1087, 2015b.
- LIN, Y.H.; HUANG, J.H.; LIU, Y.; BELLES, X.; LEE, H.J. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. **Pest Management Science**, v. 73, p. 960-966, 2017.
- LINDBO, J.A.; DOUGHERTY, W.G. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. **Virology**, v. 189, p. 725-733, 1992.
- LINDBO, J.A.; SILVA-ROSALES, L.; PROEBSTING, W.M.; DOUGHERTY, W.G. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1749-1759, 1993.
- LIU, H. et al. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2552, 2017.
- LIU, J. et al. Hannon Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, p. 1437-1441, 2004.
- MAIZEL, A.; MARKMANN, K.; TIMMERMANS, M.; WACHTER, A. To move or not to move: roles and specificity of plant RNA mobility. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 57, p. 52-60, 2020.
- MANTELIN, S. et al. The receptor-like kinase SlSERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato. **The Plant Journal**, v. 67, p. 459-471, 2011.
- MAO, Z. et al. The new *CaSn* gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. **Phytoparasitica**, v. 39, p. 151-164, 2011.
- MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2442-2450, 2006.
- MATZKE, M.A.; PRIMIG, M.; TRNOVSKY, J.; MATZKE, A.J.M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. **The EMBO Journal**, v. 8, p. 643-649, 1989.
- McLOUGHLIN, A.G. et al. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 7320, 2018.
- MELNYK, C.W.; MOLNAR, A.; BAULCOMBE, D.C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. **The EMBO Journal**, v. 30, p. 3553-3563, 2011.
- MERMIGKA, G.; VERRET, F.; KALANTIDIS, K. RNA silencing movement in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, p. 328-342, 2016.
- MICURA, R. Small interfering RNAs and their chemical synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2265-2269, 2002.

- MITTER, N. et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. **Nature Plants**, v. 3, p. 16207, 2017a.
- MITTER, N.; WORRALL, E.A.; ROBINSON, K.E.; XU, Z.P.; CARROLL, B.J. Induction of virus resistance by exogenous application of double-stranded RNA. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 49-55, 2017b.
- MOGREN, C.L.; LUNDGREN, J.G. In silico identification of off-target pesticidal dsRNA binding in honey bees (*Apis mellifera*). **PeerJ**, v. 5, p. e4131, 2017.
- MONTGOMERY, M.K.; XU, S.; FIRE, A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 15502-15507, 1998.
- MOROZOV, S.Y.; SOLOVYEV, A.G.; KALININA, N.O.; TALIANSKY, M.E. Double-stranded RNAs in plant protection against pathogenic organisms and viruses in agriculture. **Acta Naturae**, v. 11, p. 13-21, 2019.
- MORRIS, K.V.; CHAN, S.W.; JACOBSEN, S.E.; LOONEY, D.J. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. **Science**. v. 305, p. 1289-1292, 2004.
- NAMGIAL, T.; KALDIS, A.; CHAKRABORTY, S.; VOLOUDAKIS, A. Topical application of double-stranded RNA molecules containing sequences of *Tomato leaf curl virus* and *Cucumber mosaic virus* confers protection against the cognate viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 108, p. 101432, 2019.
- NANDETY, R.S.; KUO, Y.W.; NOURI, S.; FALK, B.W. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. **Bioengineered**, v. 6, p. 8-19, 2015.
- 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.
- NELSON, R. International plant pathology: past and future contributions to global food security. **Phytopathology**, v. 110, p. 245-253, 2020.
- NIEHL, A.; SOININEN, M.; PORANEN, M.M.; HEINLEIN, M. Synthetic biology approach for plant protection using dsRNA. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, p. 1679-1687, 2018.
- NUMATA, K.; OHTANI, M.; YOSHIZUMI, T.; DEMURA, T.; KODAMA, Y. Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 1027-1034, 2014.
- OERKE, E.C. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 31-43, 2006.
- PALAUQUI, J.C.; ELMAYAN, T.; POLLIEN, J.M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 4738-4745, 1997.
- PALLI, S.R. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. **Current Opinion in Insect Science**, v. 6, p.1-8, 2014.
- PARENT, J.S., MARTINEZ, A.A.E.; VAUCHERET, H. The origin and effect of small RNA signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p.179, 2012.
- PARKER, J.S. How to slice: snapshots of Argonaute in action. **Silence**, v. 1, p. 3, 2010.
- PHAM, J.W.; PELLINO, J.L.; LEE, Y.S.; CARTHEW, R.W.; SONTHEIMER, E.J.A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. **Cell**, v. 117, p. 83-94, 2004.
- POPEK, S.; HALAGARDA, M. Genetically modified foods: consumer awareness, opinions and attitudes in selected EU countries. **International Journal of Consumer Studies**, v. 41, p. 325-332, 2017.

- RÊGO-MACHADO, C. M. et al. siRNA biogenesis and advances in topically applied dsRNA for controlling virus infections in tomato plants. **Scientific Reports**, v. 10, p. 22277, 2020.
- ROBERTSON, H.D.; WEBSTER, R.E.; ZINDER, N.D. Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 82-91, 1968.
- ROMANO, N.; MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 3343-3353, 1992.
- ROSA, C.; KUO, Y.W.; WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 581-610, 2018.
- ROSAS-DIAZ, T. et al. A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. **PNAS USA**, v. 115, p. 1388-1393, 2018.
- RUIZ, M.T.; VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. **Plant Cell**, v. 10, p. 937-946, 1998.
- SAFAROVA, D.; BRAZDA, P.; NAVRATIL, M. Effect of artificial dsRNA on infection of pea plants by *Pea seed-borne mosaic virus*. **Czech Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 50, p. 105-108, 2014.
- SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. 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.
- SAVARY, S. et al.. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 430-439, 2019.
- SCHAUER, S.E.; JACOBSEN, S.E.; MEINKE, D.W.; RAY, A. DICER-LIKE1: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 487-491, 2002.
- SCHWARZ, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, p. 199-208, 2003.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K.S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 656-665, 2011.
- SHEN, W. et al. Resistance of non-transgenic papaya plants to *Papaya ringspot virus* (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. **Acta Virologica**, v. 58, p. 261-266, 2014.
- SOHAIL, M.; DORAN, G.; RIEDEMANN, J.; MACAULAY, V.; SOUTHERN, E.M. A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 38-38, 2003.
- SONG, J.J.; SMITH, S.K.; HANNON, G.J.; JOSHUA-TOR, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, v. 305, p. 1434-1437, 2004.
- SONG, X. S. et al. Secondary amplification of siRNA machinery limits the application of spray-induced gene silencing. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 2543-2560, 2018a.
- SONG, X. S. et al. A *myosin5* dsRNA that reduces the fungicide resistance and pathogenicity of *Fusarium asiaticum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 1-9, 2018b.
- STEEVES, R.M.; TODD, T.C.; ESSIG, J.S.; TRICK, H.N. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 991-999, 2006.
- STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 83-116, 2005.



- SUN, Z.N.; SONG, Y.Z.; YIN, G.H.; ZHU, C.X.; WEN, F.J. HpRNAs derived from different regions of the *Nlb* gene have different abilities to protect tobacco from infection with *Potato virus Y*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 566-568, 2010a.
- SUN, Z. N. et al. Bacterially expressed double-stranded RNAs against hotspot sequences of tobacco mosaic virus or potato virus Y genome have different ability to protect tobacco from viral infection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1901-1914, 2010b.
- TANING, C. N. T. et al. Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 805, 2018.
- TENLLADO, F.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. **Journal of Virology**, v. 75, p. 12288-12297, 2001.
- TENLLADO, F.; MARTÍNEZ-GARCÍA, B.; VARGAS, M.; DÍAZ-RUÍZ, J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. **BMC Biotechnology**, v. 3, p. 3, 2003.
- THOMASON, M.K.; STORZ, G. Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 167-188, 2010.
- UNNAMALAI, N.; KANG, B.G.; LEE, W.S. Cationic oligopeptide-mediated delivery of dsRNA for post-transcriptional gene silencing in plant cells. **FEBS Letters**, v. 566, p. 307-310, 2004.
- VADLAMUDI, T. et al. DsRNA-mediated protection against two isolates of *Papaya ringspot virus* through topical application of dsRNA in papaya. **Journal of Virological Methods**, v. 275, p. 113750, 2020.
- VAN BLOKLAND, R.; VAN D. G.N.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. **The Plant Journal**, v. 6, p. 861-877, 1994.
- VAN DER LINDE, K.; KASTNER, C.; KUMLEHN, J.; KAHMANN, R.; DOEHLEMANN, G. Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with *Ustilago maydis*. **New Phytologist**, v. 189, p. 471-483, 2011.
- VATANPARAST, M.; KIM, Y. Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. **PLoS One**, v. 12, p. e0183054, 2017.
- VAZQUEZ, F.; HOHN, T. Biogenesis and biological activity of secondary siRNAs in plants. **Scientifica**, v. 2013, p. 1-12, 2013.
- VOINNET, O. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 317-328, 2008.
- VOINNET, O.; BAULCOMBE, D.C. Systemic signalling in gene silencing. **Nature**, v. 389, p. 553-553, 1997.
- WALAWAGE, S. L. et al. Stacking resistance to crown gall and nematodes in walnut rootstocks. **BMC Genomics**, v. 14, p. 668, 2013.
- WANG, H.L.; CHEKANOVA, J.A. Small RNAs: essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA**, v. 7, p. 356-381, 2016.
- WANG, H. W. et al. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, p. 1148, 2009.
- WANG, M.; DEAN, R.A. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, p. 589-601, 2020.



- WANG, M.; JIN, H. Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 4-6, 2017.
- WANG, M. et al.. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. **Nature Plants**, v. 2, p. 16151, 2016.
- WANG, X. B. et al. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **PNAS USA**, v. 107, p. 484-489, 2010.
- WANG, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. **Nature**, v. 461, p. 754-761, 2009.
- WANI, S.H.; SANGHERA, G.S.; SINGH, N.B. Biotechnology and plant disease control-role of RNA interference. **American Journal of Plant Sciences**, v. 1, p. 55-68, 2010.
- WATSON, J.M.; FUSARO, A.F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P.M. RNA silencing platforms in plants. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5982-5987, 2005.
- WATTS, J.K.; DELEAVEY, G.F.; DAMHA, M.J. Chemically modified siRNA: tools and applications. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 842-855, 2008.
- WHYARD, S.; SINGH, A.D.; WONG, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 824-832, 2009.
- WORRALL, E. A. et al. Exogenous application of RNAi-inducing double-stranded RNA inhibits aphid-mediated transmission of a plant virus. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 265, 2019.
- WURIYANGHAN, H.; FALK, B.W. RNA Interference towards the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant *Tobacco mosaic virus* (TMV). **PLoS One**, v. 8, p. e66050, 2013.
- XIANG, S. et al. *In vitro* and *in vivo* gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). In: **siRNA and miRNA Gene Silencing**. Humana Press, v. 487, p. 1-14, 2009.
- YAO, M.C.; FULLER, P.; XI, X. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. **Science**, v. 300, p. 1581-1584, 2003.
- YIN, G. et al. Production of double-stranded RNA for interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 323-333, 2009.
- ZHANG, H. et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. **PNAS USA**, v. 116, p. 7543-7548, 2019.
- ZHANG, W. et al. tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. **The Plant Cell**, v. 28, p. 1237-1249, 2016.
- ZHANG, X. et al. Mini review: revisiting mobile RNA silencing in plants. **Plant Science**, v. 278, p.113-117, 2019.
- ZHANG, Z. J. Artificial trans-acting small interfering RNA: a tool for plant biology study and crop improvements. **Planta**, v. 239, p. 1139-1146, 2014.
- ZOTTI, M. et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, p. 1239-1250, 2018.

Lidiane L. Barbosa Amorim

Alessandro Nicoli

José Ribamar Costa Ferreira-Neto

José Diogo Cavalcanti Ferreira

Artemisa Nazare Costa Borges

Carolline de Jesús-Pires

Flávia Czekalski de Araújo

Mitalle Karen da Silva Matos

Wilson Dias de Oliveira

Antonio Félix da Costa

Ana M. Benko-Iseppon

## Resumo

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp., subsp. *unguiculata*] compreende a principal fonte de proteína vegetal de várias regiões tropicais de clima semiárido, incluindo o Nordeste brasileiro. Representa fonte proteica de considerável importância para a nutrição humana em regiões semiáridas e tropicais do planeta. Vários fatores afetam a produtividade do feijão-caupi, incluindo a incidência de doenças infecciosas. Dentre essas, doenças causadas por vírus têm sido responsáveis por prejuízos e perdas significativas na produção agrícola. No Brasil, as doenças virais figuram entre os problemas sanitários mais importantes do feijão-caupi, com ênfase para a região Nordeste. O presente capítulo aborda e revisa diferentes aspectos das pesquisas envolvendo viroses e feijão-caupi, com ênfase para as principais viroses identificadas, recursos genéticos testados e fontes de resistência identificadas. A aplicação de marcadores moleculares em associação com viroses merece destaque, especialmente no tópico mapeamento genético. Finalmente, o estado da arte envolvendo ciências ômicas e biotecnologia é reportado, bem como os cenários futuros envolvendo tais abordagens.

**Palavras-chave:** Cowpea severe mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus, Potyviridae, Bromoviridae, Herança, Biotecnologia.

## 1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão-macassar, feijão-de-corda, feijão-da-colônia, feijão-da-praia, feijão-miúdo e feijão-fradinho

(dentre vários outros nomes populares), pertence à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae. É originário da África e seu cultivo apresenta ampla distribuição, principalmente em regiões tropicais (Freire Filho et al., 2011). Trata-se de uma espécie muito importante em partes dos Estados Unidos, América do Sul e Central, Caribe, Índia e Austrália (Appiah et al., 2011). No Brasil, compreende a principal fonte de proteínas, vitaminas e minerais na alimentação das populações das regiões Norte e Nordeste, gerando também empregos e renda, tanto na zona rural quanto na urbana (Lima et al., 2007).

A área mundial colhida e a produção do feijão-caupi em 2017 foi de 12.577,845 hectares e 7.407,924 toneladas, respectivamente (FAOSTAT, 2017). Chamarthi et al. (2019) apontam um rendimento global de 6,5 milhões de toneladas por ano em cerca de 14,5 milhões de hectares, mas sua produtividade ainda é baixa, em torno de 472,66 kg/ha. Aproximadamente 83% da produção é obtida no continente africano, sendo que 80% provém da África Ocidental. O maior produtor e consumidor mundial é a Nigéria (45% da produção), seguida pelo Níger (15%), Brasil (12%) e Burkina Faso (5%).

No Brasil, seu cultivo chega a aproximadamente 1,1 milhão de hectares, com produção média anual de 500 a 600 mil toneladas, sendo as regiões Norte e Nordeste responsáveis por cerca de 90% da área cultivada total (CONAB, 2020; Santos et al., 2017). As grandes perdas na produção e no rendimento do feijão-caupi são decorrentes de estresses abióticos (especialmente seca e salinidade) ou bióticos, nesse caso devido a doenças causadas por patógenos como vírus, bactérias, fungos e nematoides (Horn et al., 2015).

Vírus fitopatogênicos não possuem estrutura celular, não crescem em meios de cultura artificiais e são considerados parasitas obrigatórios, pois se replicam exclusivamente em células vivas (Eiras et al., 2018). É justamente devido a esse parasitismo obrigatório que ocorre a dificuldade de controlar doenças virais. Para inativar os processos virais, obrigatoriamente o metabolismo celular da planta deverá ser cessado e, por isso, ainda não existem produtos fitossanitários eficientes no controle de viroses (Dianese & Medeiros, 2015).

De acordo com a classificação proposta pelo biólogo americano David Baltimore, levando-se em consideração o tipo de ácido nucléico e a estratégia de replicação viral, seis classes são encontradas em vírus de plantas: (i) RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva, como, por exemplo, os membros das famílias *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Potyviridae*, *Tymoviridae* e *Virgaviridae*; (ii) ssRNA de polaridade negativa – *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*) (Eiras et al., 2018).

Vírus fitopatogênicos podem ser disseminados na natureza por diferentes organismos vetores, como insetos, ácaros, nematoides, fungos e protozoários. Dentre os insetos, os vetores em geral são sugadores, como afídeos (*Aphis craccivora*, *A. citricola*, *A. fabae* e *Myzus persicae*), cigarrinhas, membracídeos, cochonilhas, tripes e moscas-brancas (*Bemisia tabaci*), mas há mastigadores, como besouros (*Cerotoma ruficornis*, *C. trifurcata*, *Diabrotica balteata*) (Kitajima & Rezende, 2004).

Como antivirais eficientes não estão disponíveis, as estratégias de controle contam com a resistência genética e medidas fitossanitárias, tais como a obtenção e utilização de material propagativo livre de vírus, uso de sementes sadias, eliminação de plantas hospedeiras do vírus, erradicação de plantas doentes, controle ou supressão da chegada de vetores na cultura (por exemplo, com técnicas de controle químico e biológico), alteração do período e local do plantio, intervenção no ciclo de infecção, proteção cruzada e cultura de meristemas (Andrade & Pio-ribeiro, 2001; Fajardo & Nickel, 2019).

Estudos sobre os mecanismos de imunidade e resistência de plantas à infecção por vírus tentam explicar como as plantas percebem o ataque do vírus, quais genes, proteínas e outras moléculas estão envolvidos nos mecanismos de defesa utilizados pela planta para escapar da infecção ou reduzir sua severidade. Além disso, alguns estudos buscam entender como os efetores virais controlam a expressão gênica do seu hospedeiro para seu próprio benefício, como os vírus utilizam a maquinaria celular e bioquímica do seu hospedeiro para replicar o seu material genético, como se movimentam sistemicamente na planta e são transmitidos para outras plantas na natureza (Paiva et al., 2016).

Os ensaios genômicos evoluíram rapidamente e a chamada era das ciências “ômicas” tem ajudado a responder muitas perguntas sobre o funcionamento do genoma das plantas sob o ataque de vírus, proporcionando um melhor entendimento da mecânica da biologia molecular e permitindo aprimoramento de técnicas de melhoramento genético. Fazem parte deste conjunto, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas), e a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos), recentemente aplicadas no estudo dos mecanismos de respostas das plantas sob estresses (Canuto et al., 2018), entre outras ômicas (Benko-Iseppon et al., 2017).

A combinação de métodos convencionais de melhoramento genético com técnicas mais avançadas, como por exemplo a utilização de marcadores moleculares, mapeamento genético, sequenciamento genômico e transcriptômico e a biotecnologia aplicada à transformação vegetal ou à edição de genes oferecem uma ampla gama de oportunidades que podem ajudar o feijão-caupi a se tornar uma cultura melhor para um mundo em constante mudança. A presente revisão aborda os estudos envolvendo feijão-caupi e as principais viroses que acometem a cultura, com aspectos associados, como o estado do conhecimento sobre programas de melhoramento, o uso de marcadores moleculares, tecnologias ômicas e biotecnologia aplicados a essa cultura e suas implicações no desenvolvimento de novas cultivares.

## 2. Viroses do feijão-caupi no Brasil e no mundo

As doenças virais são um importante fator limitante na produção do feijão-caupi. Os sintomas em cultivares de feijão-caupi suscetíveis e infectadas por vírus são bastante variáveis, podendo ser observados: mosqueado, mosaico, necroses diversas, locais ou sistêmicas (em anéis; necrose do topo; lesões necróticas em folhas, etc.), bo-lhosidade em folhas, deformação foliar e nanismo, dentre outros.

A manifestação e severidade dos sintomas em cultivares de feijão-caupi dependem de vários de fatores, tais como condições ambientais (luminosidade, pluviosidade e temperatura) e nutrição, nível de resistência da cultivar plantada, idade da planta na época da infecção e nível de virulência da estirpe do vírus. Além disso, a ocorrência de infecção mista com a presença de mais de uma espécie de vírus na mesma planta pode resultar, além da intensificação da severidade dos sintomas e também no aumento do título viral, sendo um fenômeno de sinergismo (Martín & Elena, 2009; Wang et al., 2002). Os mecanismos envolvidos nas interações sinérgicas ainda não foram totalmente elucidados; porém em alguns casos sabe-se que há um envolvimento da maquinaria de silenciamento pós-transcricional (Voinnet, 2005). O feijão-caupi pode ser infectado naturalmente por pelo menos 140 espécies virais em diferentes regiões do mundo, mas apenas cerca de 20 espécies virais têm ampla distribuição (Hughes & Shoyinka, 2003). Os vírus que infectam naturalmente o feijão-caupi estão representados na Tabela 1 com algumas características, compilando 31 espécies virais reportadas para o feijão-caupi, pertencentes a 12 famílias (Alphaflexiviridae, Betaflexiviridae, Bromoviridae, Closteroviridae, Geminiviridae, Nanoviridae, Potyviridae, Secoviridae, Solemoviridae, Tombusviridae, Tospoviridae e Virgaviridae), sendo Potyviridae e Bromoviridae as duas famílias mais representadas com seis e cinco espécies virais, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Vírus relatados em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), suas classificações segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV, maneiras de transmissão, sintomas e ocorrência. Compilado das revisões de Taiwo (2003) e Sastry et al. (2019).

