



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Mecanismo de defesa e resistência das plantas a agentes
patogénicos**

Maria Margarida Silva Trindade

Orientador(es) | **Maria do Rosário Félix**

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

**Mecanismo de defesa e resistência das plantas a agentes
patogénicos**

Maria Margarida Silva Trindade

Orientador(es) | Maria do Rosário Félix

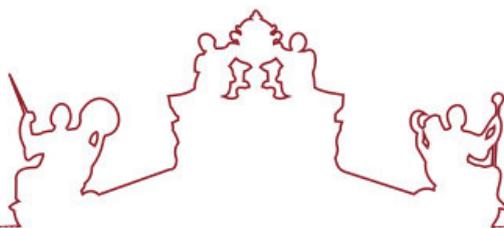
Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Carla Marisa Reis Varanda (Universidade de Évora) (Arguente)
Maria do Rosário Félix (Universidade de Évora) (Orientador)



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Carla Marisa Reis Varanda (Universidade de Évora) (Arguente)
Maria do Rosário Félix (Universidade de Évora) (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Não há nada que não se consiga fazer, basta ter as pessoas certas ao nosso lado.

Num percurso em que não via o fim, por motivos profissionais, que me fizeram parar, tive a sorte de ter comigo as pessoas que me deram a mão e me guiaram. Desistir nunca foi a palavra de ordem, mas sim adiar. Acredito que nada acontece por acaso e quando o mundo parou surgiu a minha oportunidade!

Um agradecimento muito especial à minha orientadora Professora Doutora Maria do Rosário Félix que, para além de ser uma inspiração e uma referência para mim, suscitou a paixão e curiosidade que tenho pela patologia das plantas. Acreditou sempre em mim e apoiou-me incondicionalmente, dando-me alento e coragem para terminar esta etapa. Com a sua ajuda escolhi o tema desta dissertação, que abracei com grande entusiasmo e dedicação. Agradeço também toda a sua disponibilidade e ajuda.

Aos meus pais Esmeralda e Fernando, às minhas irmãs Carolina e Madalena e ao meu namorado Ricardo, um agradecimento do fundo do coração por fazerem sempre parte do meu caminho e serem os meus pilares, auxiliando-me a tomar as decisões mais sensatas, dando-me coragem e incentivo para ser a melhor versão de mim própria e a nunca desistir.

À minha querida amiga Ana Bento um obrigada por me desafiar a auto superar.

RESUMO

As plantas são constantemente ameaçadas por diversos microrganismos patogênicos que prejudicam o seu crescimento e reprodução. Com isto, desenvolveram eficientes mecanismos de defesa físicos e químicos que podem ser inatos ou induzidos. Dependendo do tipo de interação com o patógeno, as plantas empregam estratégias de defesa distintas e específicas para a patogênese, através de um sistema imunológico multicamada, caracterizado por duas linhas de defesa: uma primeira, extracelular, que pode desencadear respostas de largo espectro (PTI) e uma segunda, intracelular, em que ocorre o reconhecimento muito específico do agente patogênico (ETI). Adicionalmente, embora não tenham um sistema imunológico, podem criar resistência induzida, que se caracteriza pela sinalização sistêmica da resposta de defesa do local de infecção para as partes distantes do mesmo, estabelecendo uma capacidade defensiva melhorada.

Compreender os mecanismos de defesa das plantas é fundamental para que se possam obter plantas mais tolerantes ou mimetizar e induzir estes mecanismos.

Palavras-Chave: Resposta de defesa, Mecanismos de defesa estrutural, mecanismos de defesa bioquímica, Vias de sinalização hormonal, Mecanismos de resistência induzida

ABSTRACT - Plants defence and resistance mechanisms against pathogens

Plants are constantly threatened by several pathogenic microorganisms that harm their growth and reproduction. With this, they developed efficient mechanisms of physical and chemical defence that can be innate or induced. Depending on the type of interaction with the pathogen, plants employ distinct and specific defence strategies for the pathogenesis, through a multi-layered immune system, which is characterized by two lines of defence: a first, extracellular, which can trigger wide-spectrum responses (PTI) and a second one, with intracellular origin, in which the very specific recognition of the pathogenic agent occurs (ETI). Additionally, although lacking an immune system, they can create induced resistance, which is characterized by the systemic signalling of the defence response from the infection site to the distant parts of it, establishing an improved defensive capacity.

Understanding the defence mechanisms of plants is essential to obtain more tolerant plants or to mimic and induce those mechanisms.

Keywords: Defence response, Structural defence mechanisms, Biochemical defence mechanisms, Hormonal pathways, Induced resistance mechanisms

ABREVIATURAS

5-C – Ligações isoterpenóides de 5 moléculas de carbono

Acetil-coA – Acetilcoenzima A

Ago – Argonaute

AOS – Active Oxygen Species

Avr – Avirulento(s)

Ca – Cálcio

Ca²⁺ – Ião Cálcio

Cu²⁺ – Ião de cobre

DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns

dsRNA - double-stranded RNA

ET – Ethylene

ETI – Effector Triggered Immunity

f. sp. – Forma specialis

Fe³⁺ – Ião de ferro

GSH – Glutathione

GSL – Glucosinolate

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HR – Hypersensitive Response

IC – Isochorismate

ICS – Isochorismate Synthase

IPL – Isochorismate Pyruvate Lyase

ISR – Induced Systemic Resistance

JA – Jasmonic Acid

K – Potássio

LOX – Lipoxygenase

LRRs - Leucine-Rich Repeat

MAMPs – Microbe-Associated Molecular Patterns

MAPKs – Mitogen-Activated Protein Kinases

Mg – Magnésio

mRNA – messenger RNA

NBS – Nucleotide-Binding Site

NBS-LRR - Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat Proteins

O₂⁻ – Anião superóxido

O₂ – Molécula oxigénio

OH – Radical hidroxilo

PAL - Phenylalanine ammonia lyase

PAMPs – Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCD – Programmed Cell Death

PGPR - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

PR – Pathogen Related

PR2 - Proteínas PR β-1,3-glucanases

PR3 – Proteínas PR quitinases

PR4 – Proteínas PR antifúngicas

PR6 - Proteínas PR inibidoras de protéase

PRRs – Pattern Recognition Receptors

PTGS - Post-Transcriptional Gene Silencing

PTI – PAMP Triggered Immunity

QTLs – Quantitative Trait Loci

RdRp - *RNA-dependent RNA polymerases*

RISC - RNA-Induced Silencing Complex

RKs – Receptor Kinases

RLPs – Receptor-Like Proteins

RNA – ribonucleic acid

RNAi - RNA interfering

ROS – Reactive Oxygen Species

S₄ – Tetrathietane

SA – Salicylic Acid

SAR – Systemic Acquired Resistance

Si – Silício

Sin. - Sinónimo

siRNA - small interfering RNA

spp. - Espécie

ssRNAs - single-stranded RNA

subsp. - Subespécie

TSWV - Tomato spotted wilt virus

VIGS - Virus-Induced Gene Silencing

ÍNDICE

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract - Plants defense and resistance mechanisms against pathogens.....	III
Abreviaturas	IV
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas.....	XI
1. Introdução.....	1
2. Tipos de micro parasitismo relativamente à interação patógeno – hospedeiro.....	3
3. Tipos de resistências das plantas a ataques de agentes patogénicos	4
4. Respostas de defesa	7
4.1. PTI – Linha de defesa primária.....	7
4.1.1. Reconhecimento das PAMPs/MAMPs	8
4.2. ETI – Linha de defesa secundária.....	9
4.2.1. Cascatas MAPK	10
5. Mecanismos de defesa estrutural.....	12
5.1. Estruturas de defesa inatas	12
5.2. Estruturas de defesa induzidas	13
5.2.1. Formação de camadas de células suberizadas.....	13
5.2.2. Formação de zonas de abscisão.....	14
5.2.3. Formação de tiloses.....	15
5.2.4. Deposição de gomas.....	16
5.2.5. Teor em silício.....	16
5.2.6. Hipertrofia da parede celular	17
5.2.7. Invólucros e colares haustoriais e deposição de papila	17
5.2.8. Defesa por reação citoplasmática	20
5.2.9. Reação necrótica estrutural através da resposta hipersensível	20
6. Mecanismos de defesa bioquímica.....	22
6.1. Resposta hipersensível (HR)	22
6.2. Espécies de oxigénio reativas (ROS)	23
6.3. Proteínas PR.....	25
6.4. Metabolitos Secundários	27
7. Defesa por silenciamento de genes	32

8. Vias de sinalização hormonal	34
8.1. Ácido Salicílico (SA)	34
8.2. Ácido jasmónico (JA)	35
8.3. Etileno (ET)	37
9. Mecanismos de resistência Induzida	38
9.1. Resistência Sistémica Adquirida (SAR).....	38
9.2. Resistência Sistémica Induzida (ISR)	39
Conclusão.....	41
Referências	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática do reconhecimento das moléculas padrão associadas ao patogénio (PAMPs) (círculos verdes) pelos recetores de reconhecimento padrão (PRRs) (a amarelo). P – Patogénio; C – Célula hospedeira..... 8
- Figura 2** Representação esquemática da ativação das proteínas de resistência pertencentes à família das “Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat Proteins” quer por deteção direta (esquerda) ou indireta (direita) das moléculas efetoras. (DeYoung & Innes, 2006) 10
- Figura 3** Representação esquemática das cascatas de fosforilação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)..... 10
- Figura 4** Formação de camada suberizada (CL) entre as áreas infetada (I) e saudável (H) da folha (esquerda). 14
- Figura 5** Esquema de formação da zona de abscisão (Agrios, 2004)..... 15
- Figura 6** Lesões de crivado causadas por *Stigmina carpophila* (Lév.) M.B.Ellis em pessegueiro (Luz, 2018)..... 15
- Figura 7** Desenvolvimento de tiloses nos vasos xilémicos. Cortes longitudinal (A) e transversal (B) de vasos saudáveis (esquerda) e vasos com tiloses. Os vasos à direita estão completamente entupidos com tiloses. (Agrios, 2004) 16
- Figura 8** Estruturas associadas à parede celular comumente observadas nos locais de infeção causados por míldio e outros fungos patogénicos. (A) Tentativa de penetração de um fungo interrompida pela deposição de aposições da parede celular (azul). A imagem ilustra uma vista de cima do local de penetração, como a visualização em microscópico ótico. (B) Evento de penetração sucedida, na qual o fungo formou uma estrutura de alimentação (haustório). Os materiais de aposição da parede celular formam um colar envolvendo o haustório, no ponto de infeção. (C) Haustório parcialmente cercado pelo invólucro. Este invólucro contém materiais semelhantes aos das aposições da parede celular. (D) Haustório completamente aprisionado. CW, parede celular; PM, membrana plasmática; C, conídio; PGT, tubo germinativo primário; AGT,

tubo germinativo apressorial; PP, ponto de penetração; H, haustório; EHM, membrana extra-haustorial; NB, colar haustorial; P, papila (ex. aposições da parede celular); E, invólucro haustorial. (Underwood, 2012)	19
Figura 9 Estágios de desenvolvimento da reação de defesa necrótica numa célula de uma variedade de batata muito resistente ao fungo <i>Phytophthora infestans</i> . N, núcleo; PS, suportes protoplasmáticos; Z, zoósporo; H, hifa; G, material granular; NC, célula necrótica. (Agris, 2004)	21
Figura 10 Representação esquemática da reposta hipersensível. Mesmo antes da penetração da membrana celular pelo patogénio, o núcleo migra em direção ao patogénio (a – b); formam-se filamentos citoplasmáticos (b), e observa-se um aumento da atividade nuclear (c). Após a infeção, os grânulos começam a formar-se (d) e a atividade do núcleo é interrompida. O núcleo e os vacúolos começam a degenerar (e), terminando no colapso do protoplasto (f). Adaptado de (Camagna & Takemoto, 2018).	22
Figura 11 (A) Folha de variedade de tabaco suscetível ao vírus do mosaico do tabaco com sintomas visíveis de infeção. (B) Resposta hipersensível em folha de variedade de tabaco resistente ao vírus do mosaico do tabaco. (Chakraborty et al., 2017)	23
Figura 12 Metabolitos secundários das plantas. (Zaynab et al., 2018).....	29
Figura 13 Cadeia dupla de RNA (dsRNA). Adaptado de (Zhu, 2017).....	32
Figura 14 Complexo de indução do silenciamento de RNA composto pela proteína Argonaute e a cadeia guia de RNA de interferência curta (siRNA). Adaptado de (World, 2018).....	32
Figura 15 Representação esquemática do mecanismo de defesa contra viroses através do silenciamento de genes: clivagem da cadeia dupla de RNA pela DICER e posterior ligação do complexo de indução do silenciamento de RNA (RISC) e ao mRNA alvo levando à sua degradação. Adaptado de (Zhu, 2017).....	33
Figura 16 Esquema da síntese de etileno. Adaptado de (“Ethylene pathway selection,” n.d.).....	37

Figura 17 Resistência sistêmica adquirida (SAR) induzida pela exposição de stress biótico ou abiótico dependente da fitohormona ácido salicílico (SA) e associada à acumulação de proteínas PR. Adaptado de (Vallad & Goodman, 2004)..... 38

Figura 18 Resistência sistêmica induzida (ISR) incitada pela exposição das raízes a estirpes específicas de rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR), dependente das fitohormonas ácido jasmônico (JA) e etileno (ET). Adaptado de (Vallad & Goodman, 2004)..... 39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das proteínas relacionadas com a patogênese (Van Loon & Van Strien, 1999). 26

1. INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos associados a plantas são patogênicos que prejudicam o seu crescimento e reprodução. Embora não tenham um sistema imunológico comparável aos animais, para sobreviver às ameaças contínuas, as plantas desenvolveram uma gama impressionante de defesas estruturais e químicas, que tanto podem estar naturalmente presentes como ser induzidas, destinadas a detectar organismos invasores e detê-los antes que causem danos extensivos (Beattie & Freeman, 2008; Broekaert, Delauré, De Bolle, & Cammue, 2006).

A visão atual do sistema imunológico das plantas é que este pode ser dividido em dois níveis de reconhecimento, distinguidos através de sinais de percepção para iniciar a resposta e a natureza ou severidade da resposta de defesa exibida (Underwood, 2012). O primeiro nível de reconhecimento envolve receptores de reconhecimento padrão (PRRs – do inglês “Pattern Recognition Receptors”) que reconhecem padrões moleculares associados a patogênicos (PAMPs – do inglês “Pathogen-Associated Molecular Patterns”). Esse tipo de imunidade é uma resposta de defesa basal chamada de imunidade desencadeada pelas PAMP (PTI – do inglês “PAMP Triggered Immunity”). O segundo nível do sistema imunológico da planta é realizado por proteínas de resistência (proteínas R) das plantas que reconhecem efetores específicos de patogênicos (proteínas Avr) e ativam os mecanismos de defesa da planta de uma forma muito mais eficaz (Kaloshian, 2004; Spoel & Dong, 2012). Este tipo de resistência é denominada por imunidade desencadeada por efetores (ETI – do inglês “Effector Triggered Immunity”) e frequentemente ativa respostas de hipersensibilidade (HR – do inglês “Hypersensitive Response”) que incluem morte celular programada em células infetadas (Mur, Kenton, Lloyd, Ougham, & Prats, 2007). Posteriormente a PTI e a ETI desencadeiam eventos importantes como a produção de espécies de oxigênio reativas (ROS – do inglês “Reactive Oxygen Species”) e a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs – do inglês “Mitogen-Activated Protein Kinases”) (Muthamilarasan & Prasad, 2013). Os dois tipos de imunidade inata podem ativar as mesmas respostas, mas a ETI é muito mais robusta (Tao et al., 2003).

No que diz respeito às vias de sinalização a jusante, induzidas pela ETI e PTI, destacam-se três hormonas: ácido salicílico (SA – do inglês “Salicylic Acid”), ácido jasmónico (JA – do inglês “Jasmonic Acid”) e etileno (ET – do inglês “Ethylene”). Enquanto a via SA estimula respostas de resistência a patógenos biotróficos e hemibiotróficos, as vias JA e etileno são geralmente induzidas contra patógenos necrotróficos (De Vleeschauwer, Xu, & Höfte, 2014). O SA, por sua vez, ativa uma resposta de resistência induzida denominada por resistência sistémica adquirida (SAR – do inglês “Systemic Acquired Resistance”), que promove a expressão de genes PR e fornece defesa de longo prazo contra um amplo espectro de patógenos (Grant & Lamb, 2006). O JA e ET estão associados à mediação da resistência sistémica induzida (ISR – do inglês “Induced Systemic Resistance”), induzida por rizobactérias. Embora as vias de sinalização de defesa SA, JA e ET tenham diferenças substanciais na expressão genética, interagem entre si para ajudar a planta a escolher a melhor estratégia de defesa (Glazebrook, 2005).

As plantas apresentam ainda um tipo de defesa relacionada com o silenciamento de genes que, embora esteja envolvida em processos biológicos como a regulação da expressão de genes endógenos e a manutenção da estabilidade do genoma, é particularmente interessante na defesa contra vírus. Esta denomina-se por **silenciamento de genes induzido por vírus**.

2. TIPOS DE MICRO PARASITISMO RELATIVAMENTE À INTERAÇÃO PATOGÊNIO – HOSPEDEIRO

A natureza da interação patógeno - hospedeiro diz respeito ao tipo de micro parasitismo. Existem três tipos de microrganismos, consoante o seu parasitismo: **necrotróficos**, que matam as células do hospedeiro, normalmente através da segregação de enzimas hidrolíticas e fitotoxinas que degradam os polímeros da parede celular, enquanto as colonizam, alimentando-se dos tecidos mortos (De Silva et al., 2016; Mendgen & Hahn, 2004); **biotróficos**, que penetram a parede celular, através de estruturas de alimentação, absorvendo nutrientes e suprimindo as defesas do hospedeiro, mantendo a sua viabilidade (Laluk & Mengiste, 2010) e **hemibiotróficos**, que exibem ambas as formas da aquisição de nutrientes, passando de uma fase biotrófica precoce para necrotrófica em estados posteriores da doença, como por exemplo o míldio da batateira e tomateiro causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary e a antracnose causada por *Colletotrichum* spp. (De Silva et al., 2016; Laluk & Mengiste, 2010; Mendgen & Hahn, 2004; Schulzen-Lefert & Panstruga, 2003; Stone, 2001; Underwood, 2012).

Ao contrário dos microrganismos necrotróficos, que matam rapidamente as células vegetais para se alimentarem posteriormente como saprófitas (por exemplo, um fungo que infeta plantas de milho como *Cochliobolus heterostrophus* (Drechsler) Drechsler (1934), os biotróficos e hemibiotróficos interagem com as células vivas da planta durante todo ou parte do seu ciclo de vida, aplicando estratégias subtis de interação com a parede celular (Laluk & Mengiste, 2010; Mendgen & Hahn, 2004; Underwood, 2012). No que diz respeito aos organismos biotróficos, estas interações podem ser realizadas por várias vias: intercelular, como é o caso do mecanismo de infecção do fungo *Cladosporium fulvum* Cooke; subcuticular, no caso do fungo *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter; inter e intracelular, como o dos fungos *Claviceps purpurea* (Fr.: Fr.) Tul. (1883) e *Ustilago maydis* (DC.) Corda (1842); extracelular, com haustórios dentro das células epidérmicas, como no caso dos fungos causadores de oídio; intercelular com haustórios nas células do parênquima, como no caso dos fungos dicarióticos e dos pseudofungos causadores de míldio (Mendgen & Hahn, 2004).

Esta diferença de interação sustenta a divergência da patogênese bem como as

respetivas estratégias de defesa das plantas (Laluk & Mengiste, 2010; Underwood, 2012).

3. TIPOS DE RESISTÊNCIAS DAS PLANTAS A ATAQUES DE AGENTES PATOGENICOS

A resistência das plantas a agentes patogénicos pode ser caracterizada de três maneiras distintas, consoante o tipo de reação destas a ataques. **Resistência por não-hospedeiro**, quando as plantas não pertencem ao leque de hospedeiros do patógeno; **resistência verdadeira**, quando possuem genes de resistência (genes R) direcionados contra os genes avirulentos do patógeno ou **resistência aparente**, quando, por várias razões, as plantas escapam ou toleram a infeção (Agrios, 2004).

A **resistência por não-hospedeiro** define a resistência de completas espécies de plantas contra um agente patogénico específico (Lee et al., 2017), sendo considerada como o sistema imunitário das plantas mais duradouro e eficiente (Kou & Wang, 2010). Segundo Lee et al. (2017), os múltiplos componentes de defesa das plantas estão envolvidos, de forma complexa, com a resistência das plantas aos organismos patogénicos. Heath (1981) sugeriu ainda que a resistência por não-hospedeiro consiste em fatores de defesa complexos que incluem uma barreira física ou química e uma resposta ativa ao ataque.

A **resistência verdadeira** é determinada pela resistência das plantas à doença, controlada geneticamente pela presença de um ou mais genes de resistência. Na resistência verdadeira, a planta hospedeira e o agente patogénico não são totalmente compatíveis, quer devido à falta de reconhecimento químico, quer pelo facto da planta se conseguir defender do agente patogénico (Agrios, 2004). A resistência verdadeira pode dividir-se ainda em **resistência quantitativa** e **resistência qualitativa**.

Quando um agente patogénico ataca a planta hospedeira, os genes deste são ativados, produzindo e libertando todas as armas de ataque (enzimas, toxinas, etc.) contra a planta que pretende infetar. Por sua vez, a planta dispõe de genes cujas funções são de proteção, codificando substâncias químicas tóxicas aos patógenos ou neutralizando as toxinas libertadas por estes, e genes responsáveis pela produção e regulação de estruturas físicas que podem atrasar ou impedir o avanço do agente

patogénico. Aquando do ataque pelo agente patogénico, a planta reage, utilizando diferentes combinações destas substâncias químicas tóxicas e defesas estruturais, pré-existentes ou induzidas, que permitem com que se defenda parcial ou completamente. Este tipo de defesa ou **resistência** é conhecido por **quantitativa, poligénica, geral, ou horizontal** pois, é mediada por múltiplos genes ou *loci* de características quantitativas (QTLs – do inglês “Quantitative Trait Loci”) responsáveis pela presença ou formação e produção de várias estruturas ou substâncias de defesa, respetivamente, providenciando um aumento parcial da resistência (Agrios, 2004; Kou & Wang, 2010). A resistência quantitativa é a mais importante ou única forma de resistência a microrganismos necrotróficos e alguns biotróficos (Poland, Balint-Kurti, Wisser, Pratt, & Nelson, 2008) . Contudo, segundo Laluk e Mengiste (2010), este tipo de resistência verifica-se quando o microrganismo necrotrófico não tem hospedeiros específicos, exigindo que a defesa do hospedeiro seja mais complexa, uma vez que envolve muitos genes e vias para a resistência total.