Família	Vírus	Transmissão	Sintomas	Local de Ocorrência
Alphaflexiviridae	<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	Inoculação mecânica através da seiva	Manchas amarelas ou um mosqueado verde-claro	Grécia (Chipre)
Betaflexiviridae	<i>Cowpea mild mottle virus</i> (CPMMV)	Mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> ), sementes e inoculação mecânica	Mosaico angular. Clorose nas nervuras ou internerval	Brasil, Egito, Índia, Indonésia, Israel, Quênia, Malásia, Nigéria, Tanzânia, Uganda, Moçambique
Bromoviridae	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Sementes, afídeos e inoculação mecânica através da seiva	Mosaico leve e manchas anelares sistêmicas	Brasil, Arábia Saudita, Índia, Estados Unidos (Flórida), Nigéria e África tropical
Bromoviridae	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (AMV)	Afídeos e inoculação mecânica através da seiva	Lesões cloróticas e necróticas, mosaico	Irã, Índia, Arábia Saudita
Bromoviridae	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i> (CCMV)	Besouros e inoculação mecânica através da seiva	Mosqueado intenso	Costa Rica, Nigéria, Estados Unidos
Bromoviridae	<i>Peanut stunt virus</i> (PSV)	Afídeos e inoculação mecânica através da seiva	Mosqueado intenso, deformação foliar	Sudão



Família	Vírus	Transmissão	Sintomas	Local de Ocorrência
<i>Bromoviridae</i>	<i>Tobacco streak virus</i> (TSV)	Tripes e inoculação mecânica através da seiva	Anéis e manchas cloróticas; machas e riscas necróticas, necrose dos brotos apicais e morte da planta	Austrália, Estados Unidos, Índia
<i>Closteroviridae</i>	<i>Tomato chlorosis virus</i> (ToCV)	Mosca-branca	Manchas escuras de cor púrpura com clorose internerval	China
<i>Geminiviridae</i>	<i>Beet curly top Iran virus</i> (BCTIV)	Cigarrinha	Mosaico, faixa das nervuras	Irã
<i>Geminiviridae</i>	<i>Cowpea golden mosaic virus</i> (CP-GMV)	Mosca-branca e enxertia	Mosaico amarelo brilhante e deformação foliar	Brasil, Nigéria, Niger, Quênia, Senegal, Moçambique, Índia, Paquistão, Tanzânia
<i>Geminiviridae</i>	<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i> (MYMIV)	Mosca-branca	Mosaico dourado, amarellecimento e enrolamento das folhas	Índia
<i>Geminiviridae</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV)	Mosca-branca	Mosaico amarelo leve	China e Trindade
<i>Nanoviridae</i>	<i>Faba bean necrotic yellows virus</i> (FBNYV)	Afídeos	Amarelecimento e necrose foliar	Síria
<i>Nanoviridae</i>	<i>Milk vetch dwarf virus</i> (MDV)	Afídeos	Enrolamento das folhas	China
<i>Potyviridae</i>	<i>Blackeye cowpea mosaic virus</i> (BICMV) ou <i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV)	Sementes, inoculação mecânica e afídeos	Mosaico, clareamento das nervuras e folha mosqueada	Brasil, Irã, Índia, Arábia Saudita, Nigéria, Estados Unidos e Vietnã do Norte
<i>Potyviridae</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	Afídeos, Sementes e inoculação mecânica	Mosqueado, distorção das folhas	Índia
<i>Potyviridae</i>	<i>Cowpea rugose mosaic virus</i> (CPRMV)	Afídeos e inoculação mecânica	Mosaico, bolhosidade, enrugamento,	Brasil
<i>Potyviridae</i>	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)	Sementes, inoculação mecânica e afídeos	Mosqueado, mosaico, manchas cloróticas, bolhosidade e deformação foliar	Brasil, Estados Unidos, Itália, Holanda, Nigéria, Austrália, Japão, Filipinas, China, Marrocos e Zâmbia.
<i>Potyviridae</i>	<i>Cowpea green vein-banding virus</i> (CGVBV)	Afídeos, sementes e inoculação mecânica	Escurecimento das nervuras, queda das folhas, redução do crescimento	Brasil
<i>Potyviridae</i>	<i>Peanut mottle virus</i> (PeMoV)	Afídeos e inoculação mecânica através da seiva	Sem sintomas ou sintomas de mosaico leve	Estados Unidos (Geórgia)

Família	Vírus	Transmissão	Sintomas	Local de Ocorrência
<i>Secoviridae</i>	<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV)	Besouro, sementes e inoculação mecânica através da seiva	Intenso encrespamento do limbo foliar, Mosaico, manchas cloróticas sistêmicas, bolhosidade	Brasil, América Central e do Sul, América do Norte, Quênia, Niger, Peru e Paquistão
<i>Secoviridae</i>	<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV) ou <i>Cowpea Yellow mosaic virus</i> (CYMV)	Besouro, sementes e inoculação mecânica através da seiva	Mosaico e deformação foliar	Brasil, Quênia, Nigéria, Niger, Egito, países da África, Japão, Cuba, Índia e Estados Unidos
<i>Secoviridae</i>	<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	Nematoide e inoculação mecânica através da seiva	Necrose foliar intensa, mosqueado, anéis concêntricos e deformação foliar	Índia
<i>Solemoviridae</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i> (SBMV)	Besouro, sementes e inoculação mecânica através da seiva	Mosqueado severo e deformação foliar	Estados Unidos, Gana, Nigéria, Paquistão, Costa do Marfim
<i>Solemoviridae</i>	<i>Southern cowpea mosaic virus</i> (SCPMV)	Besouro, sementes e inoculação mecânica através da seiva	Mosaico mosqueado	Tennessee (EUA)
<i>Tombusviridae</i>	<i>Cowpea mottle virus</i> (CPMoV) ou (CMeV)	Besouro sementes e inoculação mecânica	Mosaico, mosqueado e deformação foliar	Nigéria, Costa do Marfim, Paquistão, Senegal
<i>Tospoviridae</i>	<i>Groundnut bud necrosis orthotospovirus</i> (GBNV)	Tripes e inoculação mecânica através da seiva	Anéis cloróticos e necróticos	Índia
<i>Tospoviridae</i>	<i>Tomato chlorotic spot orthotospovirus</i> (TCSV)	Tripes e inoculação mecânica através da seiva	Clorose, necrose e manchas nas folhas e frutos	República Dominicana
<i>Tospoviridae</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Tripes e inoculação mecânica através da seiva	Clorose, necrose e manchas de necrose e mosaico	China
<i>Virgaviridae</i>	<i>Sunn-hemp mosaic virus</i> (SHMV)	Inoculação mecânica através da seiva. Não tem vetor conhecido	Mosaico	África tropical, Nigéria
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Inoculação mecânica através da seiva. Não tem vetor conhecido	Mosaico e deformação foliar	Índia

Na Nigéria, país que figura como maior produtor mundial de feijão-caupi, foram identificados nove tipos de vírus que infectam essa leguminosa (Sastry et al., 2019). No Brasil, dentre os principais vírus reportados para o feijão-caupi, merecem destaque, pela severidade e ampla ocorrência, o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Além destas espécies virais, o feijão-caupi também pode ser infectado por *Cowpea golden mosaic virus* (CPGMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV) e *Cowpea green vein banding virus* (CGVBV) (Lima et al., 2005).

O CPSMV pertence à família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*. Apresenta partículas com formas isométricas e genoma bipartido, constituído por duas moléculas de RNA de fita simples. Em condições naturais, o CPSMV é disseminado por mais de dez espécies de insetos vetores, principalmente besouros das espécies *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*.

A doença causada pelo CPSMV é conhecida como mosaico-severo, em razão da severidade de sintomas evidenciados nas plantas jovens infectadas, causando necrose da extremidade superior do caule, morte dos brotos terminais e queda prematura das folhas. Os sintomas nas folhas incluem lesões locais cloróticas, manchas cloróticas e necróticas, mosaico severo, distorção foliar, redução da lâmina foliar, bolhosidade, necrose sistêmica e mortes de algumas cultivares. Devido à severidade dos sintomas este vírus é considerado o mais importante, com redução da produção de feijão-caupi em até 70%, dependendo da época de ocorrência e da suscetibilidade da cultivar (Lima et al., 2005), sendo relatado em praticamente todos os estados produtores do Norte e Nordeste do Brasil.

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus* e à família *Potyviridae*. Possui partícula alongada e flexuosa e genoma composto de uma única molécula de RNA de fita simples. Pode ser transmitido mecanicamente de uma planta infectada para uma planta sadia, ou por meio de sementes de plantas hospedeiras, bem como através de afídeos, destacando-se *Aphis craccivora* Koch como o principal vetor (Lima et al., 2005). Em geral, os sintomas são: mosqueado, mosaico, clorose, manchas cloróticas, bolhosidade, deformação foliar e redução no crescimento das plantas. A maneira mais eficiente de controle do CABMV é a utilização de variedades resistentes. Embora o CABMV provoque menores taxas de perda na produção, a infecção simultânea com o CPSMV ou com o CMV pode ocasionar sintomas severos, devido ao sinergismo entre esses vírus, ocasionando o nanismo acompanhado de mosaico intenso, distorção foliar e em algumas cultivares, necrose sistêmica (Barros et al., 2013).

O CMV, pertencente à família *Bromoviridae* e gênero *Cucumovirus*, apresenta partículas poliédricas e genoma dividido em três moléculas de RNA de fita simples. Além de interagir sinergisticamente com o CPSMV e o CABMV, possui maior gama de variedades suscetíveis que apresentam sintomas de mosaico leve e manchas anelares sistêmicas. A transmissão do CMV pode ser mecânica, por meio da inoculação de extrato vegetal de plantas infectadas em plantas sadias, e por afídeos de maneira não-persistente, com destaque para *A. gossypii* e *Myzus persicae* (Pio-Ribeiro et al., 2005). As estratégias de controle para o CMV também devem ser baseadas no uso de variedades resistentes, devido ao difícil controle do inseto vetor e pelo caráter não-persistente de transmissão (Lima et al., 2011).

O vírus CPGMV, responsável pelo mosaico dourado do feijão-caupi é membro do gênero *Begomovirus* e da família *Geminiviridae*. Apresenta morfologia icosaédrica, incompleta e geminada, composta por duas moléculas de DNA circular de fita simples (Assunção et al., 2006). São transmitidos, naturalmente de maneira semi-persistente pela mosca branca *Bemisia tabaci* e artificialmente pela enxertia (Silva et al., 2011). As plantas infectadas apresentam sintoma de mosaico amarelo brilhante, sendo que a redução na produção pode atingir até 75% (Lima et al., 2005).

Para a introdução da resistência em materiais de importância agrônômica é fundamental identificar e caracterizar genótipos com resistência genética às principais viroses (como CPSMV, CPGMV, CABMV, BICMV e CMV). Para tal, plantas suscetíveis precisam ser constantemente inoculadas em ambiente protegido para conservação dos isolados virais. O preparo do inóculo é realizado após a obtenção dos tecidos foliares infectados, os quais são macerados na presença de solução tampão com antioxidante. A inoculação é realizada com auxílio de pistilo ou gases umedecidas com o extrato vegetal infectado, friccionando na superfície das folhas sadias previamente pulverizadas com um agente abrasivo, como o carborundum ou celite, visando induzir ferimentos e facilitar a penetração das partículas virais nos tecidos vegetais (Assunção et al., 2005; Leão et al., 2016; Antoine et al., 2017; Lima, 2019).

A avaliação normalmente é realizada de forma qualitativa de acordo com os sintomas visuais apresentados pelas viroses (Rocha et al., 2003; Lima et al., 2012). Testes sorológicos como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) também são utilizados, auxiliando nas avaliações e na classificação dos genótipos de feijão-caupi em relação aos vírus (Leão et al., 2016; Asare-Bediako et al., 2018). Um exemplo de classificação dos genótipos de acordo com sua reação envolve uma nomenclatura baseada nos sintomas e resultados dos testes sorológicos, podendo cada genótipo ser classificado como imune (ausência de sintomas virais e teste sorológico negativo), resistente (plantas com pouca severidade da virose como o mosaico leve e com teste sorológico positivo), suscetível (plantas com mosaico e teste sorológico positivo), altamente suscetível (mosaico severo e outros sintomas, com teste sorológico positivo). De modo geral, plantas imunes não apresentam sintomas da doença, plantas resistentes apresentam reação hipersensível (dano e morte celular no local de penetração) e/ou baixa severidade de sintomas como o mosaico leve, ao passo que as suscetíveis apresentam os sintomas clássicos da virose (Lima et al., 2011; Lima et al., 2012; Dhanasekar & Reddy, 2015).

Escalas também podem ser utilizadas para uma avaliação quantitativa das viroses em feijão-caupi, como a escala de notas de 1 a 9 usada no trabalho de Orawu et al. (2013), onde a severidade do CABMV foi avaliada de forma visual entre nenhum sintoma (nota 1) até a severidade acima de 60% ou planta morta (nota 9). As plantas com severidade do CABMV até 10% foram consideradas resistentes e as plantas com severidade acima de 10% suscetíveis (Orawu et al., 2013).

Em uma avaliação do feijão-caupi inoculado com CMV foi adotada uma escala de notas entre 1 e 5 com os seguintes critérios: ausência de sintomas (1), baixa severidade (10 a 30%) de mosaico nas folhas (2), sintomas de mosaicos entre 31 a 50% e folhas distorcidas (3), folhas distorcidas e mosaico severo com 51 a 70% (4), mosaico acima de 70% e morte de plantas (5) (Salaudeen, 2016). Outro exemplo de avaliação

usado por Asare-Bediako et al. (2018) com nota 1 (ausência de sintomas foliares), 2 (sintomas leves, com 1 a 25% de folhas infectadas), 3 (sintomas moderados, entre 26 a 50% de folhas infectadas), 4 (sintomas proeminentes, entre 51 a 75%) e 5 (sintomas altamente severos, e acima de 75% de folhas infectadas).

### 3. Fontes de resistência a viroses em feijão-caupi

Várias pesquisas em feijão-caupi têm sido realizadas ao longo dos anos, identificando e explorando as diferentes fontes de resistência aos vírus (Quadro 1). Aqui, pode se destacar os genótipos imunes ou resistentes a uma determinada espécie de vírus, como aqueles reportados como imunes ao **CPSMV**: Apagbaala, BRS Marataoã, BRS Rouxinol, BR 17 Gurguéia, BR 14 Mulato, BR 10 Piauí, CE 877, CNC 0434, CNCx 249-272F, CNCx 284 66E, CNCx 172 3E/P, CNCx 251-11E, CNCx 251 76E, CNCx-252-9E, CNCx 676-51F, CNCx 689-12F, EPACE V-96, L254.008, Macaibo, Patativa, Rita Joana, TE97-309G-10, TE97-309G-4, TE97-309G-9, TE97-309G-22, TE97-309G-24, TE97-321G-8, Tvu 379, Tvu 382, Tvu 966, Tvu 3961, UCC-473, UCC-484, UCC-490, UCC-497, UCC-514, UCC-523. Por sua vez, os imunes ao **CPGMV** são o BR 17 Gurguéia e BRS Mazagão.

Imunes ao **CABMV**: BRS Xiquexique, Buch Purple Hull, CNCx 284 66E, CO6, Cowpea 535, Dixiecream, Evx 91-2E, Evx 94-9E, EVx 90-49E, IC521495, IT85F-2687, IT86D-716, IT86F-2014-1, IT86F-20895-1, Mazagão, Patativa, Purple Knuckle Hull 55, PGCP12, RC101, Sanzi-sanbili, TE97-309G-10, TE97-309G-4, TE97-309G-9, TE97-309G-22, TE97-321G-8, TE97-367G-3, Tvu 379, Tvu 382, Tvu 966, Tvu 612, Tvu 410, TC1-6-10-1, TC1-6-9-E, TC501-1-4, TC503, TC605, TC99-1, TCM418SDT.

Imunes ao **BICMV**: Cowpea cv. Early Ramson, EC-458480, EC-472267, IC206240, IT84S-2135, IT86D-716, IT87D-885.1, IT89K-381, IT89KD-245.1, KBC-2, MFC-09-3, MFC-09-13, MFC-09-18); bem como os imunes ao **CMV**: BR 17 Gurguéia, BR 1 Poty, CNCx 251 11E, Paulistinha, TE97-309G-24, Tvu 966, Tvu 410, UCC-489.

**Quadro 1.** Caracterização, via código de cores\*, das reações de genótipos de feijão-caupi às seguintes fitoviroses: *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Cowpea golden mosaic virus* (CPGMV), *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV), *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV). \*Quadrados contendo mais de uma cor, apresentam as diferentes reações documentadas num mesmo manuscrito; ou indicam que um genótipo foi analisado em trabalhos diferentes e apresentaram reações diferentes nesses trabalhos.





	RESISTENTE	ALT. SENSÍV.	IMUNE	MOD. RESIST.	SENSÍVEL	ALT. RESIST.	MOD. SENSÍV.	S/ CARACT.
CPSMV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CPGMV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CABMV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BICMV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CMV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Monteiro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC99-508F-12	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC99-510 G-7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC99-510 F-16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC03-720-11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC03-731C-21	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MNC08-928E-11J	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MU-93	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-08-19	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-13	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-18	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MFC-09-20	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Novato	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
n-Rouxinho 2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pampo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Patativa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Paulistinha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT89KD-845	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT89KD-245.1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT86D-716-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT86D-716-2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT93K-452-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT99K-1060	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Isabel-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ife Brown	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jaguaribe roxo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Knuck.-VNR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
KVx396-4-5-2D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
KVx640	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
KBC-2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lisão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L254.008	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L25-Badeggi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
L 1325 (IPA)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Macaibo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mazagão	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Milagroso	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT82E-10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT82E-16	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT83D-442	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT83S-818	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT83S-872	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT84D-449	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT84S-2135	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT85F-2687	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT85F-2841	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT85F-867-5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT86D-716	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT86F-2014-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT86F-20895-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT87D-1332	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT87D-1627	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT87D-1951	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT87D-885.1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT89K-381	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT89KD-107	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT89KD-260	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EC-458480	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EC-394839	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EC-472252	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EC-47485	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
EC-472267	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Feijão de ig-1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Floriceam	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Galanção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GC-86L-98	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GC-5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ipa 203	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ipa 205	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ipa 206	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ipean v. 69	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IC521495	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IC1061	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IC206240	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT07K-299-6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT82D-889	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IT82D-516-2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	RESISTENTE	ALT. SENSÍV.	IMUNE	MOD. RESIST.	SENSÍVEL	ALT. RESIST.	MOD. SENSÍV.	S/ CARACT.							
<b>CPSMV</b>															
<b>CPGMV</b>															
<b>CABMV</b>															
<b>BICMV</b>															
<b>CMV</b>															
	TC503	TC605	TC99-1	TCM418SDT	UCR 95 701	UCC-366	UCC-473	UCC-484	UCC-489	UCC-490	UCC-497	UCC-514	UCC-523	Vinagre-1	Vinagre-2
<b>CPSMV</b>															
<b>CPGMV</b>															
<b>CABMV</b>															
<b>BICMV</b>															
<b>CMV</b>															
	TE97-309G-10	TE97-200-49F	TE97-309G-4	TE97-309G-9	TE97-309G-22	TE97-309G-24	TE97-321G-8	TE97-367G-3	Tvu 379	Tvu 382	Tvu 966	Tvu 3961	Tvu 612	Tvu 410	Tvu 14533
<b>CPSMV</b>															
<b>CPGMV</b>															
<b>CABMV</b>															
<b>BICMV</b>															
<b>CMV</b>															
	PI583174	PGCP12	Ritinha	Rita Joana	Roxinho-1	Roxinho-2	Rio Branco	RC101	Sanzi-sanbili	Setentão	Sempre Verde	SECOW-2W	TE 94-277-3F	TE 93-200-40F	TE 93-200-49F
<b>CPSMV</b>															
<b>CPGMV</b>															
<b>CABMV</b>															
<b>BICMV</b>															
<b>CMV</b>															
	PI581001	PI581004	PI581083	PI581104	PI581105	PI581141	PI612607	PI441917	PI441918	PI354580	PI354729	PI419165	PI580998	PI581001	PI581004
<b>CPSMV</b>															
<b>CPGMV</b>															
<b>CABMV</b>															
<b>BICMV</b>															
<b>CMV</b>															

No entanto, é sempre pertinente mencionar que alguns genótipos podem apresentar imunidade ou resistência a determinados isolados, mas serem suscetíveis a outros isolados da mesma espécie viral (Shoyinka et al., 1997; Paz et al., 1999; Camarço et al., 2009; Lima et al., 2011). No trabalho de Lima et al. (2011), vários genótipos de feijão-caupi foram resistentes ou suscetíveis ao CABMV, dependendo do isolado desse vírus. Esse foi o caso dos genótipos BR 1 Poty, CB3, Macaibo, Milagroso, Paulistinha, Roxinho-1, Setentão, Sempre Verde, Tvu 14533, UCR 95701.

Nessa mesma publicação, alguns genótipos também se comportaram como resistentes ou suscetíveis frente a diferentes isolados de CPSMV, como o BR 1 Poty, Roxinho-1, Roxinho-2, MNC 03 720 11, Pitiúba, Tvu 14533. Enquanto isso, os genótipos BRS Guariba, CNC 0434 e Tvu 3961 foram resistentes ou suscetíveis ao CABMV considerando-se diferentes publicações científicas. Para esse vírus, o IT84D-449 também foi resistente ou suscetível a depender de qual dos dois isolados foi inoculado (Shoyinka et al., 1997). Entre diferentes publicações, o genótipo “Das Almas” foi altamente suscetível e resistente ao CPSMV, enquanto o IT85F-2687 foi imune ou suscetível ao BICMV (Quadro 1).

Considerando essa importância do controle genético, diferentes esforços têm sido conduzidos por melhoristas e fitopatologistas com o objetivo de realizar trabalhos de identificação de fontes de resistência para lançamento de cultivares de feijão-caupi com resistência às fitovirose. Dentre esses trabalhos, temos o exemplo do uso dos genótipos TE 97-309G-9 e Patativa como parentais doadores de genes de resistência aos vírus CABMV e CPSMV, os quais foram cruzados com parentais suscetíveis, seguidos de retrocruzamentos recorrentes com esses parentais. O resultado desses retrocruzamentos em  $F_2RC_1$  mostrou que esses materiais segregantes foram promissores para o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resistentes aos vírus (Barros et al., 2013).

Em outro estudo, esses mesmos parentais resistentes TE 97-309G-9 e Patativa foram usados para incorporar genes de resistência em genitores recorrentes, obtendo os retrocruzamentos em  $F_3RC_2$ . As linhagens MNC10-1001B-13-10, MNC10-997B-17-7, MNC08-937C-6.1, MNC09-998B-20, MNC10-998-1B-20-3, MNC10-998-1B-3-20, MNC09-981B-3, MNC10-997B-17-2 e MNC09-981B-2 destacaram-se em valor de cultivo, produtividade e resistência a CABMV e CPSMV (Nogueira et al., 2016). O genótipo MNC08-928E-11J possui resistência ao CPSMV e CABMV, sendo utilizado como genitor em cruzamentos com outros três genótipos suscetíveis, gerando 40 progênies  $F_{3:5}$ . Dentre essas progênies quatro foram resistentes ao CPSMV e CABMV, enquanto as outras 36 foram resistentes apenas ao CPSMV. Especialmente as progênies com grãos de tegumento branco e resistentes aos vírus apresentam potencial como genitores em futuros cruzamentos no programa de melhoramento do feijão-caupi (Leão, 2014; Leão et al., 2016).

Merecem destaque cultivares desenvolvidas pela Embrapa que possuem características de resistência a diferentes doenças, incluindo virose, as quais estão disponíveis no catálogo de cultivares de feijão-caupi (Embrapa Meio-Norte, 2016; Embrapa Meio-Norte, 2020). Cultivares de feijão-caupi também vêm sendo introduzidas do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (International Institute of Tropical Agriculture - IITA) e podem apresentar resistência genética aos vírus, compreendendo culti-



vares com código inicial TVu ou IT citadas ao longo desse capítulo, como a IT85F-2687 resistente ao CABMV (Oliveira et al., 2012; Silva et al., 2019), além das TVu imunes ao CPSMV e ao CABMV (Quadro 1). A cultivar TVu 382 foi utilizada como parental para incorporação da resistência ao CPSMV após o cruzamento com a cultivar BR2-Bragança e as linhagens SLA-3 e MG-40, gerando progênes  $F_{3:4}$  após ciclos de seleção para resistência ao vírus. Tais cruzamentos têm se mostrado promissores para a obtenção de progênes do tipo manteiguinha e resistentes ao CPSMV (Lima, 2019).