Em combinações planta-patogénio, especialmente aquelas que envolvem oomicetas biotróficos, fungos, bactérias, nemátodos e vírus, a defesa da planta hospedeira é através da presença de pares correspondentes de genes justapostos para a doença na planta e patogénio. A planta hospedeira tem um ou mais genes de resistência (genes R) por patogénio, capazes de atacar, enquanto cada patogénio tem genes avirulentos (genes *Avr*), correspondentes para cada gene R da planta hospedeira. Os genes *Avr* servem de impulsor para ativar os genes R. Aquando esta ativação, desencadeiam-se uma série de reações de defesa que neutralizam ou eliminam o patogénio específico que tem o gene de avirulência correspondente, enquanto as células infetadas e as vizinhas morrem. Este tipo de defesa ou **resistência** é designada por **qualitativa, monogénica, gene R ou vertical** (Agrios, 2004).

A resistência verdadeira é geralmente controlada por genes localizados no cromossoma das plantas. Contudo, existem determinadas doenças para as quais a resistência é controlada por material genético presente no citoplasma da célula, designando-se por **resistência citoplasmática** (Agrios, 2004).

A **resistência aparente** verifica-se nas plantas suscetíveis a determinada patologia, mas que permanecem livres de infeção e sintomas, geralmente resultado de uma

incapacidade de infecção por parte do agente patogénico ou por tolerarem essa infecção. A incapacidade de infecção ocorre sempre que plantas geneticamente suscetíveis não são infetadas, devido ao facto dos três fatores necessários para a doença (hospedeiro suscetível, patogénio virulento e ambiente favorável) não se verificarem ao mesmo tempo, ou durante tempo suficiente. Para além destes podem verificar-se outros fatores que permitem a planta não ser infetada pelo agente patogénico, tais como os que afetam a sobrevivência, infecciosidade, multiplicação, e/ou disseminação deste. A tolerância à doença reflete-se na capacidade que as plantas têm para produzir satisfatoriamente, ainda que infetadas, resultado de características específicas e hereditárias que permitem que o patogénio se desenvolva e multiplique, quer pela falta de locais recetores ou pela inativação ou compensação das substâncias tóxicas libertadas por este (Agrios, 2004).

4. RESPOSTAS DE DEFESA

As plantas desenvolveram um sistema imunológico multicamadas para proteger as células individuais de infecções causadas por patógenos. Esse processo é denominado imunidade inata e é fundamental para a sua sobrevivência (Cui, Tsuda, & Parker, 2015). Para tal, as plantas utilizam dois tipos de resposta de defesa para reconhecer e responder aos desafios do patógeno (DeYoung & Innes, 2006): um primário com origem extracelular, que pode desencadear respostas de largo espectro e outro, com origem intracelular, com reconhecimento muito específico do agente patogénico (Faulkner, 2016).

4.1. PTI – LINHA DE DEFESA PRIMÁRIA

O reconhecimento extracelular ocorre no primeiro instante, aquando o contacto do agente patogénico com a superfície das células. Este tem associadas moléculas-padrão (PAMPs/MAMPs – do inglês “Microbe-Associated Molecular Patterns”), libertadas à medida que a integridade da célula hospedeira se altera (Lee et al., 2017) que, por sua vez, são reconhecidas pelos recetores transmembranares das células (PRRs), principalmente localizados na membrana plasmática (Lee et al., 2017). O reconhecimento por parte dos recetores ativa a resposta imunitária basal ou inata – **a primeira linha de defesa** –, denominada por imunidade desencadeada pelas “PAMPs” (PTI) (Bent, Andrew F.; Mackey, 2007; DeYoung & Innes, 2006). Assim que a PTI é ativada induz-se uma matriz de respostas celulares, que compreendem **cascatas de fosforilação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)**, **fluxo de iões** através da membrana celular, produção de **espécies de oxigénio reativas (ROS)** e **reforço da parede celular** através da deposição de papila nos locais de deteção do patógeno (Nejat & Mantri, 2017; Nicaise, Roux, & Zipfel, 2009; Underwood, 2012).

A PTI normalmente evita que microrganismos não adaptados, ou seja, incapazes de superar esta barreira, infetem a planta sendo, portanto, uma barreira importante contra doenças (Cui et al., 2015).

4.1.1. RECONHECIMENTO DAS PAMPs/MAMPs

Quando o patógeno consegue ultrapassar as barreiras físicas da planta, chegando às células desta, é sujeito a um reconhecimento molecular. As plantas não têm células circulantes especializadas no reconhecimento de microrganismos. Em contrapartida, cada célula é capaz de fazer o reconhecimento e responder de forma independente. Esta identificação é feita pelos **receptores de reconhecimento padrão (PRR)**, localizados na superfície das células, que podem ser quinases recetoras (RKs – do inglês “Receptor Kinases”)

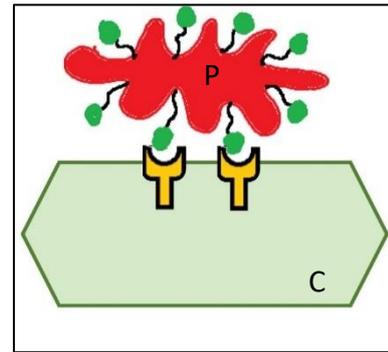


Figura 1 Representação esquemática do reconhecimento das moléculas padrão associadas ao patógeno (PAMPs) (círculos verdes) pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (a amarelo). P – Patógeno; C – Célula hospedeira

ou proteínas semelhantes a receptores (RLPs – do inglês “Receptor-Like Proteins”) e que contêm vários ectodomínios de ligação a ligantes, identificando **moléculas-padrão associadas ao patógeno** ou **dano (PAMPs/DAMPs** – do inglês “Damage-Associated Molecular Patterns”) (Zipfel, 2008, 2014). As PAMP também podem ser referidas como **moléculas-padrão associadas a microrganismos (MAMPs)**, uma vez que não se restringem a microrganismos patogênicos.

A percepção das PAMPs (Figura 1) constitui a primeira linha de defesa do sistema inato das plantas, sendo referida como **imunidade desencadeada pelas PAMPs (PTI)**.

É importante ressaltar que a PTI tem o potencial de afastar vários microrganismos, patogênicos ou não, devido à natureza conservativa das PAMPs, como flagelos de bactérias e quitina dos fungos, uma vez que permanecem inalteráveis ao longo da hierarquia taxonômica (espécie, gênero, família ou classe). Assim, os PRRs podem representar resistência à maioria dos patógenos não adaptados, bem como contribuir para a imunidade basal, que é a imunidade induzida pelas PAMPs, durante a infecção (Shamrai, 2014; Zipfel, 2014). A falta deste processo leva à maior suscetibilidade das plantas a doenças (Zipfel, 2008).

4.2. ETI – LINHA DE DEFESA SECUNDÁRIA

Para contornar a PTI, os patógenos, através da formação de estruturas invasoras especializadas ou introdução de moléculas efetoras específicas nas células hospedeiras, tentam suprimir as atividades dos componentes de sinalização destas (Faulkner, 2016; Rodriguez, Peterson, & Mundy, 2010). Se o patógeno for bem sucedido, e superar a primeira linha de defesa, invadindo o espaço intracelular, é acionada uma **segunda linha de defesa** denominada por **imunidade desencadeada por efetores (ETI)** (Faulkner, 2016). Neste mecanismo secundário, os agentes patogênicos, nomeadamente as suas moléculas efetoras, responsáveis pela virulência (*avr*), são reconhecidas, ao entrarem na célula, por recetores específicos, codificados por genes de resistência (genes R). Estes recetores são proteínas de resistência pertencentes à família das NBS-LRR (do inglês “Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat Proteins”), caracterizadas por terem um local de ligação a nucleótidos (NBS – do inglês “Nucleotide-Binding Site”) e outro de repetições ricas em leucina (LRRs – do inglês “Leucine-Rich Repeat”) (DeYoung & Innes, 2006; Faulkner, 2016; Rodriguez et al., 2010). Os recetores NB-LRR podem reconhecer efetores de patógenos diretamente por associação física ou indiretamente por meio de uma proteína acessória que faz parte do complexo da proteína NB-LRR (Figura 2) (Dodds & Rathjen, 2010). Nas plantas, as proteínas NB-LRR especificam a resistência gene para gene para animais, fungos, bactérias e vírus, e coletivamente constituem um sistema de deteção de patógenos abrangente (Van Der Biezen & Jones, 1998). A ETI desencadeia uma panóplia de processos que incluem a geração de ROS, cascatas de MAPKs e picos de CA^{2+} (Buscaill & Rivas, 2014), restabelece e amplifica os programas de transcrição basal da PTI e as defesas antimicrobianas, como as enzimas quitinases e β -1,3-glucanase, e é tipicamente acompanhada pela resposta hipersensível (HR), uma programação rápida da morte da célula no local de infeção com o fim de restringir que o patógeno se alastre (Cui et al., 2015; Jones & Dangl, 2006; Lee et al., 2017; Oliveira, Varanda, & Félix, 2016).

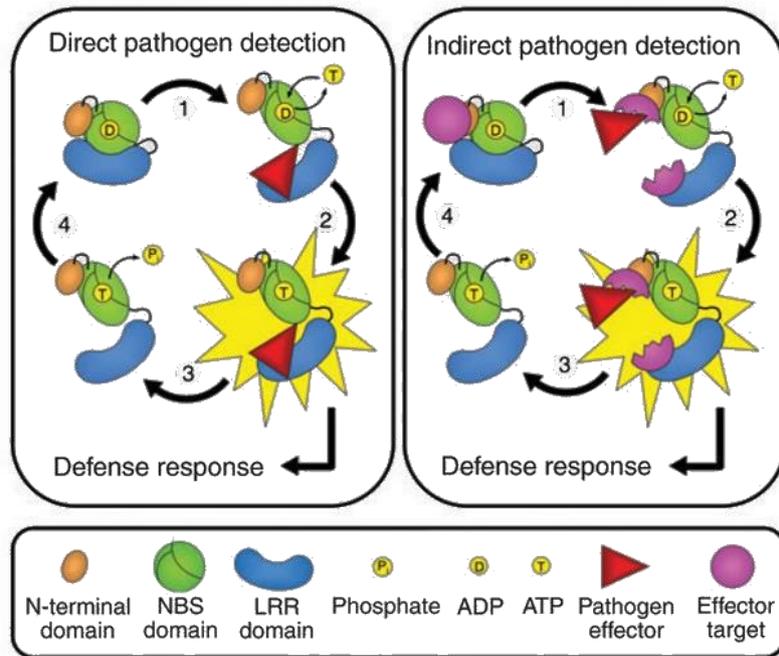


Figura 2 Representação esquemática da ativação das proteínas de resistência pertencentes à família das “Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat Proteins”, quer por detecção direta (esquerda), quer por indireta (direita) das moléculas efetoras do agente patogénico. (DeYoung & Innes, 2006)

4.2.1. CASCATAS MAPK

As cascatas MAPK são módulos, altamente conservados a jusante dos PRRs, de três tipos de quinases reversivelmente fosforiladas (MAP, MAPK e MAPKK), que transmitem e amplificam sinais levando à fosforilação de proteínas do substrato, cujas atividades alteradas medeiam uma ampla gama de respostas, incluindo mudanças na expressão genética (Figura 3) (Chang & Karin, 2001; Rodriguez et al., 2010; Widmann, Gibson, Jarpe, & Johnson, 1999). As cascatas MAPK desempenham um papel fundamental na sinalização da defesa das plantas contra o ataque de patógenos, uma vez que a ativação destas é um dos primeiros eventos de sinalização após a detecção de PAMPs e/ou efetores dos patógenos (Meng & Zhang, 2013). Estão envolvidas na sinalização de múltiplas

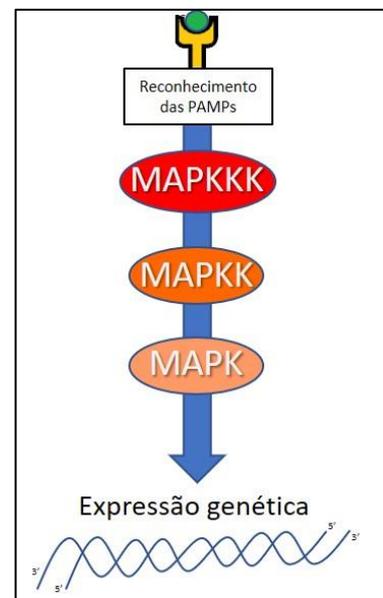


Figura 3 Representação esquemática das cascatas de fosforilação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK).

respostas de defesa, incluindo a biossíntese/sinalização de hormonas de defesa/*stress* das plantas, geração de espécies de oxigénio reativas (ROS), fecho estomático, ativação de genes de defesa, biossíntese de fitoalexinas, fortalecimento da parede celular e resposta hipersensível (HR) (Meng & Zhang, 2013).

5. MECANISMOS DE DEFESA ESTRUTURAL

A primeira linha de defesa da planta contra patógenos é a sua superfície, à qual estes últimos têm de aderir e penetrar para causar doença (Agrios, 2004). Apesar da epiderme ter variadas funções, a mais importante é a de prover proteção aos tecidos fotossintéticos e vasculares, delicados e de vital importância, que se encontram abaixo (Zeyen, Carver, & Lyngkjaer, 2002). Para assistir nesta função, a epiderme possui algumas **estruturas de defesa inatas**, ou seja, que estão naturalmente presentes na planta mesmo antes do contacto com o agente patogénico (Agrios, 2004; Dickison, 2000) e outras que estão ausentes na planta saudável, mas que se começam a formar assim que se dá o ataque e em resposta à infeção causada por este, designadas por **estruturas de defesa induzidas** (Singh & Singh, 2005).

5.1. ESTRUTURAS DE DEFESA INATAS

As **estruturas de defesa inatas** incluem a **quantidade e qualidade de ceras e cutículas**, que têm um papel de proteção da superfície de folhas e frutos ao formar uma camada hidrofóbica que atua como repelente da água e previne a retenção de gotas ou filme de água na qual os patógenos se podem depositar para germinar ou multiplicar (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005); a **estrutura da parede das células epidérmicas** que, sendo grossa e resistente torna a entrada direta de fungos patogénicos difícil ou até impossível (Singh & Singh, 2005); o **tamanho, localização e forma dos estomas, lenticelas e hidátodos**, que podem dificultar a entrada do agente patogénico, quer por não estarem abertos (por exemplo no caso da ferrugem do caule do trigo provocada pelo fungo *Puccinia graminis* (Pers.) f.sp. *tritici*, quer por terem uma entrada estreita (como é o caso do cancro bacteriano dos citrinos provocado pela bactéria *Pseudomonas syringae* van Hall). Relativamente aos estomas, e no caso das lenticelas, o seu pequeno tamanho pode proteger contra a entrada de patógenos tal como *Helminthosporium papulosum* Anth. Berg em maçã, por exemplo (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005); a **coifa** e a **mucilagem** das raízes, que proporcionam uma capa protetora ao longo da parede celular epidérmica ou, através da lubrificação, previne feridas excessivas das raízes, resultantes da abrasão provocadas pelas partículas de solo, reduzindo o potencial de

invasão por patogénios do solo, no caso da mucilagem (Singh & Singh, 2005); o **tegumento das sementes**, que providencia uma barreira efetiva contra a penetração de muitos patogénios (Singh & Singh, 2005); barreiras físicas internas, que pressupõem a presença de tecidos constituídos por **células** com **parede** mais **espessa**, impedindo o avanço do patogénio na planta: por exemplo, a presença de áreas extensas de células do esclerênquima podem parar a propagação de patogénios como a ferrugem do caule dos cereais (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005).

5.2. ESTRUTURAS DE DEFESA INDUZIDAS

As **estruturas de defesa induzidas** podem ser **histológicas**, envolvendo a formação de camadas de **células suberizadas**, **formação de zonas de abscisão**, **formação de tiloses** e **deposição de gomas**, ou **celulares**, envolvendo alterações morfológicas na parede celular ou derivadas destas serem invadidas pelo patogénio, que incluem **hipertrofia da parede celular**, **envolvimento da hifa de penetração** e **deposição de papila** (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005). Podem ainda ocorrer os processos de **reação de defesa citoplasmática**, quando as estruturas de defesa envolvem o citoplasma das células atacadas e **reação de defesa necrótica ou hipersensível**, que se baseia na morte da célula invadida, com o objetivo de proteger a planta hospedeira do desenvolvimento da patogénese (Agrios, 2004).

5.2.1. FORMAÇÃO DE CAMADAS DE CÉLULAS SUBERIZADAS

A infeção de plantas por alguns patogénios induz a formação de várias camadas de células suberizadas imediatamente a seguir ao ponto de infeção (Figura 4), resultado da estimulação das células hospedeiras por substâncias segregadas pelo patogénio (Singh & Singh, 2005). Esta camada não só inibe a propagação do agente patogénico, como bloqueia a proliferação de substâncias tóxicas que este último possa produzir (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005). Adicionalmente as camadas de células encortiçadas impedem a passagem de nutrientes e água das células saudáveis para as infetadas, privando o patogénio de se nutrir (Agrios, 2004). Os tecidos mortos, que incluem o patogénio, são, então, delimitados pelas camadas de cortiça, formando lesões

necróticas (pontos) uniformes, em tamanho e forma, para uma combinação hospedeiro-patogénio específica. Em certas combinações hospedeiro-patogénio, os tecidos necróticos são empurrados para fora pelos tecidos saudáveis subjacentes e as crostas das feridas podem-se destacar, removendo completamente o patogénio do hospedeiro (Agrios, 2004).

A eficácia destas camadas depende da velocidade com que é produzida, após a infeção, da espessura e grau de impregnação das suas paredes com suberina ou lenhina e das propriedades do patogénio em particular (Singh & Singh, 2005).

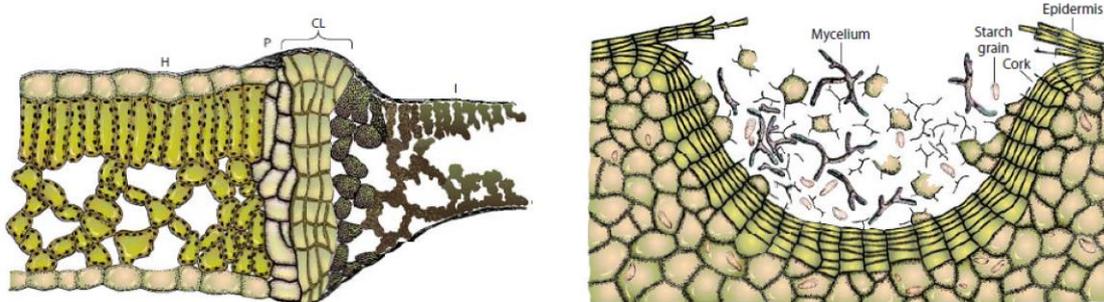


Figura 4 Formação de camada suberizada (CL) entre as áreas infetada (I) e saudável (H) da folha (esquerda). Formação de camadas de células suberizadas num tubérculo de batata após infeção por *Rhizoctonia solani* Kühn (direita). (Agrios, 2004)

5.2.2. FORMAÇÃO DE ZONAS DE ABCISÃO

As zonas de abscisão são formadas em folhas jovens e ativas de árvores do género *Prunus*, após infeção por qualquer tipo de patogénio (Figura 6). Estas consistem numa falha entre duas camadas circulares das células das folhas que rodeiam o local de infeção (Figura 5). Após infeção, a lamela entre essas duas camadas é dissolvida em toda a espessura da folha, cortando completamente a área central da infeção. A zona infetada vai secando e encolhendo até se destacar completamente do resto da folha, transportando consigo o patogénio. Adicionalmente, com esta área infetada, vão algumas células ainda saudáveis, com o objetivo de proteger o restante tecido foliar de nova infeção ou de substâncias tóxicas segregadas pelo agente patogénico (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005).

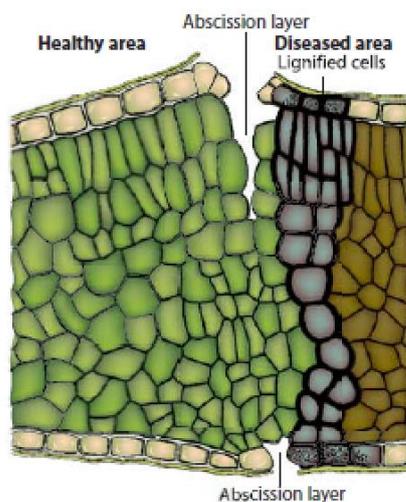


Figura 5 Esquema de formação da zona de abscisão (Agrios, 2004).



Figura 6 Lesões de crivado causadas por *Stigmina carpophila* (Lév.) M.B.Ellis em pessegueiro (Luz, 2018).

5.2.3. FORMAÇÃO DE TILOSES

As tiloses são supercrescimentos do protoplasto das células vivas do parênquima adjacente, que se projetam nos vasos xilêmicos, através das cavidades das paredes lenhificadas destes (Figura 7). Estas têm paredes celulósicas e podem, dependendo do tamanho e número, bloquear o vaso completamente. O *timing* e rapidez da formação das tiloses determina se o seu papel será defensivo ou um dos fatores para, por si só, causar doença (Singh & Singh, 2005). Em certas variedades de plantas, as tiloses formam-se abundante e rapidamente à frente do patogénio, enquanto este ainda se encontra nas raízes jovens, bloqueando a sua progressão (Agrios, 2004). É exemplo deste fenómeno a fusariose da batata doce (*Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (Wollenweber) Snyder et Hansen), o que faz com que a batata doce permaneça livre do patogénio e, conseqüentemente, tolerante ao mesmo (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005). Contrariamente, variedades em que a formação de tiloses é lenta e pouca ou nenhuma, tornam o hospedeiro suscetível ao patogénio (Agrios, 2004).

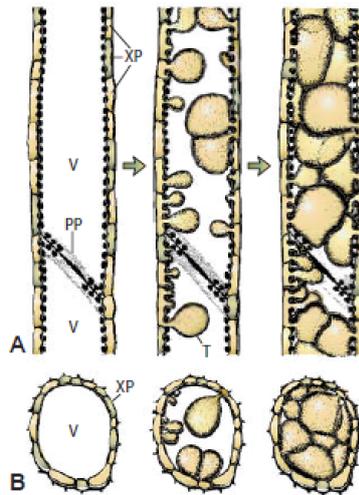


Figura 7 Desenvolvimento de tiloses nos vasos xilêmicos. Cortes longitudinal (A) e transversal (B) de vasos saudáveis (esquerda) e vasos com tiloses. Os vasos à direita estão completamente entupidos com tiloses. (Agrios, 2004)

5.2.4. DEPOSIÇÃO DE GOMAS

Existem variados tipos de gomas produzidos por plantas em redor das lesões após infecção por patógenos ou feridas. O papel defensivo das gomas baseia-se na sua rápida deposição no espaços intercelulares e dentro das células que circundam o local infetado, formando, deste modo, uma barreira impenetrável que isola completamente o patógeno, que, na ausência de nutrientes, acaba por morrer (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005). Este mecanismo é observado na cultura do arroz nas doenças piriculariose, provocada pelo fungo *Magnaporthe grisea* (T. T. Hebert) M. E. Barr, e “mancha parda”, provocada pelo fungo *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan (Singh & Singh, 2005)

5.2.5. TEOR EM SILÍCIO

Embora o Silício (Si) esteja presente em quantidades equivalentes em relação aos macronutrientes Ca, Mg e K na maior parte das plantas, nas gramíneas está presente em quantidades superiores que estes últimos. Segundo Zeyen, Ahlstrand, and Carver (1993), a participação do silício nos processos bioquímicos e fisiológicos, que levam à saúde, resistência a doenças e defesa contra insetos em gramíneas, é de extrema importância.