Outra instituição que desenvolve pesquisas visando resistência do feijão-caupi às viroses é o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Recentemente foram desenvolvidas no IPA 386 linhagens endogâmicas recombinantes após o cruzamento entre os parentais contrastantes ao CABMV, IT85F-2687 (resistente) e BR-14 Mulato (susceptível), resultando em 174 linhagens resistentes ao CABMV (Silva et al., *in prep.* – dados não publicados). Portanto, essas linhagens possuem grande possibilidade de serem utilizadas em futuro próximo para o desenvolvimento e lançamento de cultivares de feijão-caupi resistentes ao vírus e com características agronômicas desejáveis.

## 4. Marcadores moleculares, mapas de ligação e genômica em feijão-caupi

O desenvolvimento de marcadores moleculares foi um grande passo para compreensão da genética e na avaliação da quantidade e organização dos polimorfismos presentes entre sequências nucleotídicas de diferentes acessos de feijão-caupi. Fatores como elementos transponíveis, inserções, deleções, substituição de bases, duplicação e translocações são a base desses polimorfismos.

Um marcador de DNA ideal deve ser codominante (ou seja, numa progênie deve ser possível identificar de qual parental foi herdado), distribuído uniformemente pelo genoma, ser altamente reprodutível, seletivamente neutro e ter capacidade de detectar altos níveis de polimorfismo (Mondini et al., 2009).

A Tabela 2 apresenta os principais tipos de marcadores de DNA com uma breve descrição de sua base metodológica, suas vantagens e limitações, bem como exemplos de aplicação em estudos do feijão-caupi, incluindo caracterização da diversidade genética, geração de mapas genéticos, taxonomia e domesticação.

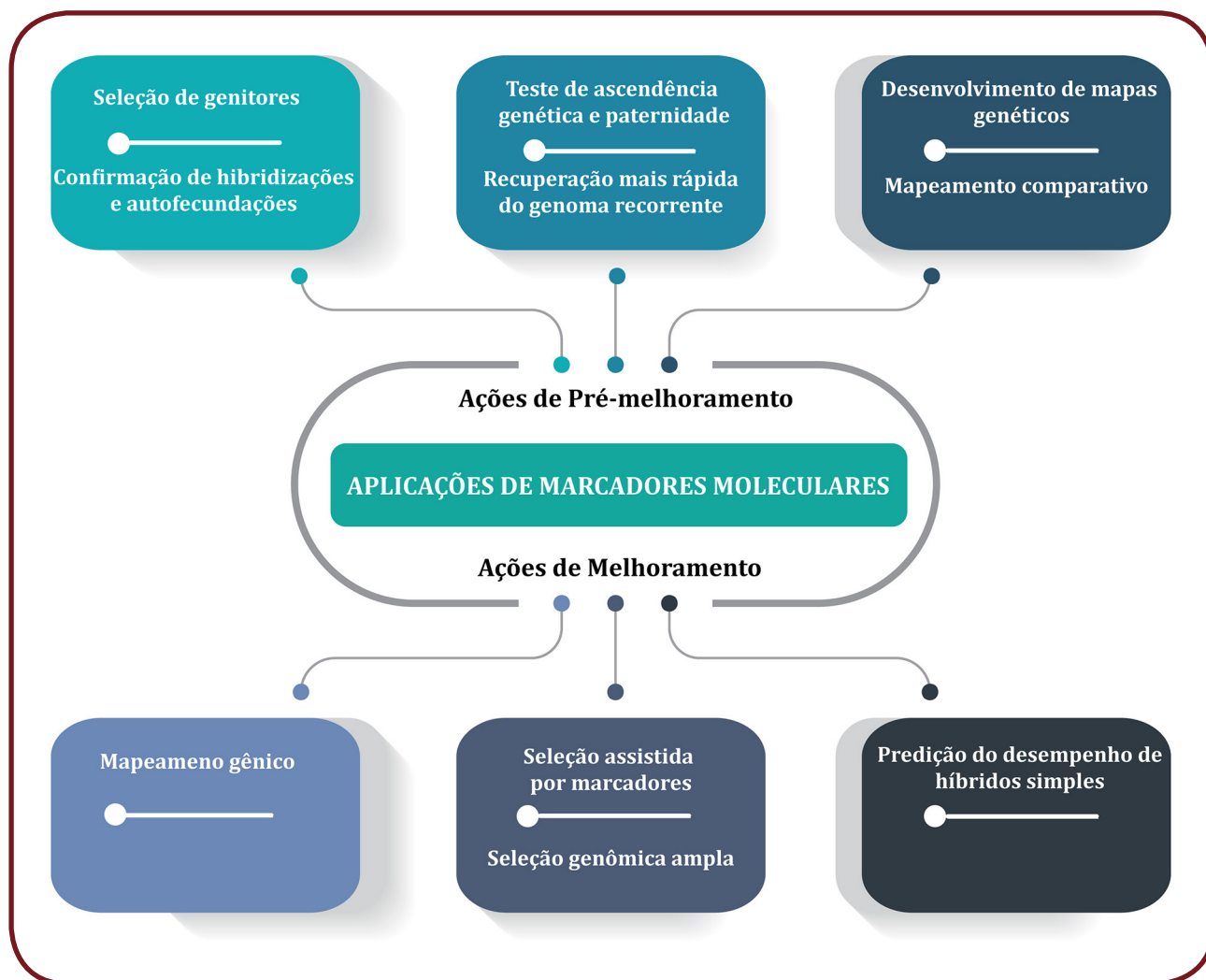


**Tabela 2:** Tipos de marcadores, suas vantagens, limitações e autores que descreveram a técnica, bem como exemplos de sua aplicação na cultura do feijão-caupi.

Acrônimo	Descrição	Vantagens	Limitações	Referência	Exemplo(s) em Feijão-Caupi
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição). Marcador baseado em hibridização. Consiste na digestão do DNA com enzimas de restrição e hibridização com sondas de DNA.	Alta reprodutibilidade; Bons níveis de polimorfismo; Cobertura ampla do genoma; Marcador co-dominante.	Uso de sondas radioativas; Inexistência de uma biblioteca de sondas; Requer conhecimento prévio do genoma; Elevado custo; Técnica laboriosa; Não pode ser automatizada.	Botstein et al., 1980	Myers et al. (1996); Menéndez et al. (1997); Ouédraogo et al. (2002); Fernandes et al. (2003).
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i> (Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico). Marcador baseado na amplificação por PCR. Utiliza apenas um "primer" com sequência curta (10 bases) e aleatória.	Não requer conhecimento prévio do genoma; Técnica simples e rápida; Gera muita informação em pouco tempo.	Baixa reprodutibilidade; Análise complexa de presença/ausência de uma determinada banda; Marcador dominante.	Williams et al., 1987	Menéndez et al. (1997); Ouédraogo et al. (2002); Xavier et al. (2005); Anatala et al. (2014); Dias et al. (2015); Kolade et al. (2016).
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado). Reúne enzimas de restrição e amplificação por PCR. Adaptadores específicos são ligados nas extremidades dos fragmentos clivados por enzimas, e primers (20 pb) complementares aos adaptadores.	Altamente variável; Não requer conhecimento prévio do genoma; Alta reprodutibilidade e rapidez.	Laborioso (muitas etapas); Custo elevado; Análise complexa de presença/ausência das bandas/alelos; Marcador dominante.	Vos et al., 1995	Menéndez et al. (1997); Ouédraogo et al. (2002); Coulibaly et al. (2002) Rodrigues et al. (2012); Kolade et al. (2016); Al-Hinai et al. (2018).

Acrônimo	Descrição	Vantagens	Limitações	Referência	Exemplo(s) em Feijão-Caupi
DAF	<i>DNA amplification fingerprinting</i> (Impressão Digital da Amplificação do DNA). Técnica similar ao RAPD, com menor concentração de DNA molde e maior concentração do <i>primer</i> usado na PCR, o que torna a reação mais específica.	Alta reprodutibilidade; Não requer conhecimento prévio das sequências; Bom nível de polimorfismo.	Marcador dominante.		Simon et al. (2007); Onofre, (2008); Spiaggia et al. (2009); Amorim et al. (2013).
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> (Sequências Simples Repetidas). Marcador baseado na amplificação por PCR. Utiliza um par de <i>primers</i> desenhados para as regiões flangeadoras da sequência repetitiva. O polimorfismo reflete tamanho de fragmentos e número diferente de cópias.	Alta informativo (multialélico); Fácil de isolar; Marcador co-dominante; Alta reprodutibilidade.	Requer conhecimento prévio das sequências ( <i>loci</i> ); Desenvolvimento de marcadores espécie-específicos; Alelos nulos.	Litt & Luty et al., 1989	Onofre, (2008); Gupta & Gopalakrishna (2010); Gioi et al. (2012); Ali et al. (2015); Araújo et al. (2016); Uma et al. (2016); Chen et al. (2017); Oliveira et al. (2018); Sarr et al. (2020).
ISSR	<i>Inter Sequence Simple Repeats</i> (Repetições Simples entre Sequências). Marcador baseado em SSR. É utilizado um único <i>primer</i> semi-arbitrário composto por uma sequência do SSR (~16-25 bp).	Não requer conhecimento prévio do genoma; Gera grandes quantidades de bandas; Boa reprodutibilidade; Baixo custo.	Análise complexa de presença/ausência de bandas; Marcador dominante.	Zietkiewicz et al., 1994	Onofre, (2008); Amorim et al. (2013); Santos et al. (2013); Anatala et al. (2014); Dias et al. (2015); Igwe et al. (2017); Saxena & Rukam (2020).
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Simples). Polimorfismos específicos identificados a partir de polimorfismo de uma única base no genoma (substituição, deleção ou inserção).	Análise em larga escala; Alta reprodutibilidade; Marcador co-dominante; Fácil comparação entre estudos.	Alto custo de desenvolvimento; Requer sequenciamento ou serviço terceirizado.	Jordan et al., 1994	Das et al. (2008); Muchero et al. (2009); Egbadzor et al. (2014); Ravelombola et al. (2017); Fatokun et al. (2018); Lo et al. (2018); Seido & Santos (2019).

Várias são as aplicações dessas ferramentas no que diz respeito a ações de pré-melhoramento e melhoramento (Figura 1). Destaca-se sua implementação na seleção de genitores nos trabalhos de diversidade genética, teste de ascendência genética, confirmação de hibridações e autofecundações, construção de mapas genéticos, incluindo análise de locos de herança quantitativa (QTL, do inglês *Quantitative Trait Loci*), seleção assistida por marcadores moleculares e seleção genômica ampla (Figura 1), dentre outras (Lanza et al., 2000; Faleiro, 2011).



**Figura 1.** Principais aplicações práticas dos marcadores moleculares em programas de melhoramento genético, incluindo atividades de pré-melhoramento. Adaptado de Faleiro (2011).

O mapeamento genético é um método importante para posicionar genes de interesse no genoma, bem como para identificar QTLs responsáveis pela variação fenotípica (Xu et al., 2017).

O primeiro mapa de ligação para o feijão-caupi foi desenvolvido usando uma população de 58 plantas na geração  $F_2$  derivadas de um cruzamento entre IT84S-2246-4 e TVNu 1963 (Fatokun et al., 1993). O mapa apresentava 89 loci, incluindo 79 RFLP, cinco marcadores RAPD e quatro cDNA, além de uma característica morfológica. Esses marcadores foram distribuídos em 10 grupos de ligação (LGs) que abrangeram 680 cM (centiMorgan) do genoma.

Menéndez et al. (1997) desenvolveram o segundo mapa de ligação de feijão-caupi usando linhagens recombinantes 94  $F_8$  (RILs) derivadas de um cruzamento entre dois genótipos IT84S-2049 e 524B. Um total de 181 loci, compreendendo 133 RAPDs, 19 RFLPs, 25 AFLPs e três marcadores morfológicos e bioquímicos, foram distribuídos em 12 grupos de ligação abrangendo 972 cM, com uma distância média de 6,4 cM entre os marcadores. Este segundo mapa foi aprimorado com a adição de 242 novos marcadores AFLP, que geraram 11 LGs abrangendo um total de 2670 cM, com uma distância média de 6,43 cM entre os marcadores (Ouedraogo et al., 2002).

Com relação ao mapeamento para identificação de marcadores associados a viroses, no mapa de Ouedraogo et al. (2002) a resistência ao BCMV e ao SBMV foram mapeadas no LG8 e LG6, respectivamente, enquanto a resistência ao CPMV e ao CPSMV foram mapeadas no LG3.

Gioi et al. (2012) identificaram e validaram um QTL para resistência ao CYMV usando marcadores SSR. Os autores identificaram três marcadores SSRs (AG1, VM31 e VM1) associados a um QTL para a característica de resistência ao CYMV, mapeada a 19 cM do *locus* VM31, considerada como altamente herdável.

Dinesh et al. (2018), por sua vez, ao avaliarem 191 indivíduos de feijão-caupi (provenientes da geração  $F_2$ ) e 106 marcadores microssatélites polimórficos, identificaram que dois marcadores (MA15 e MA80) foram associados à resistência ao CPMV. Além disso, eles construíram um mapa de ligação, utilizando 91 marcadores microssatélites polimórficos, onde dois marcadores (MA15 e MA80) foram inclusos no grupo de ligação '6'.

Barro et al. (2018), ao analisarem cinco genótipos de feijão-caupi e 17 marcadores SSRs, identificaram quatro marcadores polimórficos (VM30, VM33, VM68 e VM70), sendo que dois (VM68 e VM30) foram associados à resistência ao CABMV. Os autores indicaram ainda o marcador VM68 para ser usado em programas de seleção assistida por marcadores, pois o mesmo apresentou codominância, o que permitirá a introgressão do gene de resistência ao CABMV em linhagens superiores.

No Brasil, Rodrigues et al. (2012) construíram um mapa de ligação do *locus* de resistência para o CGMV, utilizando 286 plantas  $F_2$  de feijão-caupi derivadas do cruzamento IT97K-499-35 x Canapu T16. Os autores identificaram o gene de resistência ao CGMV associado a três marcadores AFLP, flanqueando o *locus* de resistência *Mdo-1* em uma distância variando entre 4,3 e 21,1 cM. Esse foi o primeiro mapa construído analisando uma população de *V. unguiculata* segregante quanto à resistência ao CGMV.

Em relação ao CPSMV, destaca-se a iniciativa do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - LGBV (Universidade Federal de Pernambuco) em parceria com a Embrapa, onde Amorim (2013) construiu um mapa de ligação para o feijão-caupi utilizando marcadores DAF, ISSR e CAPS, a fim de detectar a resistência ao CPSMV. O mapa foi obtido por meio da análise de 92 linhas endogâmicas recombinantes  $F_{6-7}$ . Foram identificados 11 grupos de ligação, compreendendo 492,128 cM. O gene de resistência associado ao CPSMV foi localizado no grupo de ligação 4.

Atualmente, o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em conjunto com a Universidade Federal Rural de Pernambuco e a UFPE, está desenvolvendo um mapa genético com o intuito de identificar o gene de resistência ao CABMV em feijão-caupi, utilizando marcadores SSR em uma população de linhagens endogâmicas recombi-

nantes em  $F_7$  (Silva et al., *in prep.* – dados não publicados). A disponibilização futura deste material para a comunidade científica brasileira, em especial, permitirá um avanço no conhecimento da base genética de resistência ao CABMV e outras viroses, no que concerne ao melhoramento da cultura.

Com o desenvolvimento de plataformas altamente multiplexadas de SNP como o Illumina Golden Gate, foi construído um mapa consenso do feijão-caupi com 928 marcadores SNP distribuídos em 11 LGs, cobrindo uma distância genética de 680 cM, estabelecido com base na genotipagem dos seguintes cruzamentos: 524B x IT84S-2019, CB27 x 24-125B-1, CB46 x IT93K-503-1, Dan Ila x TVu-7778, TVu-14676 x IT84S-2246-4 e Yacine x 58-77 (Muchero et al., 2009). Este mapa teve uma resolução de distância média de 0,73 cM entre dois marcadores adjacentes, considerando o genoma com tamanho estimado de 620 Mbp. A resolução deste mapa genético consenso ainda foi melhorada por Lucas et al. (2011). Versões atualizadas desses mapas podem ser acessadas na plataforma HarVEST:Cowpea (<http://harvest.ucr.edu/>).

Muñoz-Amatriaín et al. (2017) publicaram o mapa consenso mais completo com 37.372 SNPs, abrangendo 837,11 cM com uma densidade média de 0,26 cM. Uma pesquisa em parceria envolvendo a California University (Riverside) e o Joint Genome Institute (JGI, um consórcio californiano ligado ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, USDA) lançou um genoma de referência do feijão-caupi com a cultivar IT97K499-35 disponibilizado (v1.0) em 31 de julho de 2017 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/>). Esta iniciativa utilizou plataformas que geram leituras de sequenciamento longas (*Long reads*) para montar 519,4 Mb dispostos em 11 pseudo-moléculas (Spriggs et al., 2018). Foram identificados e anotados 29.773 genes usando uma combinação de dados de EST e RNA-Seq (Muchero et al., 2009; Yao et al., 2016; Santos et al., 2018), fornecendo a maioria (95,9%) da completude da montagem e anotação do genoma (Lonardi et al., 2019).

Com a tecnologia de SNPs, a seleção recorrente assistida por marcadores moleculares (*Marker-Assisted Recurrent Selection* – MARS) está sendo utilizada em diferentes países da África. Em Burkina Faso, no Instituto Nacional de Pesquisa Agrícola e Ambientais (INERA) e no Instituto Senegalês de Pesquisa Agrícola (ISRA), Senegal, estão sendo utilizados marcadores SNPs para características que incluem o rendimento de grãos, tolerância à seca e resistência à planta parasita *Striga* e ao fungo *Macrophomina*. No IITA, Nigéria, marcadores SNPs também identificaram alelos favoráveis relacionados com rendimento e a tolerância à seca. Na Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Moçambique, as características alvo dos projetos envolvem o tamanho das sementes, qualidade dos grãos e tolerância ao calor (Boukar et al., 2016).

## 5. Ômicas e seus impactos na identificação de genes relacionados a viroses

Apesar da crescente abordagem em ômicas para o feijão-caupi, abrangendo diversos aspectos de sua biologia, ainda há reduzida disponibilidade de dados associada,



especificamente, ao tripé ‘vírozes, ômicas e feijão-caupi’ nos bancos de dados internacionais de literatura científica. Uma recente busca (maio | 2020) na base de dados de literatura científica MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com as palavras-chave ‘*cowpea AND virus AND transcriptome*’ resultou na recuperação de apenas sete trabalhos. Desses, cinco foram executados em *Vigna mungo* (Trinks et al., 2005; Ganguli et al., 2016; Jasrotia et al., 2017; Singh et al., 2017; Kundu et al., 2019); um aborda dados de sequenciamento do genoma completo de CABMV, isolado a partir de plantas de maracujá infectadas com esse vírus (Munguti et al., 2019); e apenas Kido et al. (2011), realmente, têm foco em feijão-caupi, tratando-se de trabalho oriundo dos esforços iniciais do *Cowpea Genomics Consortium*, (CpGC) criado no ano de 2018, à época rede Nordeste de Biotecnologia.

O CpGC conta atualmente com genomas sequenciados de diferentes acessos/cultivares da referida espécie, os quais se encontram em ativo processo de montagem, além de transcriptomas (RNA-Seq) já finalizados de cultivares tolerantes/resistentes submetidas a condições de desidratação radicular ou a múltiplos estresses [injúria mecânica seguida de inoculação viral - *Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus* (CABMV) ou *Cowpea Mosaic Severe Virus* (CPSMV)].

Kido et al. (2011) estudaram o quinoma (conjunto de quinases expressas em um dado tecido e condição) em resposta à injúria mecânica e posterior inoculação de CABMV e à desidratação radicular, a partir de uma tecnologia precursora no estudo da transcriptômica, o SuperSAGE. O uso de diferentes abordagens de identificação permitiu a mineração de 1350 quinases candidatas, considerando bibliotecas bióticas, e 2268, em relação a bibliotecas abióticas. À época, pesquisas adicionais em bancos de dados específicos de quinases permitiram a identificação de um número relativamente baixo de quinases adicionais, indicando a falta de bancos de dados de quinases para organismos não-modelo. No que tange à categorização, pôde-se classificar um total de 713 potenciais quinases em 13 famílias dos grupos CMGC e STE. Esse foi o primeiro trabalho de transcriptômica em feijão-caupi a abordar a resposta de uma família de genes específicos frente à inoculação viral, revelando importantes atores e potenciais alvos biotecnológicos para testes posteriores.

Análises adicionais de mineração de dados na plataforma Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>; Maio/2020), usando-se as mesmas palavras-chave acima mencionadas revelou, adicionalmente, apenas um trabalho associado à transcriptômica da resposta de feijão-caupi a vírus. Martins et al. (2020) observaram que miRNAs estudados e os genes associados à AGO 2 e AGO4 apresentaram padrões diferenciais de expressão em resposta ao desafio do CPSMV, indicando que feijão-caupi se vale do mecanismo de RNA de interferência na tentativa de debelar infecções virais.

No que tange à proteômica, o uso das palavras-chave ‘*cowpea AND virus AND proteome*’, na base de dados MEDLINE, revelou um cenário ainda mais restrito: dos três manuscritos retornados, apenas um aborda, realmente, a temática minerada. Paiva et al. (2016) estudaram, a partir da metodologia em Proteômica Quantitativa – Label-Free, a interação compatível do CPSMV com genótipo suscetível de feijão-caupi. Tais autores observaram que o referido vírus suprime, transitoriamente, a síntese de proteínas envolvidas em processos como homeostase redox, síntese de proteínas, defesa, estresse, metabolismo de RNA / DNA, sinalização e outras funções. Tal supressão

permitiu a penetração viral e o movimento nos tecidos do feijão-caupi.

No que tange a outras ômicas (metabolômica, epigenômica, interatômica, etc.), a mineração das mesmas nos bancos de dados bibliográficos resultou em insucesso. Isso demonstra que as viroses que afetam feijão-caupi, bem como as respostas da referida espécie frente a esses agentes biológicos nocivos são ainda pobremente abordadas pelas tecnologias ômicas.