Segundo Volk, Kahn, e Weintraub (1958), o conteúdo em silício nas folhas de arroz “Caloro” e a suscetibilidade desta variedade ao fungo *Magnaporthe grisea*, estão relacionados inversamente. Tanto o teor em silício como o grau de suscetibilidade das folhas estão relacionados com a quantidade de silicatos presentes nas raízes. Deste modo, Volk et al. (1958) presumem que o silício, combinado com um ou mais componentes da parede celular, formam um complexo relativamente resistente ao ataque das enzimas extracelulares do fungo *Magnaporthe grisea*, diminuindo assim a penetração das hifas nas folhas. Mais tarde Rodrigues, Jurick, Datnoff, Jones, e Rollins (2005) comprovam que, para além do teor em silício aumentar a resistência à doença, provocada pelo fungo *Magnaporthe grisea*, fornece características citológicas e moleculares associadas a este fenómeno.

5.2.6. HIPERTROFIA DA PAREDE CELULAR

As células epidérmicas e subepidérmicas, em contacto com bactérias incompatíveis ou microrganismos de penetração direta, aumentam de volume, ou seja, sofrem hipertrofia, e produzem um material amorfo e fibrilar que envolve e retém o microrganismo patogénico, impedindo que este se multiplique (Agrios, 2004).

5.2.7. INVÓLUCROS E COLARES HAUSTORIAIS E DEPOSIÇÃO DE PAPILA

O reforço ativo da parede celular através da deposição de aposições, referida como papila, é uma resposta inicial à perceção de numerosas categorias de patogénios incluindo fungos e bactérias. A deposição rápida de papila está geralmente correlacionada com a resistência a fungos patogénicos que tentam penetrar na parede celular de modo a estabelecer estruturas de alimentação (Underwood, 2012). Quanto mais rápida for a formação de papila, maior a resistência à penetração do fungo; contrariamente, quanto mais lenta for, mais eficaz será a penetração por parte do microrganismo (Underwood, 2012). Defesas bem sucedidas associadas à parede celular podem interromper a invasão do patogénio num estado inicial, antes do estabelecimento da doença, e podem eliminar a necessidade de respostas de defesa mais extremas, como a morte celular por resposta hipersensível (Underwood, 2012).

De acordo com Meyer, Pajonk, Micali, O'Connel e Schulze-Lefert (2009) e Zeyen et al. (2002) as células vegetais respondem à invasão dos haustórios de determinados patogénios através da deposição de estruturas da parede celular associadas, incluindo **papilas**, **invólucros haustoriais** e **colares haustoriais** (Figura 8). Segundo Carver, Thomas, Robbins, e Zeyen (1998) a primeira resposta visível aquando o contacto do apressório de um fungo patogénico é o aparecimento de material auto fluorescente na parede celular subjacente. Minutos depois verifica-se um movimento ativo de citoplasma agregado, das células hospedeiras, que se reúne diretamente abaixo do apressório, desenvolvendo-se uma auréola, à medida que a parede celular é modificada, na zona em redor do contacto com o apressório. O agregado citoplasmático coincide com a deposição de materiais de papila.

A **papila** é uma estrutura complexa, depositada entre a membrana plasmática e a parte interior da parede celular, diretamente abaixo da zona onde houve tentativa de penetração por parte do agente patogénico (Carver et al., 1998; Voigt, 2014), que atua como barreira física, endurecendo a parede celular e fazendo com que esta não seja facilmente degradada pelas enzimas sintetizadas pelo patogénio (Underwood, 2012; Zeyen et al., 2002). Segundo Bednarek e Schulze-Lefert (2009) e Clay, Adio, Denoux, Jander e Ausubel (2009), a papila é também um local de acumulação de metabolitos secundários antimicrobianos. Embora a principal função da papila seja reparar os danos celulares, por vezes, especialmente se estiver presente antes da inoculação, incitada por danos físicos ou químicos, também previne que o patogénio penetre na célula (Agrios, 2004). No que diz respeito à sua composição bioquímica esta é constituída por um conjunto de substâncias químicas complexas infundidas, que podem variar consoante a espécie da planta hospedeira, mas que comumente incluem: **calose**, que serve de barreira de contenção para proteger a parede celular dos metabolitos tóxicos que se acumulam na papila e limita a difusão dos elicitores derivados do patogénio (Underwood, 2012); **compostos fenólicos**, incluindo lenhina; **conjugações fenólicas**, como poliaminas-fenólicas; **espécies reativas ao oxigénio (ROS)**; **peroxidases**; **proteínas estruturais da parede celular**, como arabinogalactano e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina; **polímeros da parede celular**, incluindo pectinas e xiloglucanos; **enzimas hidrolíticas** e níveis alterados de **elementos químicos**, como silício (Si) (Aist, 1976;

Underwood, 2012; Zeyen et al., 2002). Além dos materiais da parede celular, a papila e os invólucros também contêm materiais lipídicos da membrana e corpos multivesiculares que podem estar envolvidos na deposição de materiais para a formação destes (Meyer et al., 2009).

Os invólucros e colares haustoriais (Figura 8) foram propostos por Zeyen et al. (2002) como sendo extensões ou derivações da papila, através de observações ultraestruturais, mas, mais recentemente, a caracterização imunocitoquímica destes suportam a teoria de serem extensões da papila (Underwood, 2012).

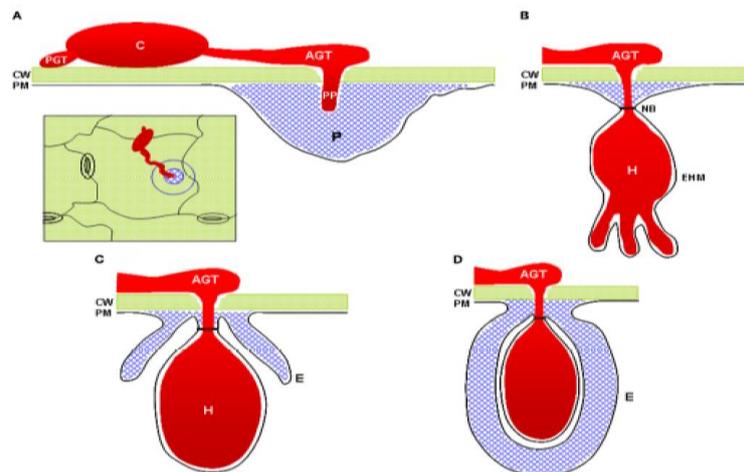


Figura 8 Estruturas associadas à parede celular comumente observadas nos locais de infecção causados por mildio e outros fungos patogênicos. (A) Tentativa de penetração de um fungo interrompida pela deposição de aposições da parede celular (azul). A imagem ilustra uma vista de cima do local de penetração, como a visualização em microscópico ótico. (B) Evento de penetração sucedida, na qual o fungo formou uma estrutura de alimentação (haustório). Os materiais de aposição da parede celular formam um colar envolvendo o haustório, no ponto de infecção. (C) Haustório parcialmente cercado pelo invólucro. Este invólucro contém materiais semelhantes aos das aposições da parede celular. (D) Haustório completamente aprisionado. CW, parede celular; PM, membrana plasmática; C, conídio; PGT, tubo germinativo primário; AGT, tubo germinativo apressorial; PP, ponto de penetração; H, haustório; EHM, membrana extra-haustorial; NB, colar haustorial; P, papila (ex. aposições da parede celular); E, invólucro haustorial. (Underwood, 2012)

5.2.8. DEFESA POR REACÇÃO CITOPLASMÁTICA

A primeira resposta citoplasmática, aquando o contacto com o microrganismo, é a ciclose do protoplasto, que resulta na reorganização dos organelos citoplasmáticos (Singh & Singh, 2005). Em infeções provocadas por fungos, como *Phytophthora erythroseptica* Pethyb., *P. infestans* e *Fusarium caeruleum* Lib. ex Sacc, verificou-se a dilatação e rompimento das partículas citoplasmáticas da célula hospedeira (Singh & Singh, 2005). Segundo Agrios (2004), em infeções provadas por fungos menos agressivos, como *Armillaria* spp. e alguns fungos micorrízicos, verifica-se o envolvimento do grupo de hifas pelo citoplasma da célula vegetal e o alongamento do núcleo, até ao ponto deste se dividir em dois. Em algumas células, a reacção do citoplasma é superada pelo agente patogénico e o protoplasto desaparece, enquanto o crescimento do microrganismo aumenta. Contudo, noutras células invadidas, o citoplasma e o núcleo aumentam de tamanho; o citoplasma torna-se granular e denso e aparecem várias partículas ou estruturas neste. Este processo resulta na desintegração do micélio do patogénio e a invasão para.

5.2.9. REACÇÃO NECRÓTICA ESTRUTURAL ATRAVÉS DA RESPOSTA HIPERSENSÍVEL

Embora a resposta hipersensível seja considerada um mecanismo de defesa bioquímica mais do que estrutural, algumas respostas celulares, que acompanham este mecanismo, podem ser visíveis a olho nu ou através do microscópio (Agrios, 2004). Ocorre apenas em situações de incompatibilidade de combinações hospedeiro-patogénio, nas quais este último pode penetrar na célula, mas assim que estabelece contacto com o protoplasto da célula hospedeira, o núcleo desta move-se ao seu encontro e desintegra-se (Agrios, 2004; Singh & Singh, 2005). Ao mesmo tempo formam-se grânulos resinosos e castanhos no citoplasma, primeiramente em volta do ponto de penetração do patogénio e depois ao longo do citoplasma (Figura 9). À medida que o citoplasma da célula se vai tornando castanho e a necrose se “instala”, a hifa invasora começa a degenerar. Na maioria dos casos a hifa não se expande a outras células quando em contacto com estas, verificando-se o cessar da infeção. Na infeção por bactérias nas folhas, a resposta hipersensível resulta na destruição de todas as membranas celulares

das células que estiveram em contacto com a bactéria, que é seguida de dissecação e necrose dos tecidos da folha invadidos por esta (Agrios, 2004).

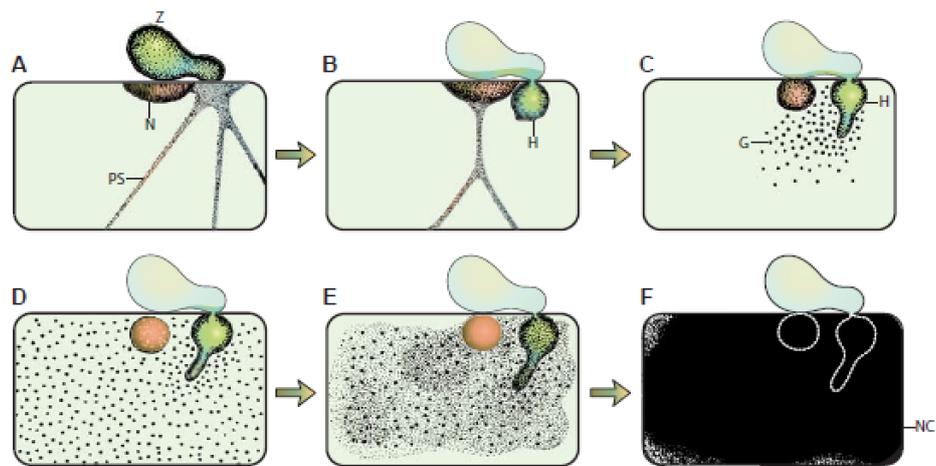


Figura 9 Estágios de desenvolvimento da reação de defesa necrótica numa célula de uma variedade de batata muito resistente ao fungo *Phytophthora infestans*. N, núcleo; PS, suportes protoplasmáticos; Z, zoósporo; H, hifa; G, material granular; NC, célula necrótica. (Agrios, 2004)

6. MECANISMOS DE DEFESA BIOQUÍMICA

6.1. RESPOSTA HIPERSENSÍVEL (HR)

A **resposta hipersensível** (HR) é um tipo de defesa das plantas em resposta ao ataque de patógenos, como vírus, bactérias, fungos ou nemátodes, caracterizada pela morte celular programada (Figura 10), no local de infecção, acompanhada pela acumulação de compostos tóxicos dentro das células mortas, bem como nas células que lhes são adjacentes (Goodman & Novaccky, 1994; Heath, 1981; Mehdy, 1994; Stakman, 1915; Thakur, Verma, Reddy, & Sharma, 2019).