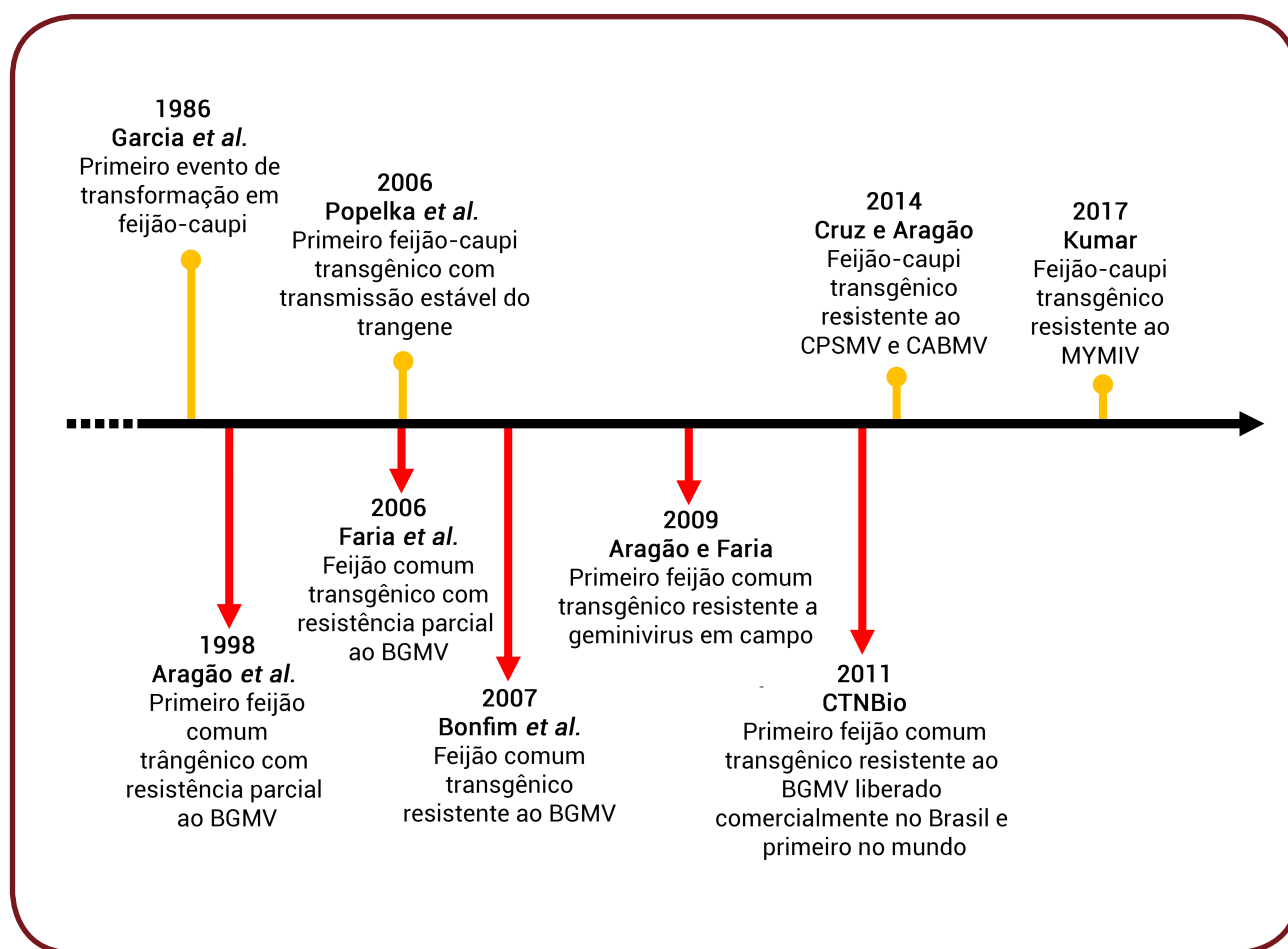
Nesse contexto, o CpGC se destaca sendo um dos poucos grupos a enveredar pela referida temática por meio da análise das bibliotecas RNA-Seq acima citadas. Atualmente, a rede conta com diversos manuscritos científicos submetidos, abordando diferentes aspectos da interação planta-vírus. Temas como o quinoma diferencialmente expresso por acessos resistentes (IT85F-2687 e BR14-mulato) quando submetidos a processo infeccioso por CABMV ou CPSMV; e o transcriptoma induzido ou reprimido por esses acessos tanto em reposta ao processo infeccioso por CABMV quanto ao processo infeccioso por CPSMV, denominado tecnicamente de assinaturas transcricionais conservadas, merecem menção. Por fim, encontra-se publicado, recentemente, manuscrito abordando as TLPs (*thaumatin-like proteins*), proteínas de defesa da família PR5, diferencialmente expressas nos acessos mencionados em resposta a CABMV e/ou CPSMV (de Jesús-Pires et al., 2020). Com o exposto, observa-se que o Brasil, por meio do CpGC, atua ativamente na produção de informações associadas a ômicas do feijão-caupi frente a viroses, visando maior entendimento da biologia da cultura em questão e produzindo informações para a futura obtenção de maior resistência perante esses agentes extremamente danosos à sua produção.

## 6. Biotecnologia e resistência viral

A primeira abordagem de engenharia genética aplicada ao feijão-caupi foi realizado por Garcia et al. (1986) na obtenção de calos transgênicos portando um gene repórter. Apenas duas décadas após a primeira intervenção biotecnológica foi possível a obtenção da primeira planta de feijão-caupi transmitindo estavelmente o transgene GUS, conforme padrão Mendeliano (Popelka et al., 2006). Em relação ao uso das técnicas modernas de biotecnologia para obtenção de resistência viral, até o presente momento há apenas dois registros, ambos utilizando a tecnologia do RNA de interferência (Cruz & Aragão, 2014; Kumar et al., 2017).

Cruz & Aragão (2014) realizaram um desenho de vetor que expressa fragmentos de DNA dos dois vírus que mais acometem a cultura no Brasil, o Comovirus CPSMV e o Potyvirus CABMV. Através da biobalística foram obtidas plantas estáveis expressando o RNAi com obtenção de imunidade em ensaios em casa de vegetação. Em contrapartida, Kumar et al. (2017) desenvolveram um feijão-caupi com um RNAi com fragmento de RNA do vírus MYMIV (*Mungbean Yellow Mosaic India Virus*). Este vírus é prevalente na Índia, provocando perdas estimadas em \$ 300 milhões de dólares por ano nas diversas culturas de leguminosas da região. Através da transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foram obtidas plantas de feijão-caupi transmitindo e expressando o RNAi de forma estável. As plantas que expressaram altos níveis de

RNAi foram assintomáticas e os vírus não foram identificados após cinco semanas do bioensaio de inoculação em telado (Figura 2).



**Figura 2.** Linha do tempo representando os eventos de biotecnologia relacionados ao desenvolvimento de feijão-caupi (região superior) e feijão comum envolvendo transgênicos com resistência a viroses.

Com relação ao uso de técnicas mais recentes de biotecnologia, como o CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), existe apenas um registro de transformação transiente de raízes de plantas de feijão-caupi com edição do gene referente à nodulação radicular, obtendo-se plantas sem nódulos (Ji *et al.*, 2019). Contudo, dados sobre plantas com o genoma editado ainda não foram publicados. Nosso grupo também está realizando ensaios de edição do genoma do feijão-caupi através da técnica CRISPR/Cas9 modificando o gene *eIF(iso)4E*, possivelmente relacionado à resistência e/ou suscetibilidade ao Potyvirus CABMV prevendo-se a publicação de resultados a respeito em breve.

As demais plantas do gênero *Vigna* que possuem registro de trabalhos de melhoramento via engenharia genética (*V. radiata*, *V. mungo* e *V. angularis*), envolvem basicamente protocolos com tentativa de transformação estável (Kapildev *et al.*, 2016) para tolerância a estresses abióticos (Sahoo *et al.*, 2016; Saha *et al.*, 2020) ou resistência a fungos (Das, 2018) e à predação por insetos (Ngoc Lan *et al.*, 2017).

Até o momento, nenhum registro de trabalhos de transgenia visando a algum tipo de resistência viral em outras espécies do gênero *Vigna* foi encontrado. Nesse sentido, merece destaque o gênero proximamente relacionado (*Phaseolus*), especialmente o feijão comum, *P. vulgaris*, onde há um exemplo de sucesso na busca de resistência a vírus. Primeiramente, Aragão et al. (1988) desenvolveram um feijão transgênico portando o gene *rep* e *BC1* do geminivirus BGMV (*Bean golden mosaic virus*), também conhecido como vírus do mosaico dourado, no sentido antissenso. Apesar do sucesso na transformação, apenas duas plantas tiveram atraso e redução dos sintomas comparadas ao controle não transformado. O mesmo grupo de pesquisadores (Faria et al., 2006) gerou plantas de feijão comum transgênico portando o gene viral *rep* mutado do BGMV, tornando a proteína inativa e promovendo uma resposta imunológica da planta. Contudo, a resistência foi parcial e reduzida na presença de maior número de indivíduos da mosca branca (vetor do vírus em questão). Em seguida, Bonfim et al. (2007) desenvolveram o primeiro feijão comum transgênico resistente ao geminivirus BGMV baseado na tecnologia do RNA de interferência, que promoveu o silenciamento do gene *rep* do vírus, com mais de 90% das plantas transgênicas assintomáticas mesmo se submetidas a uma alta pressão de inoculação (mais de 300 moscas brancas por planta em casa de vegetação).

Devido ao sucesso desse evento transgênico, o grupo seguiu com ensaios em campo, e observou a ausência de sintomas das plantas transgênicas comparadas com as não transformadas, sendo o primeiro relato de plantas transgênicas resistentes a geminivirus em campo (Aragão & Faria, 2009). Esse feijão, denominado evento EM-BRAPA 5.1, foi comercialmente aprovado para cultivo no Brasil em 2011 (Figura 2) pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTN-Bio) com 15 votos favoráveis, duas abstenções e cinco pedidos de prorrogação. O feijão transgênico foi denominado “feijão RMD” (Feijão Resistente ao Mosaico-Dourado), sendo o primeiro produto geneticamente modificado desenvolvido por uma instituição pública e aprovado na América Latina, além de ser o primeiro feijão comum transgênico no mundo. Diversos testes posteriores avaliaram que a modificação não alterou características agrônômicas e nutricionais comparativamente à variedade não transformada (Aragão et al., 2013). Porém, até o presente momento o feijão RMD não foi lançado e liberado para os produtores pela Embrapa, pois ensaios em campo mostraram suscetibilidade a um Carlavirus, que é transmitido também pela mosca branca. Os sintomas do Carlavirus não estavam aparentes, devido à precocidade e maior severidade dos sintomas do mosaico-dourado (Faria et al., 2016).

## 7. Herança genética e mecanismos moleculares da resistência

Cruzamentos entre cultivares de feijão-caupi contrastantes têm sido realizados com vistas à detecção da natureza da dominância ou recessividade dos alelos e modo de herança da resistência a vírus de interesse. Por exemplo, Assunção et al. (2005)

cruzaram as cultivares Macaibo e CNC 0434 com a linhagem L254.008 com resultados indicativos de que a resistência ao CPSMV é herdada como uma característica monogênica recessiva. Com base nos padrões de segregação observados nas gerações  $F_1$  e  $F_2$ , os autores sugerem que o gene de resistência deva ser o mesmo para ambas as cultivares, no entanto, distinto para a linhagem L254.008.

Em outro estudo, Rodrigues et al. (2012) determinaram que a resistência ao CGMV no feijão-caupi é definida por um gene dominante de herança monogênica. Padrões de herança distintos também foram constatados entre populações de retrocruzamento do feijão-caupi (Orawu et al., 2013) incluindo o cruzamento entre cinco genótipos (IT82D-889, IT85F-2841, IT82D-516-2, MU-93 e SECOW-2W) resistentes ao CABMV e três raças susceptíveis (Ebelat, Ecirikukwai e Blackcowpea). A taxa de segregação exibida pelos cruzamentos Ecirikukwai  $\times$  SECOW-2W e Ecirikukwai  $\times$  IT82D-516-2, apoiaram o padrão de herança monogênica, com ajuste de 1R:1S. Já as progênies de Blackcowpea  $\times$  SECOW-2W e Blackcowpea  $\times$  IT82D-889 não apresentaram 1R:1S, indicando herança poligênica. No estudo de Barro et al. (2018), por sua vez, foi analisada a progênie de cruzamentos com outros parentais contrastantes para o CABMV [KVx640 e KVx396-4-5-2D (resistentes); KVx61-1 (moderadamente suscetível), KVx30-309-6G e Gorom Local (susceptíveis)] observando-se que a resistência é controlada por dois genes dominantes.

Investigações da resistência a múltiplas viroses também foram relatadas para o feijão-caupi (Lima et al., 2011). Por exemplo, Barros et al. (2013) cruzaram variedades resistentes (TE 97-309G-9 e Patativa) ao CPSMV e ao CABMV com cultivares sensíveis (BR3-Tracuateua, BRS-Urubuquara, BRS-Novaera, BRS Guariba e Pretinho), a fim de desenvolver cultivares essencialmente derivadas e novas. Os resultados revelaram que a resistência para ambos os vírus é monogênica recessiva, apresentando uma frequência esperada de 15:1 (susceptíveis:resistente) para ambas as viroses (Barros et al., 2013).

As estratégias para resistência viral têm sido classificadas principalmente como (1) presença do gene de resistência (*R*, *Resistance*) na planta hospedeira, que reconhece especificamente os produtos do gene *Avr* de avirulência viral (do inglês, *Avirulence*), (2) resistência derivada de patógeno (PDR - *pathogen derived resistance*) e (3) o acúmulo de proteínas PR relacionadas à patogênese (*Pathogenesis Related*) (Kumar et al., 2017). Muitos genes *R* têm sido identificados e usados para obtenção de resistência contra viroses.

Como a maioria das proteínas virais, as proteínas replicase de RNA podem atuar como gatilho na indução de um mecanismo denominado suscetibilidade desencadeada pelo efector (ETS, *effector-triggered susceptibility*) e imunidade desencadeada pelo efector (ETI, *effector-triggered immunity*), culminando na respostas hipersensível (HR, *hypersensitive response*). No feijão-caupi, um exemplo bem caracterizado deste processo ocorre em resposta ao CMV (Nasu et al., 1996). Muitas cepas de CMV induzem HR em folhas inoculadas do feijão-caupi, uma vez que o gene dominante *R*, localizado no locus *Cry*, reconhece a proteína 2a, um componente viral da replicase, que atua como ETS independentemente da sua atividade como replicase (Hu et al., 2012). De modo geral, a HR envolve respostas subjacentes à detecção do patógeno, incluindo alterações nos fluxos de íons, ativação das vias de sinalização (especialmente cascatas de quinase),



extensa reprogramação transcricional, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), produção de óxido nítrico (NO – *Nitric Oxide*) e recrutamento de fitormônios, entre outras (Soosaar et al., 2005).

Nas infecções virais, além das respostas de resistência dominantes mediadas pelos genes *R*, a planta pode apresentar uma resistência recessiva baseada na perda de função de uma proteína hospedeira necessária ao vírus para completar seu ciclo biológico. Durante o ciclo infeccioso, os vírus interagem com fatores do hospedeiro (também chamados de fatores de suscetibilidade), que incluem diversas proteínas críticas para seu estabelecimento dentro da célula. A incapacidade de interação entre estes fatores e o vírus leva à resistência. Por se tratar da perda da função dos fatores de suscetibilidade, a resistência é obrigatoriamente recessiva, uma vez que a presença de uma cópia simples do alelo dominante expressa a proteína (Truniger & Aranda, 2009; Mandadi & Scholthof, 2013). Esse é o caso da resistência recessiva relacionada a fatores de início da tradução em eucariotes (eIFs – *eukaryotic Initiation Factors*), principalmente aos da família eIF4E e eIF4G, que fazem parte do complexo eIF4F (Revers & Nicaise, 2014). Tais fatores participam do processo de recrutamento dos ribossomos e mRNAs antes do início da tradução e interagem com a estrutura cap em transcritos eucariotos. Os potyvirus apresentam um genoma formado por uma fita simples de RNA orientado no sentido positivo (ssRNA+), com uma cauda poli-A na região 3' e uma proteína VPg (*Viral Protein nanome-linked*) na região 5' a qual está envolvida na interação com os eIF4Es do processo de tradução. No entanto, muitos deles apresentam especificidade com determinadas isoformas e diferem nas suas habilidades de interação com eIF4E, o que pode afetar na formação do complexo VPg-eIF4E e, conseqüentemente, o sucesso da infecção viral, conferindo resistência recessiva à planta (Truniger & Aranda, 2009; Montero et al., 2015; Schmitt-Keichinger, 2019).

## 8. Conclusões e perspectivas

O presente capítulo mostra que esforços significativos dos grupos de pesquisa nacionais têm sido desenvolvidos especialmente para a identificação de fontes de resistência (ou imunidade) a viroses importantes do feijão-caupi. Infelizmente, nem sempre os acessos imunes ou resistentes apresentam as características agrônômicas ou a produtividade almeçadas pelos produtores, motivo pelo qual é importante a identificação dos padrões de herança e uso dessas informações para o melhoramento.

Um desafio importante envolve a plasticidade e variabilidade genética dos fitovírus associados à cultura, aqui evidenciada pela frequente resposta contrastante de algumas variedades a inóculos obtidos de diferentes plantas hospedeiras ou origens geográficas.

O uso de marcadores moleculares associados à seleção assistida ou recorrente também tem sido limitado na cultura. Espera-se que esse cenário seja alterado, especialmente após a recente disponibilização do genoma completo do feijão-caupi e de outros dados ômicos em fase de análise e publicação, como ocorreu com outras leguminosas, como a soja e o feijão-comum, por exemplo.

Deve-se ter em mente que, como outras culturas, o feijão-caupi também tem sido afetado por estresses abióticos, com ênfase para a seca e a salinidade, fatores que podem ser agravados em decorrência das mudanças climáticas em curso. Sabe-se que tais mudanças têm efeito direto na ocorrência e severidade de doenças nas lavouras, podendo afetar a epidemiologia da doença, com aumento de epidemias, as interações planta-patógeno, o ciclo de vida do patógeno, a expressão da resistência do hospedeiro, além de favorecer o desenvolvimento de novas raças virais.

Entre os fatores positivos, destaca-se a rusticidade e a maior variabilidade genética do feijão-caupi, comparativamente a outras leguminosas cultivadas, inclusive considerando-se a riqueza de acessos em bancos genéticos nacionais.

## 9. Referências bibliográficas

- AMORIM, L.L.B. **Análise estrutural e funcional do genoma do Feijão-caupi: mapa genético e elementos transponíveis**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- ANDRADE, G.P.; PIO-RIBEIRO, G. Estratégias e métodos aplicados ao controle de fitoviroses. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife-PE: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001, p. 171-181.
- ARAGÃO, F.J.L. et al. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral anti-sense RNAs showed delayed and attenuated symptoms of bean golden mosaic geminivirus. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 491-499, 1998.
- ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature. Biotechnology**, v. 27, p. 1086-1088, 2009.
- ARAGÃO, F.J.L.; NOGUEIRA, E.O.P.E.L.; TINOCO, M.L.P.; FARIA, J.C. 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.
- ANTOINE, B. et al. Diallel analysis of cowpea populations for resistance to Cowpea aphid-borne mosaic virus disease (CABMV) in Burkina Faso. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v.9, p. 90-97, 2017.
- APPIAH, F.; ASIBUO, J.Y.; KUAH, P. Physicochemical and functional properties of bean flours of three cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties in Ghana. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 2, p. 100-104, 2011.
- ASARE-BEDIAKO, E.; ESSANDOH, V.A.; ASARE, A.T. Phenotypic and serological evaluation of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes for resistance to viral infection under field conditions. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 10, n. 7, p. 169-177, 2018.
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em caupi. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, p. 274-278, 2005
- ASSUNÇÃO, I.P. et al. Diversidade genética de begomovírus que infectam plantas invasoras na região nordeste. **Planta Daninha**, v. 24, n.2, p.239-244, 2006.
- BARRO, A. et al. Selection and validation of marker set for selection of resistant varieties of cowpea to Cowpea Aphid-borne Mosaic Virus (CABMV) in Burkina Faso. **Journal of Applied Biosciences**, v. 128, n. 1, p. 12953-12963, 2018.

- BARROS, G.B. et al. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao Cowpea severe mosaic virus e ao Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.2, p.130- 136, 2013.
- BENKO-ISEPPON, A.M. et al. Mendel e suas exceções à luz das ômicas e da biologia de sistemas. In: **ARAGÃO, F.J.L.; MOREIRA, J.R.. Mendel: 150 anos depois**. Embrapa Edições. Brasília, DF, 2017. p. 502.
- BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 717-726, 2007.
- BOUKAR, O.; FATOKUN, C.A.; HUYNH, B.L.; ROBERTS, P.A.; CLOSE, T.J. Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. **Front Plant Science**, v. 7, p. 1–13, 2016.
- CAMARÇO, R.F.E.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; ANDRADE, E.C.; LIMA, J.A.A. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 239-244, 2009.
- CANUTO, G.A.B. et al. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.
- CHAMARTHI, S.K.; BELKO, N.; TOGOLA, A.; FATOKUN, C.A.; BOUAR, O. Genomics-assisted breeding for drought tolerance in cowpea. In: RAJPAL, V.; SEGHAL, D.; KUMAR, A.; RAINA, S. **Genomics assisted breeding of crops for abiotic stress tolerance**, vol. 2. New York, USA: Springer, 2019, p. 187-209.
- CRUZ, A.R.R.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-based enhanced resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, p. 831–837, 2014.
- COULIBALY, S.; PASQUET, R.; PAPA, R. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 358-366, 2002.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. v. 7, n. 12, p. 1-33, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 16 de set 2020.
- DAS, D.K. Expression of a Bacterial Chitinase (ChiB) Gene Enhances Resistance against Erysiphae polygona Induced Powdery Mildew Disease in the Transgenic Black Gram (*Vigna mungo* L.) (cv. T9). **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 1759-1770, 2018.
- de JESÚS-PIRES, C. et al. Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications. **Current Protein and Peptide Science**. v. 21, p. 36–51, 2020.
- DHANASEKAR, P.; REDDY, K.S. Serological Screening of Cowpea Genotypes for Resistance against Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus Using DAS-ELISA. **Asian Journal of Plant Pathology**, v. 9, p. 83-90, 2015.
- DIANESE, E.C.; MEDEIROS, R.B. Diagnose dos virus de plantas. In: MEDEIROS, R.B.; RESENDE, R.O.; CARVALHO, R.C.P.; COSTA, C.L. SGRO, J.Y. **Virologia vegetal: conceitos, fundamentos. Classificação e controle**. Brasília: UNB, 2015, p. 475-511.
- DINESH, H.B. et al. Genetic analysis and marker assisted backcrossing for transfer of mosaic virus resistance in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Legume Research- An International Journal**, v. 41, n. 5, p. 663-668, 2018.
- EIRAS, M.; DIANESE, E.C.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. Resistência genética de plantas a vírus. In: DALLAGNOL, L.J. (org.). **Resistência genética: de plantas a patógenos**. PELOTAS: EDITORA UFPEL, 2018. p. 296-358.

- EMBRAPA MEIO-NORTE. Catálogo de cultivares de feijão-caupi. Disponível em: <https://www.embrapa.br/meio-norte/cultivares>. Acesso em 11/07/2020:
- EMBRAPA MEIO-NORTE. A cultura do feijão-caupi no Brasil. 71 p, 2016.
- FAOSTAT, *Statistical data base*. Rome: Food and Agricultural Organizations of the United Nations. Acesso em: 19 junho 2020.
- FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. **Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2019. 24 p.
- FALEIRO, F.G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F.G.; ANDRADE, S.R.M.; REIS JÚNIOR, F.B. **Biociologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 55-118.
- FARIA, J.C. et al. Partial resistance to bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line expressing a mutant rep gene. **Plant Science**, v. 171, p. 565-571, 2006.
- FARIA, J. et al. Golden Mosaic of Common Beans in Brazil: Management with a Transgenic Approach. **APS Features**, 2016.
- FATOKUN, C.A.; DANESH, D.; MENANCIO-HAUTEA, D.I.; YOUNG, N.D. A linkage map for cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] based on DNA markers (2N=22). In: O'BRIEN J.S. (ed) Genetic maps 1992. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1993, p 6256-6258.
- FREIRE-FILHO, F.R. et al. **Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.
- GANGULI, S.; DEY, A.; BANIK, R.; KUNDU, A.; PAL, A. Analyses of MYMIV-Induced transcriptome in *Vigna mungo* as revealed by next generation sequencing. **Genomics Data**, v. 7, p. 226-228, 2016.
- GARCIA, J.A.; HILLE, J.; GOLDBACH, R. Transformation of cowpea *Vigna unguiculata* cells with an antibiotic resistance gene using a Ti-plasmid-derived vector. **Plant Science**, v. 44, p. 37-46, 1986.
- GIOI, T.D.; BOORA, K.S.; CHAUDHARY, K. Identification and characterization of SSR markers linked to yellow mosaic virus resistance genes in cowpea (*Vigna unguiculata*). **International Journal of Plant Research** v. 2, p. 1-8, 2012.
- HORN, L.; SHIMELIS, H.; LAING, M. Participatory appraisal of production constraints, preferred traits and farming system of cowpea in the northern Namibia: implication for breeding. **Legume Research Journal**, v. 38, p. 691-700, 2015.
- HUGHES, J.D.A.; SHOYINKA, S.A. **Overview of viruses of legumes other than groundnut in Africa in plant virology in sub-Saharan Africa**. In: HUGHES, J.D.A; ODU, B. (eds) **Proceeding of a conference on Plant Virology in Sub Saharan Africa**, IITA, Ibadan, Nigeria, 2003, p.553-568.
- JASROTIA, R. S. et al. Development of transcriptome based web genomic resources of Yellow Mosaic Disease in *Vigna mungo*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, p. 767-777, 2017.
- JI, J. et al.. Genome Editing in Cowpea *Vigna unguiculata* Using CRISPR-Cas9. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-13, 2019.
- KAPILDEV, G. et al. High-efficient Agrobacterium-mediated in planta transformation in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). **Acta Physiology Plant**, v. 38, n. 205, p. 1-13, 2016.



- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. Os vírus, esses terríveis inimigos. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, n. 23, p. 18-24, 2004.
- KIDO, E. A. et al. Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stresses using SuperSAGE. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, p. 643–656, 2011.
- KUNDU, A.; SINGH, P.K.; DEY, A.; GANGULI, S.; PAL, A. Complex molecular mechanisms underlying MYMIV-resistance in *Vigna mungo* revealed by comparative transcriptome profiling. **Scientific Reports**, v. 9, p. 8858-8868, 2019.
- KUMAR, S.; TANTI, B.; PATIL, B.L.; MUKHERJEE, S.K.; SAHOO, L. RNAi-derived transgenic resistance to Mungbean yellow mosaic India virus in cowpea. **PLoS One**, v. 12, p. 1-20, 2017.
- LANZA, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 21, p. 97-108, 2000.
- LEÃO, U. S. **Seleção para caracteres do grão e resistência a vírus em feijão-caupi de tegumento branco rugoso**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Piauí (UFPI), 2014.
- LEÃO, U.S. et al. Selection of phenotypic traits and resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seeds with rugose white coat. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, p. 470 - 481, 2016.
- LIMA, J.A.A.; SITTO LIN, I.M.; LIMA, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO F.R; LIMA J.A.A; RIBEIRO V.Q. (eds.) **Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p 404-459.
- LIMA, C.J.G.S.; OLIVEIRA, F.A.; MEDEIROS, J.F. OLIVEIRA, M.K.T.; ALMEIDA JÚNIOR, A.B. Resposta do feijão-caupi a salinidade da água de Irrigação. **Revista Verde Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 79-86, 2007.
- LIMA, J.A.A.; SILVA, A.K.F.S; ARAGÃO, M.L.; FERREIRA, N R.A; TEÓFILO, E.M. Simple and multiple resistances to viruses in cowpea genotypes, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, 1432-1438, 2011.
- LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.Q.; SILVA, A.K.F.; ARAGÃO, M.L. Biological stability of a strain of *Cowpea severe mosaic virus* over 20 years. **Ciência Agrônômica**, v. 43, p. 105-111, 2012.
- LIMA, L.F. **Herança e incorporação de gene de resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em genótipos de feijão-caupi da subclasse manteiga**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), 2019.
- LONARDI, S. et al. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Plant Journal**, v. 98, p. 767–782, 2019.
- LUCAS, M.R.; DIOP, N.N.; WANAMAKER, S.; EHLERS, J.D.; ROBERTS, P.A.; CLOSE, T.J. Cowpea-soybean synteny clarified through and improved genetic map. **Plant Genome Journal**, v. 4, n.3, p. 218-225, 2011.
- MARTÍN, S.; ELENA, S.F. Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. **Journal of General Virology**, v.90, p.2815-2820, 2009.
- MARTINS, T.F. et al. Identification, characterization, and expression analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) miRNAs in response to Cowpea Severe Mosaic Virus (CPSMV) challenge. **Plant Cell Reports**, v. 39, p. 1061-1078, 2020.
- MENÉNDEZ, C. M.; HALL, A. E.; GEPTS, P. A genetic linkage maps of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, n. 8, 1210-1217, 1997.
- MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, v. 1, n. 1, p. 19–35, 2009.



- MUCHERO, W. et al. A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and synteny based on EST-derived SNPs. **Proceedings of the national academy of sciences**, n. 43, p. 18159-18164, 2009.
- MUNGUTI, F. et al. Transcriptome sequencing reveals a complete genome sequence of Cowpea aphid-borne mosaic virus from passion fruit in Kenya. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, p. e01607-18, 2019.
- MUÑOZ-AMATRIÁIN, M. et al. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. **Plant Journal**, v. 89, p. 1042–1054, 2017.
- NGOC LAN, N.T.; THAO, H.T.; SON, L.V.; HOANG MAU, C. Overexpression of VrPDF1 gene confers resistance to weevils in transgenic mung bean plants. **PeerJ Preprints**, p. 1-11, 2017.
- NOGUEIRA, M.S.R.; BRIOSO, P.S.T.; RIBEIRO, V.Q.; FREIRE-FILHO, F.R. **Incorporação de genes de resistência a vírus em cultivares de feijão-caupi**. IV CONAC, Congresso Nacional de feijão-caupi. p. 177, 2016.
- OLIVEIRA, C. R. R. et al. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. **Bragantia**, v. 71, n. 1, p.59-66, 2012.
- ORAWU, M.; MELIS, R.; LAING, M.; DERERA, J. Genetic inheritance of resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in cowpea. **Euphytica**, v. 189, p. 191-201, 2013.
- OUÉDRAOGO, J.T. et al. Improved genetic map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical makers and biological resistance traits. **Genome**, n. 45, p. 175-188, 2002.
- PAIVA, A.L.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; DE SOUZA, G.A.; VASCONCELOS, I.M. Label-free proteomic reveals that cowpea severe mosaic virus transiently suppresses the host leaf protein accumulation during the compatible interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Journal of Proteome Research**, v. 15, p. 4208–4220, 2016.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, M.F.; ANDRADE, G.P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.215-216.
- PAZ, C.D. et al. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoros e determinação de fontes de resistência em caupi. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.4, p.285-288, 1999.
- PEPELKA, J.C.; GOLLASCH, S.; MOORE, A.; MOLVIG, L.; HIGGINS, T.J.V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 304-312, 2006.
- ROCHA, M.M.; ARAÚJO LIMA, J.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROSAL, C.J.S. Resistência de genótipo de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) de tegumento branco a isolados de vírus da família *Bromoviridae*, *Comoviridae* e *Potyviridae*. **Revista Científica Rural**, v.8, n.1, p.85-92, 2003.
- RODRIGUES, M.A.; SANTOS, C.A.; SANTANA, J.R. Mapping of AFLP loci linked to tolerance to *Cowpea golden mosaic virus*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 4, p. 3789-3797, 2012.
- SAHA, B. et al. Enhanced exudation of malate in the rhizosphere due to At ALMT1 overexpression in blackgram (*Vigna mungo* L.) renders increased aluminum tolerance. **Plant Biology**, 2020.
- SAHOO, D.P. et al. Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (NHX1) gene. **Molecular Breeding**, v. 36, p. 1-15, 2016.
- SALAUDEEN, M.T. Growth and yield responses of some cowpea accessions to *Cucumber mosaic virus* infection. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v.62, p. 289-298, 2016.

- SANTOS, M.F.; SOUSA, M.B.; PIRES, C.J.; SILVA, K.J.D.; ROCHA, M.M. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte prostrado e semi-prostrado por marcadores ISSR. In: Congresso Nacional de Feijão Caupi, 3, 2013, Pernambuco. Anais... Pernambuco, 2013.
- SANTOS, L.A.C.; SILVA, D.M.P.; OLIVEIRA, I.A.; PEREIRA, C.E.; CAMPOS, M.C.C. Crescimento de cultivares de feijão-caupi em solo de terra firme e várzea. **Ambiência Guarapuava**, v. 13, n. 1, p. 261-270, 2017.
- SANTOS, J.R.P.; NDEVE, A.D.; HUYNH, B.L.; MATTHES, W C.; ROBERTS, P.A. QTL mapping and transcriptome analysis of cowpea reveals candidate genes for root-knot nematode resistance. **PLoS One**, v. 13, e0189185, 2018.
- SASTRY, K.S.; MANDAL, B.; HAMMOND, J.; SCOTT, S.W.; BRIDDON, R.W. **Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids**, 1st ed.; Springer India: New Delhi, India, 2019.
- SHOYINKA, S.A.; THOTTAPPILLY, G.; ADEBAYO, G.G.; ANNO-NYAKO, F.O. Survey on cowpea virus incidence and distribution in Nigeria. **International Journal of Pest Management**, v. 43, p. 127-132, 1997.
- SILVA, S. J. C. et al. Species diversity, phylogeny and genetic variability of begomovirus populations infecting leguminous weeds in northeastern Brazil. **Plant Pathology** v. 61, p. 457-467, 2011.
- SILVA, J. A.; COSTA, A. F.; ISEPPON, A. M. B.; NICOLI, A.; GUIMARAES, L. M. P. **Herança da resistência do feijão-caupi ao CABMV**. 51º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, p. 755, 2019.
- SINGH, P.K.; PATEL, A.; GANGULI, S.; PAL, A. Molecular modeling and simulation of three important components of plant pathogen interaction cascade in *Vigna mungo*. **Bioinformatics**, v. 13, p. 323–326, 2017.
- SPRIGGS, A. et al. Assembled genomic and tissue-specific transcriptomic data resources for two genetically distinct lines of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Gates Open Research**, v. 2, p. 1–13, 2018.
- TRINKS, D. et al. Suppression of RNA silencing by a Geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **Journal of Virology**, v. 79, p. 2517–2527, 2005.
- VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 206–220, 2005.
- WANG, Y.; GABA, V.; YANG, J.; PALUKAITIS, P.; GAL-ON, A. Characterization of synergy between cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. **Phytopathology**, v.92, p.51-58, 2002.
- XU, P. et al. Genomic regions, cellular componentes and gene regulatory basis underlying pod leght variations in cowpa (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 547-557, 2017.
- YAO, S. et al.. The *Vigna unguiculata* Gene Expression Atlas (Vugea) from de novo assembly and quantification of Rna-seq data provides insights into seed maturation mechanisms. **Plant Journal**, v. 88, p. 318–327, 2016.

*Jadson Araújo da Silva  
Ana Paula Oliveira de Barros  
Jonas Alberto Rios  
Kamila Câmara Correia  
Sami Jorge Michereff*

## 1. Introdução

O uso de variedades resistentes é o método mais eficiente, barato e ecologicamente correto de manejar doenças de plantas (Van der Plank, 1968; McDonald, 2014; Mundt, 2014; Brown, 2015; Willocquet et al., 2017). A adoção desse método requer poucas alterações nas práticas utilizadas em condições de campo. Além disso, o uso dessas variedades não necessita de alto nível de informação técnica e de infraestrutura dos produtores para implementar outras ferramentas de manejo de doenças como no caso de controle químico e sistemas de previsão de doenças. O conhecimento tecnológico necessário para manejar doenças de plantas pela resistência da planta hospedeira está embutido nas sementes. A resistência varietal é a expressão em escala de campo dos genes de resistência da planta hospedeira, que são combinados em um único genótipo hospedeiro. Duas grandes categorias de resistência da planta hospedeira são geralmente consideradas: resistência qualitativa (também chamada de resistência completa) e resistência quantitativa (também conhecida como resistência parcial) (Willocquet et al., 2017).

Durante o ciclo de vida, as plantas enfrentam vários desafios para se defender do ataque de fungos, oomicetos, bactérias e vírus, entre outros agentes patogênicos. Como estratégia de defesa contra esses estresses bióticos, as plantas possuem um sistema imunológico natural, dinâmico e inato, que detecta com eficiência patógenos em potencial e inicia uma resposta de defesa na forma de resistência basal e/ou defesa mediada por genes de resistência. Estes genes de resistência frequentemente estão associados a uma resposta de hipersensibilidade (Gill et al., 2015). Dependendo da natureza das interações planta-patógeno, as plantas geralmente apresentam dois tipos de resistência: a resistência de não-hospedeiro (RNH) e resistência de hospedeiro (RH). Estas resistências são conservadas e incluem vários mecanismos: i) mecanismos estruturais (cutícula, estômatos, pilosidade, tricomas, parede celular espessa) que servem como barreiras físicas aos microrganismos e ii) mecanismos bioquímicos (produção de compostos fenólicos, alcalóides/saponinas, lactonas insaturadas, glicosídeos, fototoxinas, proteínas/peptídeos). Estes mecanismos podem ser constituintes morfofisiológicos da planta ou serem produzidos em função da detecção do microrganismo invasor (Dallagnol & Araújo Filho, 2018).

Os fitopatógenos, por sua vez, utilizam estratégias para quebrar a RNH. As barreiras estruturais, por exemplo, podem ser quebradas pela ação de enzimas que as degradam facilitando a entrada do patógeno na planta. Uma vez que o patógeno consegue vencer a barreira de RNH, a planta passa a ser hospedeira do patógeno. Mesmo sendo hospedeira do patógeno, a planta ainda assim apresentará uma certa resistência ao patógeno, podendo dentro de uma mesma espécie haver variação quanto a intensidade dos sintomas, ou seja, uma resistência em maior ou menor nível. Essa resistência depende da constituição genética da planta é conhecida como resistência de hospedeiro (RH) (Camargo, 2018). A RH envolve pode ser dividida em dois tipos: resistência quantitativa e a resistência qualitativa. O conceito de resistência quantitativa, na maioria das vezes, está atrelado a um nível incompleto ou parcial do fenótipo de resistência. A resistência quantitativa também é denominada de resistência poligênica, geral, parcial, de campo, durável ou ainda resistência conferida por genes de efeitos menores (Camargo, 2018). Uma das características da resistência quantitativa é a distribuição contínua entre fenótipos resistentes e suscetíveis em uma progênie, geralmente resultante da segregação de alelos com efeitos variáveis em vários loci. A resistência quantitativa pode influenciar vários estágios do ciclo de infecção, incluindo germinação de esporos, penetração no tecido do hospedeiro, colonização do tecido interno do hospedeiro, a duração dos períodos latentes e infecciosos, e a esporulação (Van der Plank, 1963; 1968). Esses processos são chamados de “componentes de resistência parcial” e regulam a epidemia que pode resultar de uma cadeia de ciclos de infecção durante a estação de crescimento do hospedeiro. Na resistência parcial, o fenótipo é o resultado de diferentes fases do processo de infecção em que ocorrem as respostas de resistência, e cada fase é considerada um componente da resistência que contribui para a resposta geral (Willoquet et al., 2017).

A resistência qualitativa, por sua vez, é a resistência controlada por genes R, os quais estão envolvidos no reconhecimento de efetores patogênicos, é uma resistência monogênica, também citada como resistência raça-específica ou mediada por genes de efeito menor. Apresenta um nível completo ou alto de resistência ou a uma segregação bimodal de fenótipos em uma progênie classificando os indivíduos em duas categorias distintas: resistente e suscetível (Pilet-Nayel et al., 2017). O que caracteriza a resistência qualitativa é o fato de a herança estar baseada em um ou dois genes de efeito principal que segregam de acordo com classes fenotípicas discretas, de acordo com os princípios mendelianos, independentemente do tamanho do seu efeito sobre o fenótipo. Desta forma, é considerado mendeliano e qualitativo somente quando o efeito fenotípico de um gene é grande o suficiente para acompanhar sua segregação nos descendentes (Niks, et al., 2015). A resistência qualitativa é o principal tipo de resistência usada em agrossistemas para o manejo de doenças (Stuthman et al., 2007; Lannou, 2012; Brown, 2015; Zhan et al., 2015). O número de genes, o efeito progressivo e incompleto da resistência parcial e, portanto, a pressão de seleção mais baixa nas populações de patógenos, explica por que a resistência quantitativa é em geral mais durável do que a resistência qualitativa (Brown, 2015; Mundt, 2014; Niks et al., 2015; Willocquet et al., 2017). Em geral, a resistência qualitativa é governada por um gene de resistência principal e evita a multiplicação da população do patógeno, resultando em uma não epidemia. A eficiência teórica muito alta da resistência qualitativa também

é a razão pela qual ela exerce uma pressão seletiva muito forte nas populações dos patógenos. Como resultado, a resistência qualitativa tende a ser suplantada devido a variabilidade encontrada em populações de patógenos (McDonald & Linde, 2002; Zhan et al., 2015).

Enquanto a resistência qualitativa é expressa na escala individual (planta) (uma lesão que pode se desenvolver, ou não), a resistência quantitativa é expressa na escala populacional (epidêmica) (Parlevliet, 1979). A resistência quantitativa é, geralmente, determinada por vários genes de resistência menor cuja expressão reduz a eficiência de um ou vários processos envolvidos no ciclo da doença do patógeno, resultando em epidemias com velocidades reduzidas (Willocquet et al., 2017).

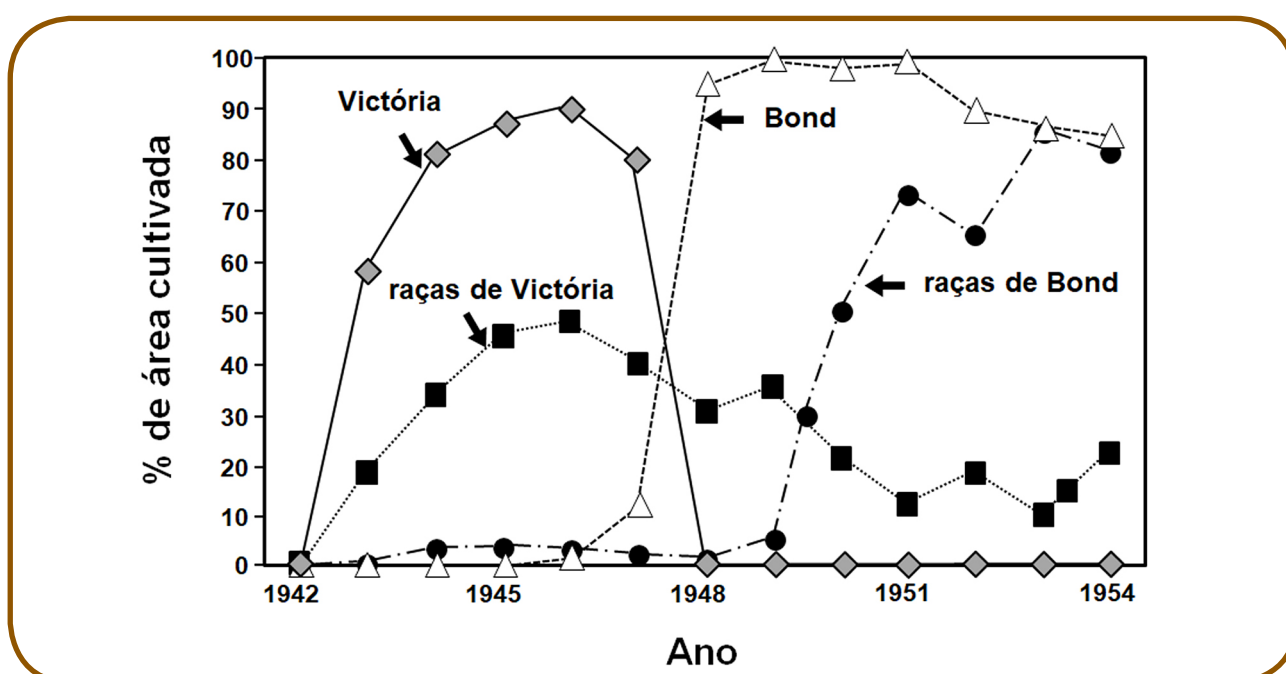
## 2. Durabilidade da resistência

Identificar no germoplasma de uma espécie hospedeira, fatores que mantenha a resistência de plantas contra patógenos é uma tarefa difícil. Uma exceção é talvez o paradigma poligênico (quantitativa) x monogênico (qualitativa), em que se espera que a resistência quantitativa, que é governada por vários genes, seja mais durável comparado à resistência qualitativa, que tem ação de um único gene. No entanto, esse conceito tem sido contestado por vários estudos que demonstram que a resistência qualitativa, mediada pelo gene R, às vezes pode ser duradoura (Baker, 1966; Hooker, 1967; Ellingboe, 1983). De acordo com Johnson (1984), não existe uma relação estreita entre o nível de resistência e sua durabilidade. Tanto a resistência qualitativa quanto a resistência quantitativa podem ser duráveis. Do ponto de vista epidemiológico, as causas subjacentes da durabilidade da resistência introduzida nas cultivares permanece efetiva, até o momento em que o ambiente se torne mais favorável ao desenvolvimento da doença associado a evolução do patógeno em variabilidade, conseguindo suplantando a resistência de determinada cultivar. Em culturas que apresentam alto potencial produtivo, o manejo das doenças é realizado principalmente pelo uso de genes de resistência (R), contudo, à medida que novas variedades de plantas resistentes se tornam amplamente utilizadas, sua eficácia em resistir às doenças começa então a ser combatidas por novas variantes dos patógenos que vão surgindo nas populações locais. Através de um processo de pressão de seleção, a frequência dos novos mutantes começam a aumentar, devido à sua alta adaptabilidade e facilidade em se espalhar para outras áreas de cultivo (Zhan et al., 2015). Diversas estratégias de melhoramento têm sido desenvolvidas com a finalidade de melhorar a resistência das cultivares visando a durabilidade da resistência (Brun et al., 2010; Lo Iacono et al., 2013; Rimbaud et al., 2018). Como definiu Johnson (1981), a resistência só é importante se for durável e ser permanecer eficaz por muito tempo em um ambiente favorável à ocorrência da doença.