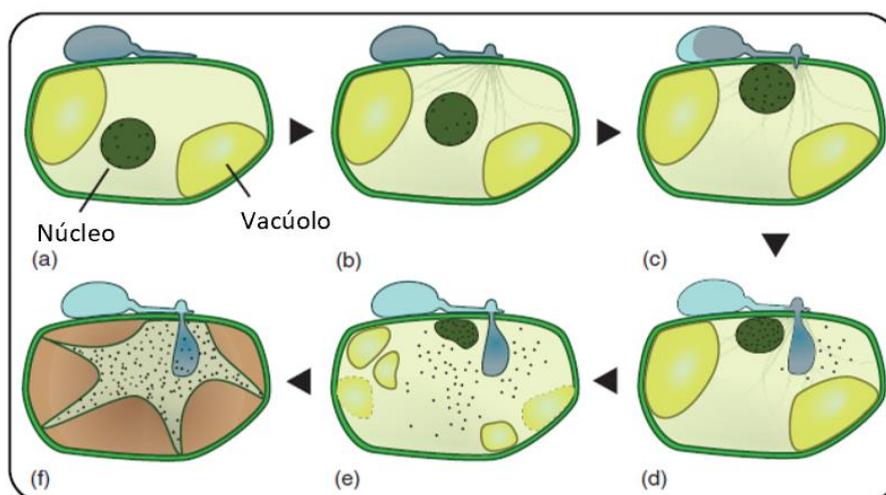


Figura 10 Representação esquemática da resposta hipersensível. Mesmo antes da penetração da membrana celular pelo patógeno, o núcleo migra em direção ao patógeno (a – b); formam-se filamentos citoplasmáticos (b), e observa-se um aumento da atividade nuclear (c). Após a infecção, os grânulos começam a formar-se (d) e a atividade do núcleo é interrompida. O núcleo e os vacúolos começam a degenerar (e), terminando no colapso do protoplasto (f). Adaptado de (Camagna & Takemoto, 2018).

Embora seja visível a olho nu (Figura 11), é considerada uma reação bioquímica, em vez de um mecanismo de defesa estrutural. A morte celular demonstra ser a extrema resistência das plantas, uma vez que as próprias células são mortas (“morte suicida”) com o objetivo de privar o patógeno de nutrientes e interrompendo, consequentemente, o seu crescimento (Thakur et al., 2019).

A indução desta resposta surge quando a planta reconhece moléculas sinalizadoras específicas produzidas por patógenos biotróficos e hemibiotróficos,

conhecidas como elicitores. Este reconhecimento ativa posteriormente uma cadeia de reações bioquímicas, cujas incluem produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), alterações na parede celular da planta, indução de metabolitos secundários, nomeadamente fitoalexinas, e síntese de proteínas PR, que confinam o crescimento do patógeno a uma pequena região da planta (Heath, 1981; Kombrinck & Somssich, 1995; Mehdy, 1994; Thakur et al., 2019). A associação da morte celular programada a estes processos bioquímicos, faz com que as células atacadas e as adjacentes sejam um ambiente inóspito para o desenvolvimento do microrganismo (Heath, 1981; Kombrinck & Somssich, 1995; Mehdy, 1994).

A HR desencadeia a resistência a patógenos biotróficos que obtêm a sua energia de células vivas (Kumar, Hüchelhoven, Beckhove, Nagarajan, & Kogel, 2001).

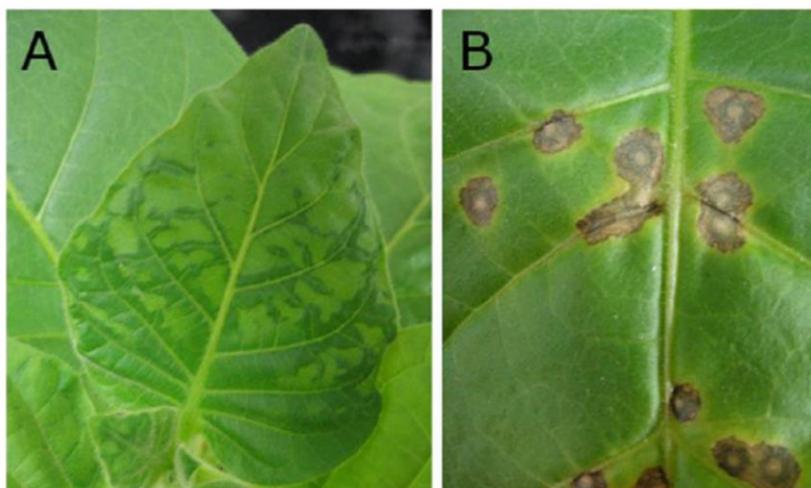


Figura 11 (A) Folha de variedade de tabaco suscetível ao vírus do mosaico do tabaco com sintomas visíveis de infecção. (B) Resposta hipersensível em folha de variedade de tabaco resistente ao vírus do mosaico do tabaco. (Chakraborty et al., 2017)

6.2. ESPÉCIES DE OXIGÉNIO REATIVAS (ROS)

As **espécies de oxigénio reativas (ROS)**, também conhecidas por espécies de oxigénio ativas (AOS – do inglês “Active Oxygen Species”), são intermediários tóxicos que resultam de etapas sucessivas de um eletrão na redução da molécula de O_2 , resultado do processo de reação oxidativa (Mehdy, 1994). Embora rotineiramente produzidas pelas células vegetais em níveis baixos, devido ao transporte de eletrões nos

cloroplastos e mitocôndrias e de enzimas noutros compartimentos celulares envolvidos em processos de oxidação/redução, as ROS, aquando o ataque do patogénio, são produzidas em maior quantidade, uma vez que o processo de reação oxidativa tende a ser mais rápido. Segundo Mehdy (1994), em interações planta-patogénio, as espécies predominantes detetadas são o anião superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo (OH) e a primeira reação durante o processo oxidativo é a redução de um eletrão de oxigénio molecular para formar o anião superóxido (O_2^-).

Segundo Sutherland (1991), em soluções aquosas, o anião superóxido sofre dismutação espontânea ($2O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Esta reação ocorre a uma taxa mais elevada em pH ácido, que se verifica na parede celular. Esta reação também é catalisada por enzimas superóxido dismutase que ocorrem no citosol, cloroplastos e mitocôndrias (Scandalios, 1993).

Adicionalmente o O_2^- também pode atuar como um agente redutor para metais de transição, como são os casos do Fe^{3+} e Cu^{2+} , cujos podem ser reduzidos mesmo se estiverem complexados com proteínas ou quelantes de baixo peso molecular. Uma consequência importante da redução do metal é que este pode levar à formação de radicais hidroxilo (OH) dependente do H_2O_2 (por exemplo $O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$ ou $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$) (Mehdy, 1994). Devido à sua extrema reatividade e a sua formação documentada em células que produzem O_2^- e H_2O_2 , o radical hidroxilo (OH) é considerado uma das principais ROS responsáveis por modificações de macromoléculas e danos celulares, uma vez que inicia reações em cadeia de radicais, incluindo peroxidação lipídica, inativação enzimática e degradação de ácidos nucleicos. Em comparação, o O_2^- e o H_2O_2 são agentes oxidantes mais fracos. No entanto, foi demonstrado que o O_2^- reage com proteínas contendo aglomerados de Fe- S_4 ou grupos heme e o H_2O_2 pode atacar grupos tiol de proteínas ou GSH (do inglês "Glutathione") (Thompson, Legge, & Barber, 1987).

Segundo Mehdy (1994), as ROS desempenham um papel importante na redução da viabilidade do patogénio, contribuem na morte da célula hospedeira aquando a reação hipersensível e ajudam no fortalecimento da parede celular.

6.3. PROTEÍNAS PR

As **proteínas relacionadas com a patogênese**, frequentemente chamadas de **proteínas PR**, são um grupo estruturalmente diverso de proteínas vegetais que são tóxicas para patógenos invasores. Embora amplamente distribuídas nas plantas em pequenas quantidades, quando o ataque de patógenos, são produzidas em maior quantidade, aumentando conseqüentemente a sua concentração na planta (Agrios, 2004; Chakraborty, Moeder, & Yoshioka, 2017). Os compostos de sinalização responsáveis pela indução das proteínas PR incluem o ácido salicílico, etileno, xilanase, o polipeptídeo sistemina, ácido jasmônico, entre outros (Agrios, 2004).

Segundo Van Loon (1985) as proteínas PR foram divididas inicialmente em cinco famílias tendo em conta a sua massa molecular, ponto isoelétrico, localização e atividade biológica. Agrios (2004) acrescenta ainda a relação serológica e sequência de aminoácidos como parâmetros para esta classificação.

Dependendo dos seus pontos isoelétricos, podem ser extremamente ácidas ou extremamente básicas e, portanto, altamente solúveis e reativas (Agrios, 2004). As proteínas PR ácidas estão localizadas maioritariamente nos espaços intercelulares, enquanto as básicas estão predominantemente presentes no vacúolo das células (Legrand, Kauffmann, Geoffroy, & Friting, 1987; Niki, Mitsuhara, Seo, Ohtsubo, & Ohashi, 1998; Van Loon & Van Strien, 1999). Segundo Leubner-Metzger e Meins (1999) e Neuhaus (1999) a maioria das proteínas PR nas plantas são solúveis em ácido, de baixo peso molecular e resistentes à protéase.

Atualmente as proteínas PR estão categorizadas em dezassete famílias de acordo com as suas propriedades e funções (Tabela 1) (Van Loon & Van Strien, 1999). De acordo com Agrios (2004) as mais conhecidas são as PR1 (antioomicetos e antifúngicas), PR2 (β -1,3-glucanases), PR3 (quitinases), PR4 (antifúngicas), PR6 (inibidoras de protéase), proteínas semelhantes à taumatina, defensinas, tioninas, lisozimas, proteínas semelhantes à osmotina, lipoxigenases, proteínas ricas em cisteína, proteínas ricas em glicina, protéases, quitosanases e peroxidases. Frequentemente, existem numerosas isoformas de cada proteína PR em várias plantas hospedeiras (Agrios, 2004).

Tabela 1 Classificação das proteínas relacionadas com a patogénese (Van Loon & Van Strien, 1999).