No início do seu desenvolvimento, uma nova variedade com grande resistência genética deve ser totalmente resistente a uma doença específica. Provavelmente, uma variedade com esta característica é mais popularmente utilizada pelos agricultores devido aos altos rendimentos que ela pode proporcionar. No entanto, em termos prá-



ticos, a popularidade de uma variedade com grande resistência genética pode ser a principal razão para sua eventual perda de resistência (Parry, 1990). O ciclo conhecido como “boom and bust”, proposto por Priestley (1978), descreve o que acontece numa população de plantas quando o uso generalizado de uma determinada cultivar com resistência a um único gene importante é introduzido em um agroecossistema para controlar uma doença (Figura 1). Se a cultivar resistente tiver bons caracteres agrônômicos e for amplamente aceita pelos agricultores por ser resistente à doenças, a cultivar se espalha e é plantada em uma grande área (*boom*). Porém, quando a doença supera esse gene de resistência, os patótipos virulentos se espalham (por fluxo gênico ou genotípico) e infectam todos os campos cultivados com a cultivar resistente, causando uma epidemia e levando à perda de eficácia do gene de resistência. Com a resistência quebrada, muitas variedades simultaneamente se tornam suscetíveis. Os agricultores param de plantar a cultivar e o gene de resistência correspondente diminui em frequência (*bust*). O ciclo recomeça com a introdução de uma nova cultivar resistente.



**Figura 1.** Exemplo clássico do ciclo “boom and bust”. Porcentagem de área de aveia plantada com as cultivares Victoria e Bond, portadoras de genes de resistência à ferrugem e frequência relativa de raças de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, capazes de quebrar a resistência de ambas cultivares (adaptado de Browning & Frey, 1969).

A probabilidade de alcançar resistência mais duradoura pode ser obtida a partir de dados importantes providos também de outras áreas da ciência, como por exemplo, genética de populações, tecnologias de genotipagem de alto rendimento, sequenciamento de genoma combinados com o conhecimento da genética e dos fatores moleculares que determinam a resistência de plantas e virulência dos fitopatógenos (Michelmore et al., 2013; Mundt, 2014). Um claro avanço na incorporação de outros campos da ciência no estudo da resistência tem sido a elucidação de teorias que estão há décadas sem respostas. Até pouco tempo, não se sabia por que genes dominantes

que condicionam a avirulência existem nas populações do patógeno. Com o advento da genômica computacional, foi demonstrado que esses genes servem como efetores de virulência de patógenos com redundância substancial entre os genes efetores (Jones & Dangl, 2006; Cunnac et al., 2011). O estudo da durabilidade da resistência já foi dominado por dogmas rígidos e visões concorrentes dos mecanismos de resistência e estratégias de implantação de resistência (por exemplo, resistência horizontal versus vertical, piramidamento de genes versus misturas). Hoje, esses dogmas foram ampliados para uma perspectiva mais madura. Há o reconhecimento de que todas as abordagens para atingir a durabilidade têm um valor potencial em diferentes circunstâncias e, de fato, podem se complementar quando usadas em conjunto (Mundt, 2014). Há também diversos modelos epidemiológicos para se estudar a resistência qualitativa em plantas (van den Bosch & Gilligan, 2003; Lo Iacono et al., 2013; Fabre et al., 2015). Muitos destes modelos foram construídos com dados limitados, porém pretendendo descrever padrões gerais de interação entre hospedeiros e patógenos. Independente do modelo, os tipos de interação entre hospedeiros e patógenos, particularmente em relação à durabilidade da resistência, é tão diverso que nenhum modelo único pode representá-los, porém a medida que o conhecimento sobre os mais diversos métodos e modelos se acumulam, pode-se esperar que os objetivos dos métodos para criação de resistência duradoura sejam alcançados (Johnson, 1984).

Em termos epidemiológicos, as características distintivas das resistências qualitativa e quantitativa é que a primeira atrasa o início da epidemia, enquanto a segunda diminui a taxa de progresso da epidemia (Van der Plank, 1978). No entanto, está claro que ambos os tipos de resistência se complementam, visando um maior controle das doenças no campo. Por mais que o inóculo inicial seja reduzido (ação da resistência qualitativa), o patógeno será melhor controlado se a taxa de infecção subsequente for lenta, ou seja, se também houver resistência quantitativa. Isso porque um dos efeitos epidemiológicos associados ao uso da resistência quantitativa, e talvez o principal, é a redução da quantidade de inóculo inicial. Essa redução no início da epidemia é determinante, pois permite reduzir também os danos causados pelo patógeno às culturas, o que faz também com que os produtores passem a utilizar a resistência quantitativa mais intensivamente no campo (Rios & Debona, 2018).

A herança monogênica por si só não é suficiente para qualificar uma resistência como qualitativa. Às vezes, o efeito do gene é relativamente fraco no locus de caractere quantitativo (QTL), que torna-se necessário uma abordagem mais ampla de mapeamento QTL, para detectar sua presença, e o efeito é muito pequeno para seguir sua segregação na progênie, portanto, não é um gene importante (Niks et al., 2015). Enfim, não há uma característica simples pela qual sempre se possa discernir a resistência poligênica da monogênica sem falhar. Algumas variedades de plantas podem apresentar genes para resistência qualitativa, e ao mesmo tempo alto nível de resistência parcial (quantitativa) (Wang et al., 1994). Somente um conhecimento sólido dos sistemas patógeno-hospedeiro em questão é uma boa garantia de que se usa a resistência mais apropriada para a situação em questão (Parlevliet, 1979).

### 3. Componentes epidemiológicos de resistência

Nos programas de melhoramento, a detecção precisa da resistência a doenças requer seleção cuidadosa das variáveis a serem medidas, bem como dos métodos de análise de dados (Parlevliet, 1979). Nesse contexto, os componentes de resistência parcial têm sido analisados para uma série de patossistemas, principalmente envolvendo manchas foliares, como ferrugens, míldios, oídios, antracnoses e cercosporioses (Van der Plank, 1963, 1968; Parlevliet, 1979, 2002; Berger et al., 1997; Vale et al., 2001; Kranz, 2002; St Clair, 2010; Lannou, 2012; Brown, 2015; Niks et al., 2015; Willocquet et al., 2017)

A quantificação dos componentes de resistência apoia, de forma eficiente, a avaliação de genótipos de plantas que apresentam resistência parcial, um tipo de resistência que afeta vários estágios do ciclo de infecção. A análise dos componentes de resistência é baseada na dissecação fenotípica da resistência em seus componentes, que classicamente incluem: período de incubação, período latente, período infeccioso, eficiência de infecção, taxa de expansão da lesão, capacidade de esporulação, tempo de infecção, intensidade da doença e taxa de infecção, dentre outros (Kranz, 2002).

#### 3.1. Período de incubação

O período de incubação caracteriza-se pelo intervalo de tempo (horas, dias, semanas, etc.), passados entre a inoculação do patógeno e o surgimento dos primeiros sintomas visíveis da doença no hospedeiro. Para determinar o período incubação, plantas inoculadas são avaliadas diariamente, até ser observado o surgimento dos primeiros sintomas. O grau de resistência quantitativa de cultivares tem relação diretamente proporcional com o período de incubação. Quanto maior a resistência da cultivar ao ataque do patógeno, maior o período de incubação do patógeno (Parlevliet, 1979).

#### 3.2. Período latente

O período latente caracteriza-se pelo intervalo de tempo (horas, dias, semanas, etc.), decorrido entre a inoculação e a produção de estruturas do patógeno que constituirá novo inóculo (ex: esporulação de fungos causadores de ferrugens ou indução e a ruptura das células bacterianas). Para doenças policíclicas, como no caso das as ferrugens, o período de latência é um dos parâmetros mais importantes para o acontecimento da doença. É importante para a planta induzir um longo período latente no patógeno. É neste período que será determinada a produção de inóculo (ex.: esporos), e intensidade de desenvolvimento da doença (Kranz, 2002; Vale et al., 2001).

### 3.3. Período infeccioso

Após o final do período latente, dar-se o início ao período infeccioso. Que se trata do período de tempo em que uma unidade formadora de esporos (ex.: urédias, galhas, picnídios, acérvulos entre outros) em uma lesão permanecem ativos em produzir inóculo secundário. A duração do período infeccioso preenche uma grande influência sobre a intensidade das doenças e na resistência da cultivar. No qual, quanto menor o período infeccioso indica uma maior resistência da cultivar. Fatores ambientais como temperatura, umidade e luz têm interferência significativas na duração do período infeccioso (Kranz, 1974, 2002; Parlevliet, 1979).

### 3.4. Eficiência de infecção

Eficiência de infecção refere-se à relação entre o número de infecções visíveis e o número de propágulos ou esporos que se depositam sobre a superfície do tecido vegetal do hospedeiro. A infecção é um processo que envolve o desenvolvimento do inóculo em vários estados fisiológicos e estruturas morfológicas (emissão de tubos germinativos, apressório e haustório) (Kranz, 2002). O parâmetro para avaliação da eficiência da infecção é a proporção de lesões manifestas por propágulos inoculados. Uma redução na eficiência de infecção, é induzida pelo aumento nos níveis de resistência da cultivar. Fatores abióticos como faixa de temperatura e período de orvalho, também afetam diretamente sobre a eficiência da infecção (Kranz, 2002; Pelletier & Fry, 1989).

### 3.5. Taxa de expansão da lesão

Taxa de expansão da lesão é a velocidade ou proporção em que a área de uma lesão aumenta em um determinado período de tempo. A quantificação da taxa de expansão da lesão é realizada em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ . A taxa de expansão da lesão pode ser usada para avaliar a agressividade de isolados e determinar a resistência de plantas a microrganismos fitopatogênicos (Luo & Zeng, 1995; Berger et al., 1997; Kranz, 2002;). Isolados que possuem a capacidade de colonizar uma maior área do tecido do hospedeiro mais rapidamente, podem ter vantagens quando as condições climáticas são limitantes (Suassuna et al., 2004).

### 3.6. Capacidade de esporulação

A capacidade de esporulação pode ser definida como a quantidade total de inóculo produzido por lesão, durante o período infeccioso, medida como esporos/ $\text{mm}^2$ . Os valores da capacidade de esporulação podem variar de acordo com a resistência quantitativa da cultura hospedeira (Kranz, 2002). Lesões jovens tendem a uma maior intensidade de esporulação, enquanto à medida que a lesão envelhece, a intensidade da esporulação diminui, até finalizar. Em variedades com maior grau de resistência,

os patógenos tendem a possuir uma menor capacidade de esporulação. A capacidade de esporulação é inversamente proporcional ao período de incubação, indicando que quanto maior o período de incubação, menor será a capacidade de esporulação. A intensidade da esporulação está fortemente relacionada à resistência da cultivar, quanto mais resistente a cultivar, menor é a intensidade da esporulação (Jacobs & Parlevliet, 1993). Além disso, fatores climáticos como a temperatura e umidade relativa, têm influência direta sobre a capacidade de esporulação (Kranz, 2002; Sache, 1997; Shakya et al., 2014).

### 3.7. Tempo de infecção

O tempo de infecção, trata-se do período de tempo necessário para que um patógeno possa penetrar em uma planta hospedeira e estabelecer suas relações parasitárias estáveis. Um curto tempo de infecção pelo patógeno favorece o aumento da taxa de infecção, devido a uma menor exposição do patógeno a fatores ambientais negativos, medidas de controle e reações de defesa do hospedeiro. Um longo tempo de infecção do patógeno, indica uma possível resistência quantitativa da cultivar (Kranz, 2002).

### 3.8. Intensidade da doença

A intensidade da doença é definida com a proporção ou quantidade de doença em uma planta ou em suas partes. A intensidade da doença pode ser avaliada pela incidência ou severidade. Incidência é a proporção ou porcentagem de plantas ou partes de plantas sintomáticas em uma amostra. A severidade é a porcentagem do tecido ou órgão hospedeiro sintomático. As avaliações de severidade podem ser realizadas visualmente de várias formas, como mensuração direta dos sintomas da doença, pela contagem do número de lesões, medição de seu diâmetro e cálculo da área entre outras. A severidade também pode ser estimada com o auxílio de escalas diagramáticas ou chaves descritivas, bem como software eletrônicos (Campbell & Madden, 1990; Kranz, 1988; Madden; Hughes; van den Bosch, 2007).

### 3.9. Taxa de infecção

A taxa de infecção é a velocidade na qual uma doença aumenta em função do tempo, calculada normalmente por modelos matemáticos (Kranz, 2002). Nesse contexto, os modelos propostos por Van der Plank (1963) para cálculo das taxas de infecção têm sido os mais utilizados, com destaque para a taxa exponencial ( $q = [\ln(y_2) - \ln(i_1)] / (t_2 - t_1)$ ) e a taxa de infecção aparente ou logística ( $r = [\ln(Y_2 / (1 - y_2)) - \ln(Y_1 / (1 - y_1))] / (t_2 - t_1)$ ). Assim, infecção aparente revela como o progresso de estados variados da doença, respondem a fatores externos (ex.: temperatura) ou internos (ex.: grau de resistência). Desse modo, taxa de infecção é um componente de resistência extremamente útil para



avaliar resistência de cultivares à doença, pois engloba a dinâmica temporal do desenvolvimento da infecção no hospedeiro (Kranz, 1974, 2002; Nelson, 1978).

Os parâmetros pelos quais os componentes da resistência são quantificados podem ser primários ou derivados. Os parâmetros primários usam os dados brutos, enquanto os parâmetros derivados utilizam os dados calculados a partir de dados brutos, usando fórmulas ou análises de regressão. A eficiência da infecção, por exemplo, pode ser quantificada usando a incidência da doença (parâmetro primário) ou taxa de progresso da doença e área abaixo da curva de progresso da doença (parâmetros derivados). Da mesma forma, a expansão da lesão pode ser quantificada usando o comprimento médio da lesão (parâmetro primário) ou taxa de expansão da lesão e área abaixo da curva de expansão da lesão (parâmetros derivados). Outros parâmetros, podem combinar vários componentes de resistência em uma única medição, como por exemplo, período de incubação, eficiência da infecção e expansão da lesão. De forma geral, todos os componentes de resistência atuam simultaneamente para determinar a resistência como um todo (Tredway et al., 2003). A frequência de infecção foi considerada por Parlevliet (1992) como o mais provável de todos os componentes de ser independente dos outros, embora a aparente associação de dois ou mais componentes de resistência torne a exploração potencial por meio de reprodução mais viável. Na realidade, pode ser desejável que os componentes não sejam controlados por genes ligados, já que a durabilidade provavelmente seria reduzida se esse fosse o caso.

Quando novas seleções de plantas são geradas a partir de um programa de melhoramento, a triagem inicial de resistência é frequentemente conduzida sob condições controladas. Embora os componentes individuais da resistência sejam relativamente fáceis de mensurar em condições controladas, eles são difíceis de avaliar no campo. Além disso, falta conhecimento avançado sobre qual componente da resistência pode estar relacionado à resposta de campo. Não há garantia de que os valores obtidos para cada um dos componentes individuais medidos sob condições controladas serão refletidos na resposta de campo (Deadman, 2006). Nesse contexto, Kong et al. (1997) avaliaram a resposta de 17 germoplasmas de girassol ao fungo *Alternaria helianthi* em condições de campo. Ao mesmo tempo, cada germoplasma também foi avaliado sob condições controladas para examinar a variação entre elas em termos de período de incubação (definido como o tempo entre a inoculação e 25% das lesões se tornando visíveis), frequência de infecção (expressa como uma proporção da média número de lesões em um teste suscetível), tamanho médio da lesão e produção de esporos. A matriz de correlação resultante, derivada após regressão de médias de componentes com classificações de severidade de campo, mostrou que o tamanho médio da lesão era o melhor indicador de resposta de campo. Por outro lado, houve correlação pobre dos demais componentes de resistência com a severidade da doença no campo.

Em outro estudo, Bove & Rossi (2020) estudaram seis componentes da resistência parcial em 15 variedades de videira com resistência parcial a *Plasmopara viticola*, incluindo: (i) frequência de infecção (IFR, proporção de locais de inoculação com esporulação), (ii) período latente (LP50, graus-dia entre inoculação e aparecimento de 50% do número final de lesões esporuladas), (iii) tamanho da lesão (LS, área de lesões únicas em mm<sup>2</sup>), (iv) produção de esporângios (SPOR, número de esporângios produzidos por lesão e SPOR', número de esporângios produzidos por mm<sup>2</sup> de lesão), (v) período

infeccioso (IP, número de eventos de esporulação em uma lesão) e (vi) infectividade de esporângios (INF, eficiência de infecção de esporângios produzidos em variedades resistentes). Experimentos monocíclicos de inoculação artificial foram conduzidos por um período de 3 anos em folhas coletadas nos estádios de desenvolvimento da folha, floração e desenvolvimento do fruto. Em comparação com a variedade suscetível ‘Merlot’, as variedades parcialmente resistentes mostraram IFR reduzido, LP mais longo, LS menor, menos SPOR e SPOR’, IP mais curto e INF mais baixo. No desenvolvimento foliar, IFR, SPOR e INF foram maiores e LP foi menor do que na floração e desenvolvimento do fruto. A análise dos componentes de resistência parcial por experimentos monocíclicos forneceu avaliações confiáveis da resposta de resistência de acessos de videira em campo e a carga de trabalho necessária para avaliação de rotina em programas de melhoramento pode ser reduzida medindo IFR e SPOR, que produziram resultados robustos.

A disparidade demonstrada pelas linhagens quando os componentes de resistência são comparados indica as severas limitações levantadas quando a triagem inicial é conduzida em condições controladas, especialmente dada a sensibilidade dos componentes às flutuações ambientais. No entanto, um sistema de triagem de ambiente controlado pode ter vantagens consideráveis sobre um teste de campo em grande escala em termos de tempo e efetividade de custo de mão de obra (Deadman, 2006). Algumas das razões para a falta de correlação entre componentes de resistência avaliados em condições controladas e no campo decorrem das diferenças nas condições ambientais e seus efeitos individuais na expressão da resistência (Deadman, 2006). Portanto, a determinação de como os componentes monocíclicos são influenciados pelas variáveis ambientais é muito importante por permitir um melhor entendimento do ciclo de vida do patógeno, bem como para determinar as melhores estratégias de manejo do mesmo (Parlevliet, 1979; Garrett et al., 2006; Willocquet et al., 2017).

## 4. Considerações finais

Os avanços na biotecnologia nas últimas décadas tornaram possível o rastreamento e combinação de loci de características quantitativas (QTLs) associados à resistência parcial usando marcadores moleculares (St Clair, 2010; Huang & Han, 2014; Varshney et al., 2014; Willocquet et al., 2017). A determinação do fenótipo, e não a genotipagem, é agora considerada o principal gargalo que impede a integração de características quantitativas em programas de melhoramento em geral (Cobb et al., 2013), e características quantitativas para resistência em particular (St Clair, 2010; Mundt, 2014). O melhoramento genético para resistência da planta hospedeira abrange vários níveis de integração biológica (gene, célula, tecido, órgão, planta, estande de cultivo, campo cultivado) que podem ser considerados como níveis sucessivos de hierarquia. Processos de doença ocorrem, e os mecanismos de resistência podem ser medidos, em cada um desses níveis. Os níveis mais baixos são genes (e QTLs), em outras palavras, os objetos operacionais dos geneticistas moleculares, e o nível mais alto é a resistência de campo - o alvo dos melhoristas de plantas. Pode ser difícil prever processos e

seus resultados ao longo desses níveis sucessivos. Considerar um processo localizado no meio dessa hierarquia pode ser muito útil para superar o gargalo da fenotipagem. Tal processo intermediário é o monociclo de doença individual, onde a resistência da planta hospedeira pode ser medida na forma de componentes de resistência (Willoquet et al., 2017). Portanto, apesar de a maioria dos componentes de resistência a doenças de plantas terem sido caracterizados há várias décadas, continuam sendo extremamente úteis. O grande desafio continua sendo identificar os componentes avaliados em condições controladas que apresentam elevada correlação com a reação de resistência em campo.

## 5. Referências bibliográficas

- BAKER, E.P. Isolation of complementary genes conditioning crown rust resistance in the oat variety Bond. **Euphytica**, v. 15, p. 313-318, 1966.
- BERGER, R.D.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Lesion expansion as an epidemic component. **Phytopathology**, v. 87, p. 1005-1013, 1997.
- BOVE, F.; ROSSI, V. Components of partial resistance to *Plasmopara viticola* enable complete phenotypic characterization of grapevine varieties. **Scientific Reports**, v. 10, p. 585, 2020.
- BROWN, J.K.M. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 513-539, 2015.
- BROWNING, J.A.; FREY, K.J. Multiline cultivars as a means of disease control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 7, p. 355-382, 1969.
- 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.
- CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 85-92.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.
- COBB, J.N.; DECLERCK, G.; GREENBERG, A.; CLARK, R.; MCCOUCH, S. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype-phenotype relationships and its relevance to crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, p. 867-887, 2013.
- CUNNAC, S et al. Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 2975-2980, 2011.
- DALLAGNOL, L.J.; ARAÚJO FILHO, J.V. Uma visão geral da resistência genética da planta a microrganismos. In: DALLAGNOL, L.J. (org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: UFPel, 2018. p. 14-65.
- DEADMAN, M.L. Epidemiological consequences of plant disease resistance. In: COOKE, B. M.; GARETH JONES, D.; KAYE, B. (eds.). **The epidemiology of plant diseases**. 2. ed. Dordrecht: Springer, 2006. p. 139-157.

- ELLINGBOE, A.H. Genetical aspects of interactions between plant hosts and their soilborne pathogens. **Phytopathology**, v. 73, p. 941-944, 1983.
- FABRE, F.; ROUSSEAU, E.; MAILLERET, L.; MOURY, B. Epidemiological and evolutionary management of plant resistance: optimizing the deployment of cultivar mixtures in time and space in agricultural landscapes. **Evolutionary Applications**, v. 8, p. 919-932, 2015.
- GARRETT, K.A.; HULBERT, S.H; LEACH, J.E.; TRAVERS, S.E. Ecological genomics and epidemiology. **European Journal of Plant Pathology**, v. 115, p. 35-51, 2006.
- GILL, U.S.; LEE, S.; MYSORE, K.S. Host versus nonhost resistance: Distinct wars with similar arsenals. **Phytopathology**, v. 105, p. 580-587, 2015.
- HOOKER, A.L. Genetics and expression of resistance in plants to rusts of the genus *Puccinia*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 5, p. 163-82, 1967.
- HUANG, X.; HAN, B. Natural variations and genome-wide association studies in crop plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 531-551, 2014.
- JACOBS, T. H.; PARLEVLIT, J. E. **Durability of disease resistance**. Dordrecht: Springer, 1993. 375 p.
- JOHNSON, R. Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. **Phytopathology**, v. 71, p. 567-568, 1981.
- JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 309-330, 1984.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.
- KONG, G.A.; SIMPSON, G.B.; KOCHMAN, J.K.; BROWN, J.F. Components of quantitative resistance in sunflower to *Alternaria helianthi*. **Annals of Applied Biology**, v. 130, p. 439-451, 1997
- KRANZ, J. (ed.). **Epidemics of plant diseases: mathematical analysis and modeling**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 170 p.
- KRANZ, J. Measuring plant diseases. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (eds.). **Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology**. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1988. p. 33-50.
- KRANZ, J. **Comparative epidemiology of plant diseases**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. 199 p.
- LANNOU, C. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 319-338, 2012.
- 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, p. e1002870, 2013.
- LUO, Y.; ZENG, S.M. Simulation studies on epidemics of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis*) on slow-rusting cultivars and analysis of effects of resistance components. **Plant Pathology**. v. 44, p. 340-349, 1995.
- MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. 421 p.
- MCDONALD, B. A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 191-196, 2014.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.
- MICHELMORE, R.W.; CHRISTOPOULOU, M.; CALDWELL, K.S. Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 291-319, 2013.



- MUNDT, C.C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 446–455, 2014.
- NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 16, p. 359-378, 1978.
- NIKS, R.E.; QI, 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.
- 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. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. **Euphytica**, v. 124, p. 147-156, 2002.
- PARRY, D.W. How do we control disease? In: PARRY, D.W. (ed.). **Plant pathology in agriculture**. New York: Cambridge University Press, 1990, p. 86-158.
- 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.
- PILET-NAYEL, M-L. et al. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1838, p. 1-9, 2017.
- PRIESTLEY, R.H. Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust. In: SCOTT, P.R.; BAINBRIDGE, A. (eds.). **Plant disease epidemiology**. Oxford: Blackwell, 1978. p. 62-70.
- RIMBAUD, L.; PAPAÏX, J.; REY, J-F; BARRETT, L.G.; THRALL, P.H. Assessing the durability and efficiency of landscape-based strategies to deploy plant resistance to pathogens. **PLoS Computational Biology**, v. 14, p. e1006067, 2018.
- RIOS, J.A.; DEBONA, D. Efeito epidemiológico da resistência de hospedeiro. In: DALLAGNOL, L.J. (org.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: UFPel, 2018, p. 126-149.
- SACHE, I. Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*). **Plant Pathology**, v. 46, p. 581-589, 1997.
- SHAKYA, S.K.; GOSS, E.M.; DUFAULT, N.S.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Potential effects of diurnal temperature oscillations on potato late blight with special reference to climate change. **Phytopathology**, v. 105, p. 230-238, 2015.
- ST CLAIR, D.A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 247-268, 2010.
- STUTHMAN, D.D.; LEONARD, K.J.; MILLER-GARVIN, J. Breeding crops for durable resistance to disease. *Advances in Agronomy*, v. 95, p. 319-367, 2007.
- SUASSUNA, N.D.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**, v. 53, p. 405-413, 2004.
- TREDWAY, L.P.; STEVENSON, K.L.; BURPEE, L.L. Components of resistance to *Magnaporthe grisea* in 'Coyote' and 'Coronado' tall fescue. **Plant Disease**, v. 87, p. 906-912, 2003.
- VALE, F.X.; PARLEVLIET, J.E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 577-589, 2001.
- VAN DEN BOSCH, F.; GILLIGAN, C.A. Measures of durability of resistance. **Phytopathology**, v. 93, p. 616-625, 2003.
- VAN DER PLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.



- VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206 p.
- VAN DER PLANK, J.E. **Genetic and molecular basis of plant pathogenesis**. Berlin: Springer-Verlag, 1978, 167 p.
- VARSHNEY, R.K.; TERAUCHI, R.; MCCOUCH, S.R. Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. **PLoS Biology**, v. 12, p. e001883, 2014.
- WANG, G.L. et al. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genetics**, v. 136, p. 1421-1434, 1994.
- WILLOCQUET, L.; SAVARY, S.; YUEN, J. Multiscale phenotyping and decision strategies in breeding for resistance. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 420-432, 2017.
- ZHAN, J.; THRALL, P.H.; PAPAÏX, J.; XIE, L.; BURDON, J.J. 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.

*Larissa Cavalcante Almeida  
Jadson Araújo da Silva  
Felipe Araújo Sousa  
Risoneide de Cássia Zeferino Silva  
Jonas Alberto Rios*

## 1. Introdução

As doenças de plantas são estudadas principalmente devido aos seus impactos sobre a sociedade (Zadoks & Schein, 1971). Estes impactos podem afetar negativamente os componentes da segurança alimentar (FAO 2006). Dentre estes a redução da qualidade e da disponibilidade de alimentos, gerando uma perda de renda pelos produtores, menor empregabilidade no setor agrícola e, conseqüentemente, negativos efeitos na economia global. As plantas são rotineiramente desafiadas por agentes abióticos (secas, geadas, salinidade) e bióticos (como bactérias, fungos, nematoides, oomicetos e vírus). Para sobreviverem, portanto, as plantas devem ser capazes de detectar potenciais fitopatógenos, respondendo por meio de proteção aprimorada para prevenir ou mitigar danos.

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 de 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 as duas resistências de hospedeiro podem ser diferenciadas com base no seu efeito sobre o inóculo inicial ou a taxa de progresso da doença. Assim, a resistência vertical (raça específica) é caracterizada pela redução do inóculo inicial, enquanto a resistência horizontal (raça não específica) está associada à redução da taxa de progresso da doença. Nosso objetivo é abordar o efeito da resistência vertical e horizontal no progresso da doença, bem como nos parâmetros epidemiológicos associados a cada uma delas.

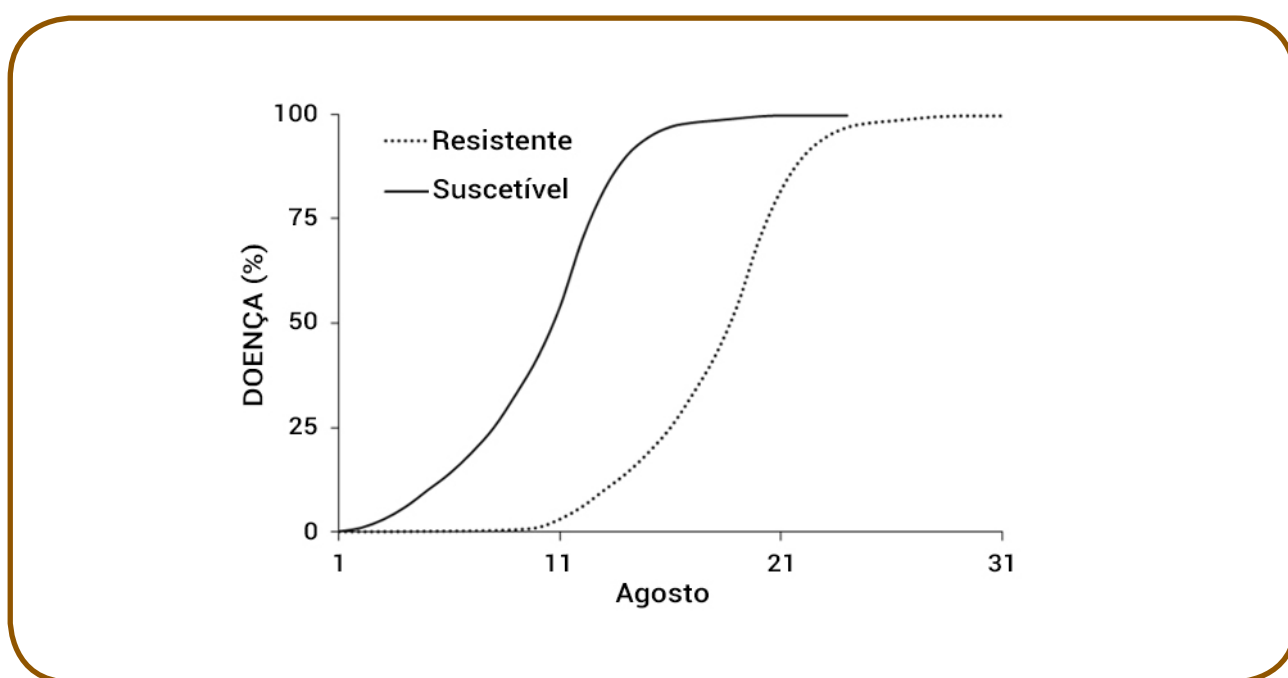
## 2. Efeito epidemiológico da resistência vertical

Resistência quantitativa e qualitativa são os dois tipos de resistência de hospedeiro contra patógenos que têm sido selecionadas pelos melhoristas nas últimas décadas (Ainsworth, 1981). A resistência vertical pode também ser descrita como resistência qualitativa, resistência gene-a-gene, resistência de gene principal ou raça específica, sendo de controle genético relativamente simples (Flor, 1971; Dangl & Jones, 2001). Assim, em uma interação incompatível, governada pela resistência vertical, 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 (Thompson & Burdon, 1992; Bonhoeffer, 2002; Van Den Bosch & Gilligan, 2003). O principal efeito associado ao uso da resistência vertical está na redução da quantidade de inóculo inicial e, conseqüentemente, atraso no início da epidemia. Esse 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 Van der Plank (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 os demais 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. Esses são capazes de infectar as variedades da batateira de ambos os campos de cultivo, independentemente da presença do gene *R1*. Portanto, ambas as variedades, em seus respectivos campos, apresentam o mesmo nível de suscetibilidade a estes 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 no 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 (essa quantidade corresponde a uma lesão por planta na variedade suscetível e uma lesão a cada 100 plantas na variedade resistente). As duas curvas 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. Se observa que a intensidade de requeima atingiu o patamar de 50% no dia 13 de agosto no campo em que foi cultivada a variedade sem o gene *R*, e somente em 23 de agosto para o campo onde 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 (Van der Plank, 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, assim como o micélio se espalha pelos tecidos da planta e produzem esporos da mesma maneira. Todo o processo de infecção ocorre de forma idêntica.

### 3. 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, que conseqüentemente, acarretará uma redução significativa do efeito da resistência vertical nessas 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 ciclo de “boom” e “bust” por Priestley (1970).

Dessa forma, consideramos como um processo cíclico, pois os eventos se repetem sucessivamente, conforme estão ilustrados na Figura 2 e 3, onde uma variedade perde sua eficiência devido a predominância de patótipos virulentos (*i*), o que leva ao desenvolvimento de uma nova variedade pelos melhoristas, com um novo gene *R* de resistência vertical (*ii*), essa nova variedade também vai estar sujeita ao ciclo “boom” e “bust” (*iii*), e novamente, os melhoristas deverão disponibilizar novas variedades resistentes (*iv*). Geralmente, o período médio de duração de uma variedade é de 5 anos para patógenos fúngicos. Mas em alguns casos, esse período pode ser menor, uma vez que a variedade pode perder sua resistência mesmo antes de atingir campos de produção.

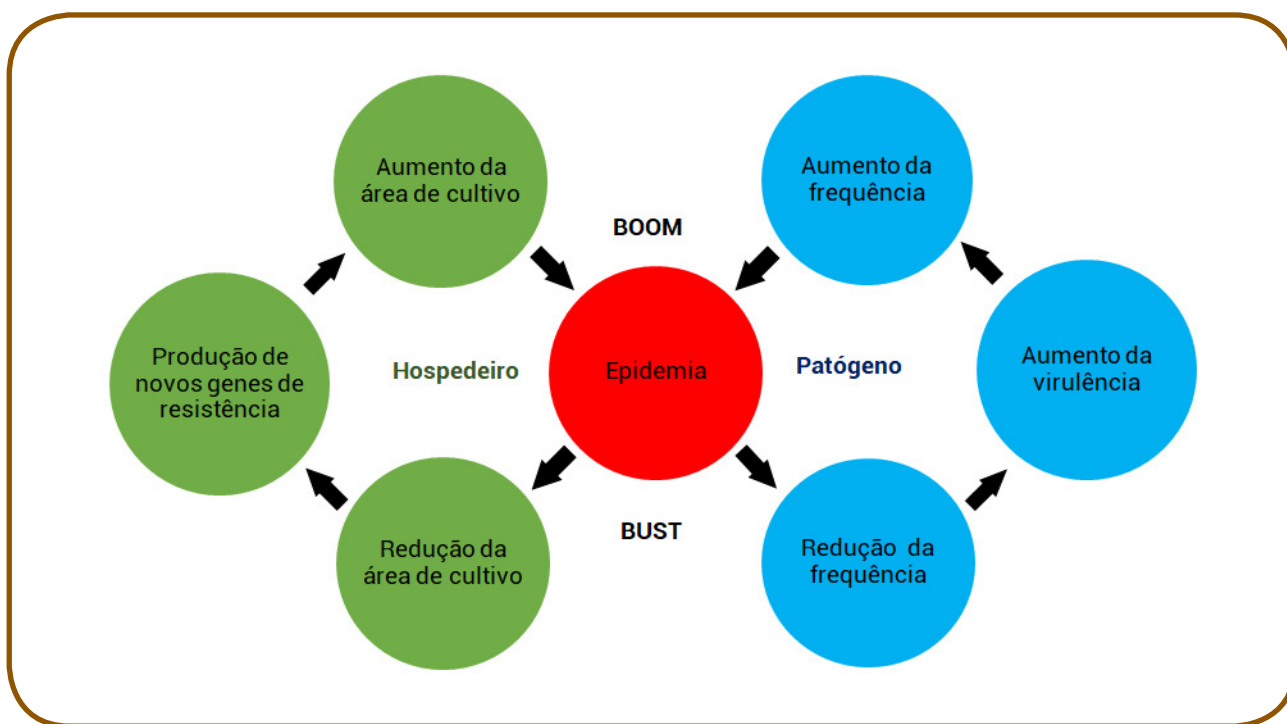
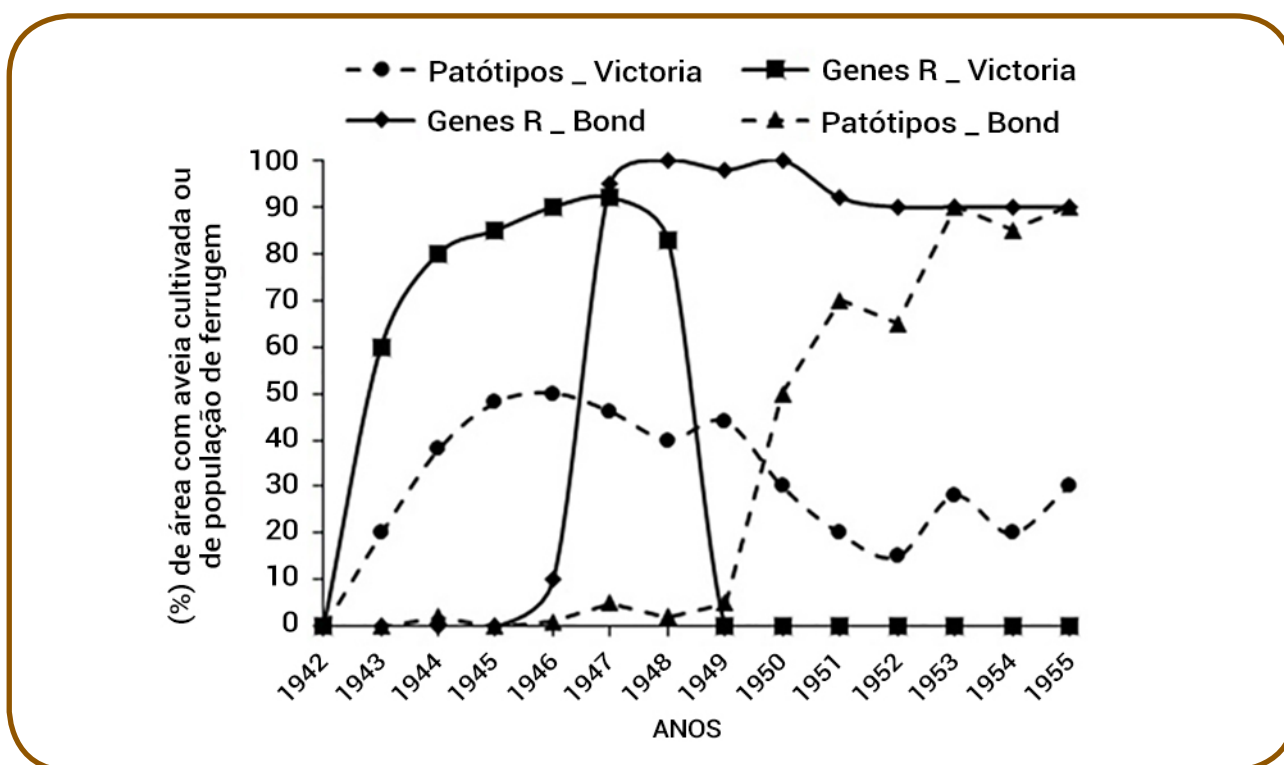


Figura 2.\_Ciclo boom e bust.





**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).

Como visto anteriormente, o ciclo “boom” e “bust” está relacionado à pressão de seleção exercida pelo hospedeiro sobre os patótipos virulentos do patógeno, onde segundo McDonald (2004), se caracteriza como a principal força que direciona as mudanças na frequência dos alelos mutantes. Dessa forma, a seleção direcional ocorre quando um gene de efeito principal torna-se amplamente distribuído sobre uma área geográfica, levando a um aumento na frequência do mutante virulento que perdeu o elicitor (alelo de virulência), e então, promovendo 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.

## 4. 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 suplantarem a resistência varietal quando comparados a 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 suplantarem a resistência possuem sistema de reprodução mista, com o ciclo sexual gerando variabilidade e a reprodução assexuada 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 assexuada e baixo potencial de fluxo gênico. McDonald & Linde (2002) resumiram o potencial evolutivo dos patógenos, com base em sua estrutura genética, baseando-se nos riscos inerentes em cinco forças evolutivas, nas quais descreveremos a seguir.

## 4.1. Mutação

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 esses 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.

## 4.2. Tamanho da população

O tamanho da população patogênica também influencia no potencial evolutivo da mesma, sendo que um alto nível populacional apresenta um maior potencial evolutivo quando comparado aos patógenos com menor nível populacional. Este efeito está associado à maior probabilidade de ocorrência de indivíduos contendo alelos mutantes em populações maiores. Essa flutuação populacional pode ser resultado de condições climáticas extremas entre as estações de cultivo, reduzindo a diversidade genotípica desses patógenos quando comparado àqueles pertencentes a populações constantes durante todo o ano.

## 4.3. Fluxo de genes

Patógenos com alto fluxo de genes possuem maior risco evolutivo quando comparado 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 em uma grande área geográfica.

## 4.4. Tipo de reprodução

O envolvimento de propágulos assexuais (fluxo genotípico) apresenta maior risco que o 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. 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.

## 4.5. Exposição a seleção direcional

As populações de patógenos que são expostas a uma forte seleção direcional durante muitas gerações representam um maior risco evolutivo comparado 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. Enquanto isso, 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 (Tabela 1).

**Tabela 1.** Risco evolutivo de fitopatógenos.

Alto risco evolutivo	Baixo risco evolutivo
Alta taxa de mutação Elementos transponíveis disponíveis “transposons”	Baixa taxa de mutação Sem a presença de “transposons”
Alto índice populacional do patógeno Presença de estruturas de sobrevivência A extinção de população local e considerada rara Sem deriva genética, sem perdas de alelos	Baixo índice populacional do patógeno Ausência de estruturas de sobrevivência A extinção de população local e considerada comum Com deriva genética e perdas de alelos
Alto fluxo de genes/genótipos Propágulos assexuais dispersos pelo ar a longas distâncias	Baixo fluxo de genes/genótipos Patógenos assexuais dispersos via solo Quarentenas são efetivas

Alto risco evolutivo	Baixo risco evolutivo
Sistema de reprodução misto Reprodução sexual com posterior produção de esporos assexuais	Sistema de reprodução assexuado Somente produção de esporos assexuais
Eficiente seleção direcional Genes <i>R</i> utilizados em monocultura Genes <i>R</i> empregado continuamente em grandes áreas	Seleção disruptiva Genes <i>R</i> utilizados em misturas/multilinhas Genes <i>R</i> empregados em rotação no tempo e no espaço

## 5. Efeito epidemiológico da resistência horizontal

A resistência horizontal 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 sub classes da resistência horizontal são conhecidas por uma variedade de termos ou sinônimos (tais como quantitativa, parcial, raça não específica, genes de efeito menor, resistência constitutiva ou de planta adulta, poligênica). Frequentemente, confere um nível parcial de resistência, e geralmente é controlada por vários genes, que estão associadas a regiões genômicas ou QTL (loci de características quantitativas) contribuindo, cada um com efeito variável para o fenótipo de resistência a um patógeno (Pilet-Nayel et al., 2017).

Essa natureza genética implica que muitas alterações genéticas na população do patógeno são requeridas para adquirir a capacidade de suplantar a resistência. Consequentemente, evidências de que patógenos consigam suplantar a resistência horizontal são escassas quando comparado à resistência vertical (Van der Plank, 1982; Eversmeyer & Kramer, 2000; Boyd, 2005). Isto suporta a hipótese de que a resistência horizontal tende a ser mais durável, ou seja, permanece efetiva por um prolongado período de tempo de uso contra doenças. Por isso, esse tipo de resistência tem novamente despertado um interesse de melhoristas de plantas, a fim de desenvolver cultivares com resistência de herança poligênica. Essa resistência está associada a redução na severidade da doença, diferentemente da resposta qualitativa, em que a doença não ocorre (Young, 1996).