Famílias	Membro tipo	Propriedades
PR1	Tobacco PR-1a	Antifúngica
PR2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR3	Tobacco P, Q	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR4	Tobacco 'R'	Quitinase tipo I, II
PR5	Tobacco S	Semelhante à taumatina
PR6	Tomato Inhibitor I	Inibidora da protease
PR7	Tomato P69	Endoprotease
PR8	Cucumber chitinase	Quitinase tipo III
PR9	Tobacco 'lignin forming peroxidase'	Peroxidase
PR10	Parsley 'PR1'	Semelhante à ribonuclease
PR11	Tobacco 'class V' chitinase	Quitinase tipo I
PR12	Radish Rs- AFP3	Defensinas
PR13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Tioninas
PR14	Barley LTP4	Proteína de transferência de lípidos
PR15	Barley OxOa (germin)	Oxalato oxidase
PR16	Barley OxOLP	Semelhante a oxalato oxidase
PR17	Tobacco PRp27	Desconhecida

A importância destas reside no facto de apresentarem forte atividade antifúngica e outras atividades antimicrobianas, uma vez que algumas inibem a libertação de esporos ou a sua germinação, estão associadas ao fortalecimento da parede celular do hospedeiro com a consequente formação de papilas, são responsáveis pela degradação da parede celular de fungos e oomicetas, como é o caso das quitinases e β -1,3-glucanases, degradam os componentes glucosamina e ácido murâmico, das paredes das células bacterianas, no que diz respeito às lisozimas, ou geram metabolitos antimicrobianos, bem como moléculas secundárias sinalizadoras, como o ácido jasmónico (JA), relativamente às lipoxigenases e peroxidases lipídicas, por exemplo (Agrios, 2004; Kauffmann, Legrand, Geoffroy, & Friting, 1987; Legrand et al., 1987).

Adicionalmente, Ebrahim, Usha e Singh (2011) acrescentam que a produção de proteínas PR nas partes não infetadas das plantas pode evitar que a infeção se propague. A acumulação de proteínas PR também está intimamente associada à indução da resposta hipersensível (HR), acumulação da hormona vegetal ácido salicílico (SA) e a

resistência sistêmica adquirida (SAR), uma forma de resistência duradoura e de amplo espectro (Vlot, Dempsey, & Klessig, 2009).

6.4. METABOLITOS SECUNDÁRIOS

Apesar das defesas estruturais passivas limitarem o acesso de muitos patógenos às plantas hospedeiras, estas nem sempre são eficazes, permitindo que outros infetem a planta (Walters, 2011a). Com isto, a resistência das plantas a agentes patogênicos não depende apenas das suas barreiras estruturais, mas também das substâncias químicas produzidas nas suas células antes ou depois da infecção (Agrios, 2004).

As substâncias químicas produzidas pelas plantas podem ser divididas em duas grandes categorias: **metabolitos primários** e **metabolitos secundários**. Os **metabolitos primários** são substâncias produzidas por todas as células da planta afetas ao crescimento, desenvolvimento ou reprodução, como por exemplo, as proteínas, aminoácidos, açúcares e ácidos nucleicos. Em contra partida, os **metabolitos secundários** não estão diretamente afetos ao crescimento ou reprodução, mas sim à defesa das plantas, uma vez que constituem um leque variado de compostos antimicrobianos, que atuam como barreiras químicas à invasão por patógenos, sendo encontrados com frequência apenas numa espécie de plantas ou grupos de espécies taxonomicamente relacionados (Mazid, Khan, & Mohammad, 2011; Wink, 1999). Os metabolitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos químicos: **terpenos**, **compostos fenólicos** e **compostos com azoto ou enxofre** (Beattie & Freeman, 2008; Mazid et al., 2011; Walters, 2011a; Zaynab et al., 2018). Os **terpenos** são a maior classe de metabolitos secundários: têm cinco ligações de carbono isoterpenóides (5-C) como unidade básica e estão unidos pela sua origem biossintética comum a partir de acetil-coA ou intermediários glicolíticos (Croteau, 1988; Fraga, 1988; Gershenzon & Croteau, 1991; Grayson, 1998; Loomis & Croteau, 1980; Robinson, 1980; Zaynab et al., 2018). São sintetizados pela via do mevalonato ou via do fosfato de metileritritol. A primeira está localizada no citosol e leva à formação de sesquiterpenos, triterpenos, esteróis e politerpenos, enquanto a última está localizada nos plastídios e resulta na formação de isopreno, monoterpenos, diterpenos e carotenóides (Lichtenthaler, 1999;

Walters, 2011b). Uma grande maioria das diferentes estruturas de terpenos produzidas pelas plantas como metabolitos secundários presume-se que estejam envolvidas na defesa como toxinas e impedimentos na alimentação de um grande número de insetos e mamíferos (Gershenzon & Croteau, 1991). Os **compostos fenólicos** representam o segundo maior grupo dos metabolitos secundários produzidos pelas plantas. São sintetizados através da via do ácido chiquímico ou ácido malónico e possuem um grupo fenol, ou seja, um grupo funcional hidroxilo num anel aromático (Walters, 2011b). Estes compostos são importantes no sistema de defesa das plantas contra pragas e doenças, incluindo nemátodos (Wuyts, De Waele, & Swennen, 2006). Dentro destes compostos os flavonóides são o maior e mais diverso grupo nas plantas, podendo ser subdivididos em vários grupos, incluindo flavonas, flavanonas, flavonóis e chalconas (Harborne, 1979; Mazid et al., 2011). No que diz respeito aos **compostos com azoto ou enxofre** estes são maioritariamente sintetizados através de aminoácidos (Rosenthal & Berenbaum, 1992; VanEtten, Mansfield, Bailey, & Farmer, 1994). Os **compostos com enxofre** incluem glutationas (GSH), glucosinolatos (GSL – do inglês “Glucosinolate”), fitoalexinas, tioninas, defensinas/fitoantecipinas e alininas, cujas têm sido ligadas direta ou indiretamente à defesa contra patógenos microbianos e alguns à resistência sistémica induzida (SIR) (Bloem, Haneklaus, & Schnug, 2005; Crawford, Kahn, Leustek, & Long, 2000; Grubb & Abel, 2006; Halkier & Gershenzon, 2006; Leustek, Martin, Bick, & Davies, 2000; Mazid et al., 2011; Saito, 2004). Os **compostos com azoto** incluem glicosídeos cianogénicos, aminoácidos não proteicos e alcalóides (Walters, 2011b). Todos estes são de considerável interesse devido ao seu papel na defesa contra herbívoros e na toxicidade para humanos (Mazid et al., 2011).

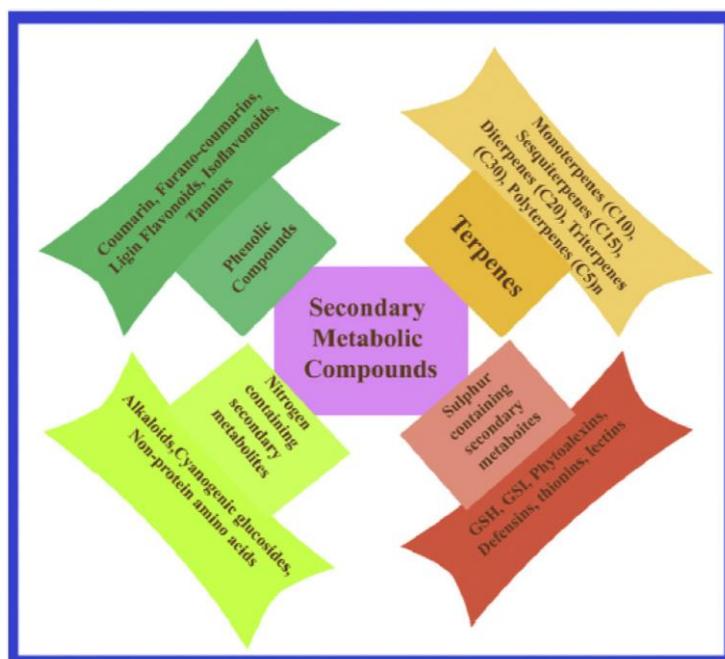


Figura 12 Metabolitos secundários das plantas. (Zaynab et al., 2018)

Por sua vez, tendo em conta estes três grupo acima mencionados, os metabolitos secundários podem ainda ser amplamente divididos em dois grupos: **fitoantecipinas**, um grupo de metabolitos secundários constitutivos/inatos e **fitoalexinas**, metabolitos induzidos, que são sintetizados e acumulados rapidamente em resposta ao ataque do patogénio (Bednarek & Schulze-Lefert, 2009; Dixon, 2001; Grayer & Harborne, 1994; Hammerschmidt, 1999; Mazid et al., 2011; Pedras, Yaya & Glawischmig, 2011; VanEtten et al., 1994; Wink, 1999).

As **fitoantecipinas** são sintetizadas pelas plantas, não desafiadas, durante o seu normal crescimento e desenvolvimento, e acumuladas em tecidos específicos, órgãos, ou estruturas especializadas, normalmente sequestradas no vacúolo ou noutra compartimento subcelular, sendo consideradas a **primeira linha de defesa química** das plantas (Mazid et al., 2011; Morissey & Osbourn, 1999; VanEtten et al., 1994). Estas substâncias são os antibióticos presentes nos tecidos antes da infeção, servindo de base para a tolerância a pragas e doenças (Oros & Kállai, 2019). De acordo com Harborne (1993) e Walters (2011) a concentração das fitoantecipinas pode variar enormemente entre plantas, mesmo de espécies diferentes, dependendo também de outros fatores como idade, solo e ambiente. Harborne (1993) refere ainda que a alocação destas se verifica em tecidos ou partes mais vulneráveis, importantes para

uma eficaz reprodução e saúde bem como onde estas são mais rapidamente perceptíveis pelos organismos patogénicos, nomeadamente a superfície da planta, incluindo as ceras das folhas, tricomas e outros. Bednarek e Schulze-Lefert (2009) concentram-se em três classes de produtos constitutivos secundários: as **saponinas**, **glucosídeos benzoxazinonas** e **glucosinolatos**. As **saponinas** são glicosídeos de triterpenos, esteróides ou alcalóides esteroidais, com propriedades detergentes, capazes de corromper as membranas celulares dos agentes patogénicos, encontrando-se tanto em espécies de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (Agrios, 2004; Osbourn, 1996). Segundo Agrios (2004), as fitoantecipinas incluem principalmente as saponinas avenacina e tomatina, presentes na aveia (*Avena* spp.) e tomate (*Lycopersicum esculentum*) (Arneson & Durbin, 1968), respetivamente. Os **glucosídeos benzoxazinonas** são compostos encontrados em algumas plantas gramíneas, como por exemplo milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum* spp.) e centeio (*Secale cereale*), que contribuem para a resposta de resistência a doenças (Niemeyer, 1988; Sicker, Frey, Schulz, & Gierl, 2000). Segundo Argandona, Zuniga, e Corcuera (1987) a concentração destas substâncias é inversamente proporcional à sua idade, ou seja, geralmente encontram-se em maior quantidade em plantas mais jovens. Por fim, os **glucosinolatos** são metabolitos secundários únicos em plantas que contêm enxofre e azoto, reportados, deste modo, quase exclusivamente na ordem *Capparales*, que inclui a família *Brassicaceae* (Grubb & Abel, 2006). Segundo Halkier e Gershenzon (2006) têm função de defesa contra a generalidade dos herbívoros.

Contrariamente, as **fitoalexinas** são metabolitos secundários induzidos, sintetizados e acumulados *de novo* em resposta à infeção por microrganismos ou outras condições de *stress*, não estando presentes na planta sob condições normais (Oros & Kállai, 2019; Pedras & Yaya, 2015). A sua produção pode levar dois a três dias, após o ataque, uma vez que primeiro é sintetizado o sistema enzimático que lhe dá origem (Grayer & Harborne, 1994). As fitoalexinas têm um papel de defesa uma vez que ajudam a limitar a propagação dos patogénios invasores ao acumularem-se à volta do local de infeção (Bailey & Mansfield, 1982; Darvill & Albersheim, 1984; Grayer & Harborne, 1994; VanEtten et al., 1994). Normalmente, o tipo de fitoalexinas produzidas diz respeito à família a que a planta pertence (Guest, 2017). No caso das solanáceas as

fitoalexinas são sesquiterpenos; nas brássicas têm uma índole baseada em compostos de enxofre, como a camalexina; as rosáceas apresentam dibenzofuranos e nas fabáceas as fitoalexinas são tipicamente isoflavonas (Gross, Porzel, & Schmidt, 1994; Guest, [Clique ou toque para introduzir uma data.](#)2017; Pedras, Khan, & Taylor, 1997, 1998).