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; Van der Plank, 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. Essa exige maior cautela na avaliação da intensidade da doença durante o reconhecimento da resistência quantitativa, sendo uma prática considerada, às vezes, difícil de se realizar. Van der Plank (1978) relatou que esta dificuldade se

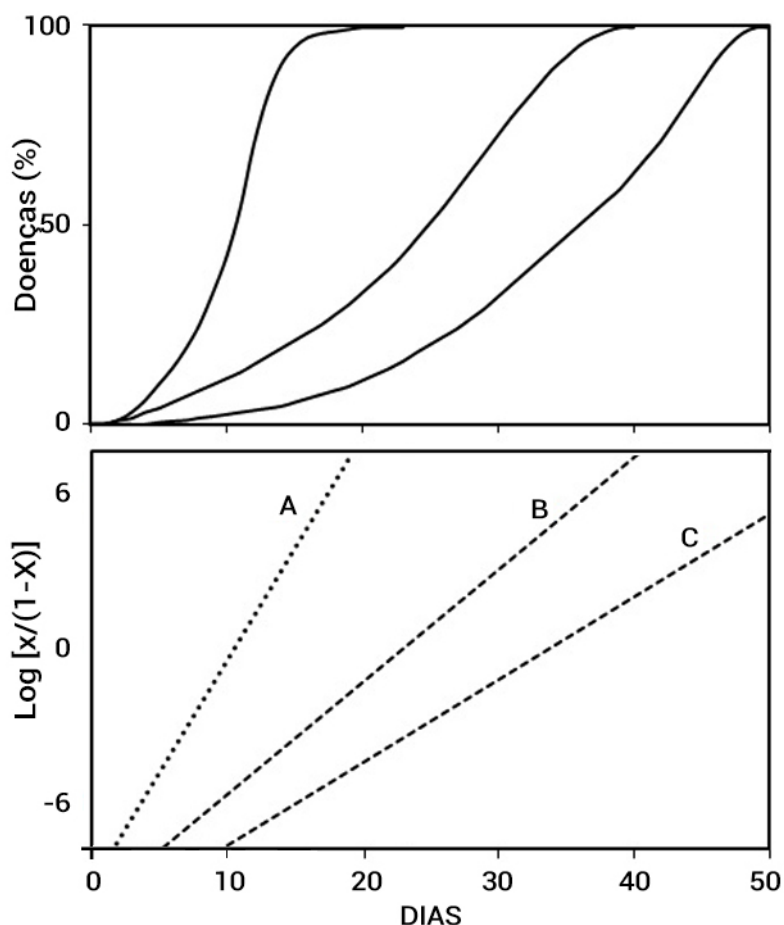
torna maior quando avaliada em pequenas parcelas no campo, principalmente quando comparado a parcelas menores contendo cultivares suscetíveis.

Usando como exemplo patógenos de doenças policíclicas, tais como ferrugens e oídios, que 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 4 linhas, houve diferença de apenas 30 de 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 destes componentes em uma cultivar com resistência quantitativa é a redução da eficiência de infecção, maior período de latência (período que parte da inoculação até a esporulação), redução da produção de propágulos, menor período infeccioso ou menor produção de toxinas (Mundt, 2014; Parlevliet, 1979). De acordo com Zadoks, (1971) a eficiência de infecção e produção de esporos podem ser combinadas em um fator de multiplicação diário. Van der Plank, (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 de 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 de cultivo, assim o uso de variedades com resistência quantitativa pode reduzir significativamente a intensidade doença. Van der Plank (1963, 1978) expressou este acúmulo com taxa  $r$  (denominada taxa de progresso da doença), sendo esse proporcional ao progresso da 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 a 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 avaliada em três variedades de batata Bintje (A), Eigenheimer (B) e Voran (C). (Van der Plank, 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 resistente;
- 2\_ A esporulação é menos abundante na variedade resistente comparado à variedade suscetível;
- 3\_ A partir da inoculação, a variedade resistente apresenta maior tempo para iniciar fase de esporulação quando comparado à variedade suscetível. Assim, o período latente é mais longo;
- 4\_ As lesões permanecem por menor período de tempo com a capacidade de esporulação;

Vários estudos têm demonstrado que 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; 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).

## 6. Estratégias de emprego dos genes de resistência

Como visto anteriormente, independentemente da fonte de resistência, os patógenos têm potencial para desenvolver virulência e agressividade em resposta a seleção representada pela resistência da planta, resultando no colapso da resistência vertical ou na erosão da resistência horizontal (McDonald, 2002; Parlevliet, 2002). Isso implica que estratégias de manejo devem ser adotadas durante a implantação ou aplicação dos genes de resistência no campo, visando alterar a pressão de seleção sobre a população de patógenos pelo hospedeiro, e assim aumentar a durabilidade da resistência.

As estratégias que serão discutidas a seguir, baseiam-se no princípio proposto por Van der Plank (1963), de que “raças com genes desnecessários de virulência são menos aptas a sobreviver”. O postulado de Van der Plank 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 após a remoção do evento perturbador. Este mecanismo foi denominado por Van der Plank 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 em uma grande extensão de área. No início, ocorre seleção direcional, favorecendo a raça que tem o genótipo suficiente para suplantar a resistência conferida por *R1*: a raça que contém o gene 1 de virulência. Se a cultivar for substituída por uma 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*, estará 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.

De acordo com 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. A escala temporal depende principalmente de combinações de diferen-

tes fontes de resistência ao longo do tempo (rotação), enquanto a espacial pode variar na implantação de múltiplas fontes de resistência que ocorrem em uma única cultivar (pirâmide), em diferentes cultivares dentro do mesmo campo (mistura varietal e multilinhas), ou ainda em campos diferentes (mosaicos). A seguir, discorreremos mais sobre essas estratégias.

## 6.1. Rotação de genes

A rotação de genes tem o princípio semelhante ao da rotação de culturas, e consiste na alternância de cultivares contendo diferentes genes de resistência, em uma mesma área. Então, uma cultivar contendo um gene de resistência vertical implantada é substituída por uma outra cultivar com diferente gene de resistência, após o aparecimento de uma raça capaz de suplantá-la. A cultivar implantada inicialmente pode voltar a ser utilizada após a raça correspondente ter diminuído em frequência na população (Crill, 1977).

Embora essa estratégia exija uma logística complexa, como a necessidade de monitoramento dos níveis de frequência das raças, além da disponibilidade de material propagativo de substituição em quantidade necessária, tem sido adotada com sucesso para algumas doenças. Como exemplo, podemos citar a brusone (Crill et al., 1981) e a doença do tungro (Manwan et al., 1985; Sama et al., 1991), ambas em arroz.

## 6.2. Mistura varietal

Consiste no cultivo simultâneo de diferentes genótipos pertencentes a uma mesma espécie do hospedeiro. 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, 1985). Assim, a mistura de variedades apresenta uma vantagem epidemiológica por reduzir a dispersão dos esporos virulentos entre as variedades suscetíveis.

A sua eficiência foi inicialmente relatada por Wolfe (1985), quando observou que a mistura de variedades de cevada reduziu em 80% a severidade do oídio em relação ao cultivo utilizando somente uma variedade com um determinado gene *R*. Anos mais tarde, Zhu et al (2000) observaram que a implantação da mistura de cultivares em arroz, incluindo cultivares altamente suscetíveis e menos suscetíveis, para controle da brusone também se mostrava eficiente na redução da severidade da doença, principalmente para as cultivares mais suscetíveis.

Assim, espera-se que quanto maior o número de genes *R* na mistura, mais prolongada deverá ser a vida útil das variedades. Entretanto, essa estratégia pode apresentar falhas se, na mistura varietal, ocorrer grande percentagem de plantas suscetíveis (Jørgensen, 1993). Outra dificuldade consiste em encontrar a melhor combinação varietal, visto que, na maioria dos casos, esta variação não é desejável comercialmente.

### 6.3. 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), essas misturas abrangem linhagens fenotipicamente semelhantes, mas que são genotipicamente diferentes para a resistência a uma determinada raça patogênica. 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. Essa estratégia é empregada para cultivares autógamas e proporciona uma redução das perdas, por promover uma proteção física entre os genótipos contra os patógenos virulentos. Nesse caso, as linhas constituídas por plantas resistentes funcionam como barreiras, nas quais não são infectadas pelos esporos provenientes das plantas suscetíveis. Assim, quanto maior a distância ou mais eficiente for a barreira, menor será a capacidade de dispersão dos esporos.

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*.

### 6.4. Piramidamento de genes

O piramidamento de genes é a inserção de mais de um gene de resistência vertical em uma única cultivar, com o objetivo de melhorar a resistência a partir da combinação de genes e aumentar a sua durabilidade. Assim, espera-se que quanto maior o número de genes de resistência incorporados na cultivar, maior será o número de mutações necessárias ao patógeno para obter os genes de virulência capaz de suplantar a resistência, o que também pode aumentar os custos de condicionamento associados a essas mutações.

Rimbaud et al (2018) ao comparar os efeitos epidemiológicos e evolutivos de diferentes estratégias de implantação de genes de resistência, por meio de estudos de modelagem, observaram que na ausência de patógenos pré-adaptados, o piramidamento de genes era mais eficaz em relação a durabilidade da cultivar quando a probabilidade

de mutações eram baixas. O modelo considerou dois genes de resistência e mostrou que após o surgimento, as super-raças contendo os genes de virulência levaram em média 14 anos para serem transmitidas aos hospedeiros resistentes e 24 anos para se estabelecerem na população, demonstrando o potencial da técnica.

A pirâmide genética foi aplicada com sucesso a partir da combinação de dois genes de resistência,  $R_{Pi-mcd1}$  e  $R_{Pi-ber}$  (Adillah Tan et al., 2010), e mais recentemente de três genes,  $RB$ ,  $Rpi-blb2$  e  $Rpi-vnt1.1$  (Ghislain et al., 2019), em cultivares de batateira contra *P. infestans*. 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; Pradhan et al., 2015).

Assim, a maioria dos estudos demonstram um efeito aditivo do piramidamento de genes  $R$  em aumentar o nível de resistência da cultivares contra diferentes patógenos. No entanto, os patógenos possuem mecanismos que podem potencialmente permitir uma rápida evolução para superar múltiplos genes de resistência, sobretudo quando apresentam uma alta probabilidade de sofrer mutações, especialmente sob baixo custo de adaptabilidade. Nesse caso, o piramidamento dos principais genes de resistência pode não ser a melhor estratégia, uma vez que essa acaba impondo uma elevada pressão direcional, no mesmo local e ao mesmo tempo, em favor das “super-raças”.

## 6.5. Mosaicos

A estratégia é baseada na implantação de pelo menos duas cultivares contendo diferentes genes de resistência ( $R1$  e  $R2$ , por exemplo), repetidamente em uma paisagem agrícola. Assim, uma parte da área é plantada com a cultivar  $R1$ , enquanto a outra parte com a cultivar  $R2$ . Essa estratégia é adotada principalmente para doenças causadas por patógenos que se dispersam a longas distâncias pelo ar, como as ferrugens, ou para aquelas transmitidas por vetores, como as viroses. Do mesmo modo que as estratégias anteriores, o mosaico impõe regime de seleção disruptiva às populações patogênicas, com o ambiente de seleção projetado para favorecer diferentes genótipos de patógenos em diferentes locais da paisagem (McDonald & Linde, 2002; Zhan et al., 2015). Como também mobiliza mecanismos epidemiológicos, como o efeito de diluição, inicialmente descrito para o uso de mistura varietal e multilinhas (Wolfe, 1985).

Em estudos comparando a durabilidade de um conjunto de genes conferindo resistência a vírus implantados individualmente em mosaicos regionais, ou piramidados em uma única cultivar, Djidjou – Demasse et al. (2017) observaram que as estratégias de mosaicos superaram as estratégias de pirâmide quando as infecções predominavam no campo, as intensidades epidêmicas (antes da implantação da cultivar  $R$ ) eram altas e os custos de condicionamento associados as mutações adaptativas no vírus eram baixas.



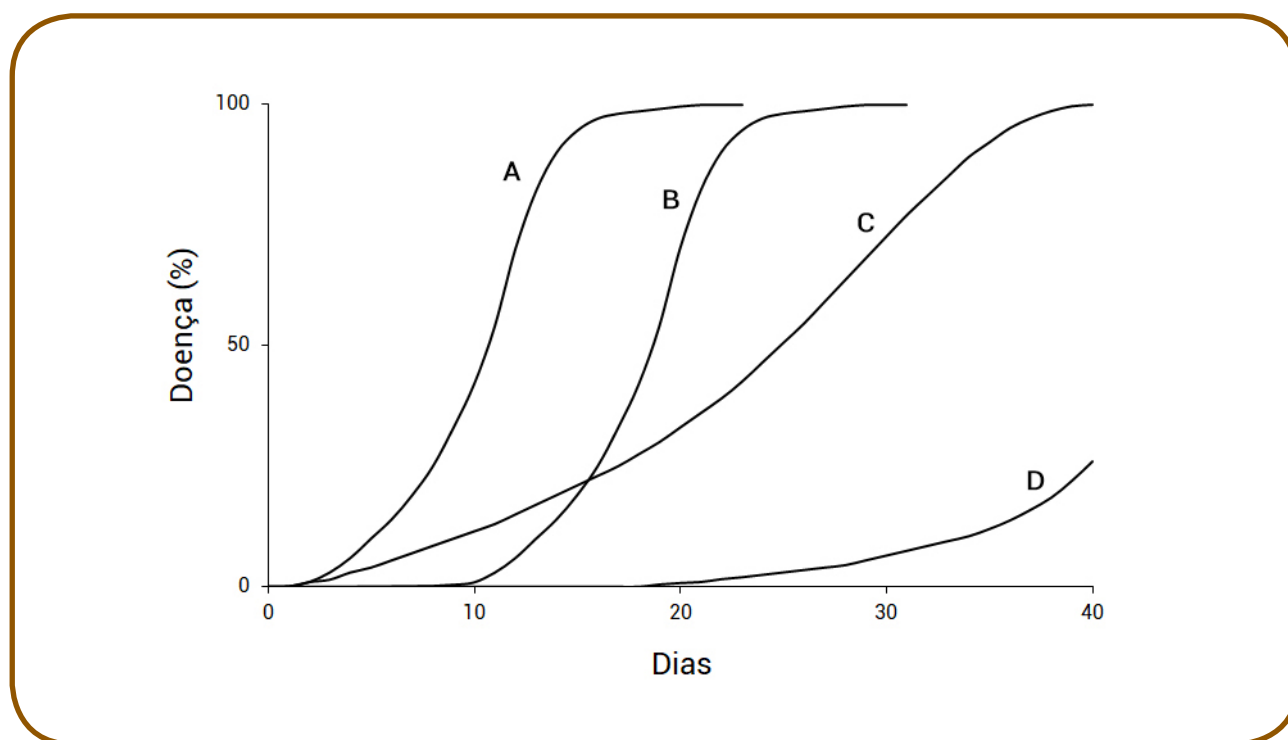
## 7. Resistência vertical e seu aumento do efeito da resistência horizontal

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 ao favorecer 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.

Embora os efeitos isolados de ambas as resistências (representado pelas variedades B e C) não apresentassem resultados promissores, a combinação delas (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 evitar maiores prejuízos. Assim, o efeito da resistência horizontal apresentada pela variedade D aumentou consideravelmente a eficiência da resistência vertical.



**Figure 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 Van der Plank, 1978)

Na prática, esse efeito na combinação entre resistência horizontal e vertical foi observado por Huang et al. (2018), para canela preta em canola, causada por *Leptosphaeria maculans*. Os resultados da pesquisa mostram que os genes *Rlm1* ou *Rlm4* quando combinados em cultivares com um fundo de resistência quantitativa apresentaram redução expressiva da doença, em comparação a cultivares contendo apenas os genes *R*. Além disso, as cultivares se mostraram menos sensíveis a mudanças nas condições ambientais, sugerindo que a combinação entre as diferentes resistências pode ser eficaz e estável para o controle da doença em diferentes locais. Barbary et al. (2014) obtve observação similar para espécies de nematoides causadoras de galhas em pimenta, através da introgressão dos genes *Me1* ou *Me3* em um fundo com resistência horizontal.

A combinação entre resistência vertical e horizontal também tem sido utilizada como estratégia para aumentar a durabilidade da resistência de cultivares a diferentes patógenos. A eficiência dessa estratégia foi observada inicialmente por Palloix et al (2009), ao introgridir um gene principal de resistência (*pvr2<sup>3</sup>*) contra *Potato virus Y* (PVY) em um fundo genético parcialmente resistente de pimenta. O mesmo foi observado na introgressão de um gene principal de resistência combinado com QTLs de resistência parcial contra *Leptosphaeria maculans* em canola (Brun et al, 2010) e em batata contra *Globodera pallida* (Fournet et al., 2013).

Esse efeito na durabilidade, atualmente pode ser explicado por três mecanismos (i) o nível de resistência horizontal adicional conferido pelo fundo genético poderia reduzir a multiplicação do patógeno e sua probabilidade de acumular mutações responsáveis pela suplantação da resistência; (ii) o aumento no número de mutações neces-

sárias para o patógeno suplantarem a resistência, além dos custos de condicionamento associados a essas mutações; (iii) por fim, a pressão de seleção exercida pela resistência horizontal nas populações de patógenos poderia ser menor, em relação à exercida pela resistência vertical, retardando o surgimento de raças adaptadas (Palloix et al, 2009).

## 8. Considerações finais

A resistência genética tem sido amplamente adotada dentro dos programas de manejo de doenças em campo. Mas, como visto no decorrer do capítulo, os patógenos possuem a capacidade de superar essa resistência e voltar a causar epidemias. Como as fontes de resistência são limitadas, algumas estratégias na implantação de cultivares resistentes são utilizadas, a fim de aumentar a sua eficiência epidemiológica e prolongar sua durabilidade. Essas estratégias, porém, não são universais e dependem do patossistema que está sendo trabalhado.

## 9. Referências bibliográficas

- ADILLAH TAN, M.Y.; HUTTEN RONALD, C.B.; VISSER, R.G.F.; HERMAN, J. VAN ECK. 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.
- BARBARY, A. et al. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 127, p. 499–507, 2014.
- 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: GERHOLD, H.D.; SCHREINER, E.J.; WINIESKI, J.A (eds) **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.
- 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.
- BURDON, J.J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. **Phytopathology**, v. 87, p. 664–669, 1997.

- 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.
- 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.
- CRILL, P. An assessment of stabilizing selection in crop variety development. **Annual Review Phytopathology**, v. 15, p. 185–202, 1977.
- CRILL, P.; HAM, Y.S.; BEACHELL, H.M. The rice blast disease in Korea and its control with race prediction and gene rotation. **Korean Journal of Breeding Science**, v. 13, p. 106–114, 1981.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature**, v. 411, p. 826–833, 2001.
- DJIDJOU-DEMASSE, R.; MOURY, B.; FABRE, F. Mosaics often outperform pyramids: insights from a model comparing strategies for the deployment of plant resistance genes against viruses in agricultural landscapes. **New Phytologist**, v. 216, p. 239-253, 2017.
- EVERSMEYER, M.G.; KRAMER, C.L. Epidemiology of wheat leaf and stem rust in the central great plains of the USA. **Annual Review Phytopathology**, v. 38, p. 491–513, 2000.
- FLOR, H.H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, v. 9, p. 275–296, 1971.
- FLOR, H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advanced Genetics**, v. 8, p. 29–54, 1956.
- 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.
- 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.
- GHISLAIN, M. et al. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1119-1129, 2019.
- HUANG, Y-J, MITROUSIA, G.K.; SIDIQUE, S.N.M.; QI, A.; FITT, B.D.L. Combining *R* gene and quantitative resistance increases effectiveness of cultivar resistance against *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* in different environments. **PLoS ONE** v. 13, n. 5. e0197752, 2018.
- HUANG, N. et al. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. **Theoretical 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.
- JØRGENSEN, J.H. Durability in the pathosystem: Barley powdery mildew. In: JACOBS, T.H.; PARLEVLIET, J. E. (eds) **Durability of Disease Resistance**. Springer-Science. v.18, 1993. p. 159-176.
- KAMOUN, S. Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. **Current Opinion Plant Biology**, v. 4, p. 295–300, 2001.
- MANWAN, I.; SAMA, S.; RIZVI, S.A. Use of varietal rotation in the management of rice tungro disease in Indonesia. **Indonesian Agricultural Research & Development Journal**, v. 7, p. 43–48, 1985.
- 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 Phytopathology**. v. 40, p. 349–79, 2002.
- MUNDT, C.C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 27. p. 446-455, 2014.
- NELSON, R.R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. **Annual Review Phytopathology**. v.16, p. 359–378, 1978.
- NIKS, R.E.; MARCEL, T.C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **New Phytology**. v. 182, p. 817–828, 2009.
- 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 Phytology**. v. 183, p. 190–199, 2009.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review Phytopathology**. v.17, p. 203–222, 1979.
- 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. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. **Euphytica**. v. 24, n. 2. p. 147–156, 2002.
- 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.
- PILET-NAYEL, M.L. et al. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. **Frontiers in plant science**, v.8, A. 1838, 2017.
- PRADHAN, S.K. et al. Pyramiding of three bacterial blight resistance genes for broad-spectrum resistance in deepwater rice variety, Jalmagna. **Rice**. v.8, A. 19, 2015.
- PRIESTLEY, R.H. Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust. In: SCOTT, P. R.; BAINBRIDGE, A. (eds). **Plant Disease Epidemiology**. Black well: Oxford, 1978. p. 63-70.
- RIMBAUD, L.; PAPAÏX, J.; BARRETT, L.G.; BURDON, J.J.; THRALL, P.H. Mosaics, mixtures, rotations or pyramiding: What is the optimal strategy to deploy major gene resistance? **Evolutionary Applications**. v. 11, p. 1791-1810, 2018.
- SAMA, S.; HASANUDDIN, A.; MANWAN, L.; CABUNAGAN, R.C.; HIBINO, H. Integrated management of rice tungro disease in South Sulawesi, Indonesia. **Crop Protection**. v. 10, p. 34–40, 1991.
- 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 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. 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.



- VAN DER PLANK J.E. **Genetic and molecular basis of plant pathogenesis**. Springer: Berlin Heidelberg New York. 1978. p. 167.
- VAN DER PLANK, J.E. **Host-Pathogen Interaction in Plant Disease**. Academic Press, New York/London, 1982. p. 207.
- VAN DER PLANK, J.E. *Plant diseases: epidemics and control*. Academic Press: London New York. 1963. p. 349.
- WOLFE, M.S. The current status and prospects of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease resistance. **Annual Review 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 Phytopathology**, v. 34, p. 479–501. 1996.
- ZADOKS, J.C. Systems analysis and the dynamics of epidemics. **Phytopathology**, v. 61, p. 600–610, 1971.
- ZHAN, J.; THRALL, P.H.; PAPAÏX, J.; XIE, L.; BURDON, J.J. Playing on a Pathogen's Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies. **Annual Review Phytopathology**. v. 53, p. 2.1-2.25, 2015.
- ZHANG, J.; LI, X.; JIANG, G.; XU, Y.; HE, Y. 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.
- ZHU, Y.Y. et al. Genetic diversity and disease control in rice. **Nature**. v. 406, p. 718-722, 2000.



**UNIVERSIDADE  
FEDERAL RURAL  
DE PERNAMBUCO**



ISBN: 978-65-00-20814-6



9 786500 208146