Segundo VanEtten et al. (1994) é importante ressaltar que a distinção entre fitoalexinas e fitoanticipinas não se baseia na sua estrutura química, mas sim em como é produzida, pois o mesmo composto químico pode servir tanto como fitoalexina como fitoanticipina, mesmo na mesma planta. Bailey e Mansfield (1982), Ingham (1972, 1973) e Pedras e Yaya (2015) referem ainda que metabolitos induzidos numa espécie de planta podem ser preformados noutra. É exemplo o resveratrol, que mesmo sendo uma das mais conhecidas fitoalexinas, não o é em todas as espécies, mas sim uma fitoanticipina noutras plantas que a produzem (Donnez, Jeandet, Clément, & Courrot, 2009). Deste modo, Pedras e Yaya (2015) referem que não devem ser feitas generalizações nem suposições na ausência de resultados experimentais adequados.

7. DEFESA POR SILENCIAMENTO DE GENES

O **silenciamento de genes**, também designado por **silenciamento de genes pós-transcricional** (PTGS, do inglês “Post-Transcriptional Gene Silencing”) ou **interferência do RNA** (RNAi, do inglês RNA interfering”) é um mecanismo apresentado naturalmente pela maioria dos seres eucariontes envolvido em processos biológicos como a regulação da expressão de genes endógenos, a manutenção da estabilidade do genoma e a defesa contra vírus (Voinnet, 2001), baseado na degradação de sequências alvo específicas de RNA a fim de controlar o genoma expresso (Agrios, 2004; Kontra et al., 2016).

Quando um vírus infeta uma célula hospedeira, o seu RNA viral é exposto e imediatamente replicado, resultando numa **cadeia dupla de RNA** (dsRNA, do inglês “double-stranded RNA”) (Figura 13) (Varanda et al., 2018). As cadeias duplas de RNA não existem nas células vegetais, pelo que vão

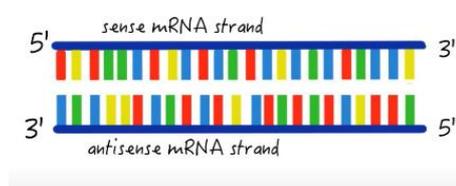


Figura 14 Cadeia dupla de RNA (dsRNA). Adaptado de (Zhu, 2017).

ser reconhecidas como estranhas, levando à ativação do mecanismo de defesa que envolve a destruição deste genoma – é acionado o **silenciamento de genes pós-transcricional**, neste caso designado por **silenciamento de genes induzido por vírus** (VIGS, do inglês “Virus-induced Gene Silencing”). O primeiro passo deste processo passa pela clivagem das dsRNAs dentro da célula, realizada pela ribonuclease **Dicer** (Figura 15), que resulta em pequenos fragmentos com cerca de 21 – 22 nucleotídeos, designados por **RNA de interferência curta** (siRNA do inglês “small interfering RNA”) (Agrios, 2004; Baulcombe, 2004; Varanda et al., 2018). Estes fragmentos, por sua vez, associam-se a proteínas da família *Argonaute* (Ago), formando o **complexo de indução do silenciamento de RNA** (RISC, do

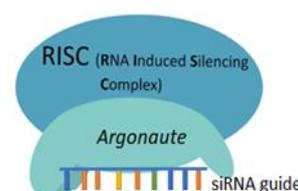


Figura 13 Complexo de indução do silenciamento de RNA composto pela proteína Argonaute e a cadeia guia de RNA de interferência curta (siRNA). Adaptado de (World, 2018).

inglês “RNA-induced silencing complex”) (Figura 14). Este complexo possui atividade de ribonuclease, separando a cadeia dupla dos siRNAs, em duas cadeias simples (ssRNAs, do inglês “single-stranded RNA”), permanecendo apenas a sequência guia ligada, ou seja, aquela que vai conduzir o complexo até ao mRNA (do inglês “messenger RNA”) alvo, com base na complementaridade da sequência, resultando na ligação e posterior

degradação do mRNA. Uma vez degradada a sequência alvo de mRNA a produção da proteína fica comprometida (Figura 15).

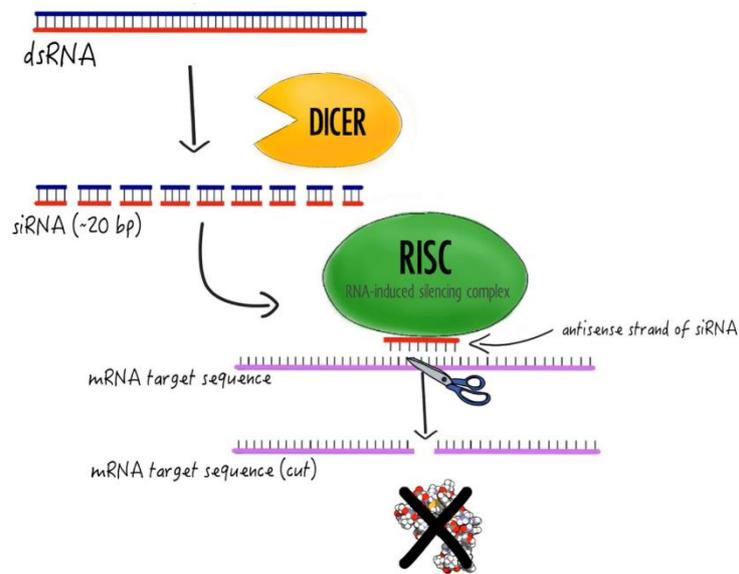


Figura 15 Representação esquemática do mecanismo de defesa contra vírus através do silenciamento de genes: clivagem da cadeia dupla de RNA pela DICER e posterior ligação do complexo de indução do silenciamento de RNA (RISC) e ao mRNA alvo levando à sua degradação. Adaptado de (Zhu, 2017).

Os produtos resultantes da clivagem dos mRNAs alvo, ou seja, os siRNAs, podem ser reutilizados, nomeadamente para a formação do complexo RISC, e servem como modelo para as RNA polimerases (RdRp, do inglês *RNA-dependent RNA polymerases*) formarem dsRNAs, levando à produção secundária de siRNAs, a qual pode novamente iniciar o mecanismo de silenciamento de forma autossustentável (Varanda et al., 2018).

Os siRNAs não são dependentes das células, podendo mover-se dentro da planta para transmitir o silenciamento do gene de célula em célula ou sistemicamente, em longa distância, como sinais de silenciamento móvel (Dunoyer et al., 2010; Molnar, Melnyk, & Baulcombe, 2011; Voinnet, 2001).

No que diz respeito à defesa contra vírus é notavelmente eficiente pois, uma vez ativado por moléculas de RNA estranhas, apresenta a particularidade de criar “memória” da sequência que degradou, pelo que a planta degradará todo o RNA citoplasmático que compartilhe a sequência homóloga (Voinnet, 2001).

8. VIAS DE SINALIZAÇÃO HORMONAL

As hormonas vegetais, também conhecidas como fito hormonas, são pequenas moléculas orgânicas naturalmente presentes nas plantas, importantes não só para os processos de desenvolvimento da planta, como para sinalizarem respostas de defesa e imunológicas. O **ácido salicílico (SA)**, o **ácido jasmónico (JA)** e o **etileno (ET)** são as hormonas associadas às respostas de defesa contra patogénios (Shigenaga & Argueso, 2016).

Segundo Shigenaga e Argueso (2016) nenhuma hormona isolada controla a imunidade das plantas, ou seja, as hormonas vegetais tendem a agir de forma interdependente, por meio de complexas interações antagónicas ou sinérgicas. Os resultados dessas interações são mudanças na fisiologia da planta que culminam numa resposta de defesa apropriada contra o ataque de patogénios ou, no caso de patogénios bem-sucedidos, a mudanças que beneficiam o organismo patogénico invasor. Patogénios biotróficos, ou seja, aqueles que adquirem nutrientes de células vivas, têm requisitos fisiológicos, relativamente ao hospedeiro, diferentes dos patogénios necrotróficos que, em contrapartida, usam toxinas e enzimas que degradam a parede celular, de forma a causar a morte celular e obter nutrientes do tecido morto.

Dependendo do tipo de microrganismo identificado, as plantas podem ativar vias de sinalização de defesa distintas e independentes (Garcia-Brugger, Lamotte, & Vandelle, 2006; Ton, Van Pelt, Van Loon, & Pieterse, 2002). As respostas dependentes de **ácido jasmónico (JA)** e **etileno (ET)** são iniciadas por microrganismos **necrotróficos**, enquanto a resposta dependente de **ácido salicílico (SA)** é ativada por patogénios **biotróficos** e **hemibiotróficos** (Glazebrook, 2005; Robert-Seilaniantz, Grant, & Jones, 2011; Thomma, Penninckx, Broekaert, & Cammue, 2001).

8.1. ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

O ácido salicílico (SA) é um composto fenólico com atividade fito-hormonal, mais reconhecido como uma importante molécula sinalizadora endógena na imunidade vegetal (An & Mou, 2011; Shigenaga & Argueso, 2016). Deriva do metabolito primário corismato,

por meio de duas principais vias enzimáticas: a via da fenilalanina amônia-liase (PAL – do inglês “Phenylalanine ammonia lyase”) ou a via do isocorismato (IC – do inglês “Isochorismate”), que envolve um processo de duas etapas metabolizado pelas enzimas isocorismato sintase (ICS – do inglês “Isochorismate Synthase”), que convertem o corismato em isocorismato, e as enzimas isocorismato piruvato liase (IPL – do inglês “Isochorismate Pyruvate Lyase”), que catalisam a conversão de isocorismato em ácido salicílico (Ding & Y, 2020; Shigenaga & Argueso, 2016; Strawn et al., 2007). Durante a resposta aos patógenos, as plantas empregam preferencialmente a via do isocorismato (Wildermuth, Dewdney, Wu, & Ausubel, 2001).

A importância do ácido salicílico deve-se ao seu papel fundamental na **mediação da resistência** através do gene R e das **respostas imunes basais** (PTI e ETI) (Alazem & Lin, 2015). A biossíntese e a sinalização de SA são ativadas quando o reconhecimento de efetores virais por produtos do gene R, que condicionam a interação patógeno-hospedeiro incompatível (Alazem & Lin, 2015). A ativação desta interação resulta em várias respostas, para limitar a propagação do patógeno no local da infecção, incluindo a **acumulação de espécies de oxigênio reativas (ROS)** e **proteínas relacionadas à patogênese (PR)**, **indução da resposta hipersensível (HR)**, **deposição de calose**, **desorganização de tecidos**, **mudanças no tamanho e forma dos cloroplastos**, **degradação nuclear e nucleolar e morte celular programada (PCD – do inglês “Programmed Cell Death”)** (Baebler et al., 2014; Dinesh-Kumar, Tham, & Baker, 2000). O SA também é responsável pela **ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR)** em tecidos locais e distais, uma vez que se acumula tanto no local da infecção quanto sistemicamente, o que diminui os efeitos de ataques secundários (De Silva et al., 2016; Dodds & Rathjen, 2010; Gaffney et al., 1993; Métraux et al., 1990; Ryals et al., 1996; Ward et al., 1991).

8.2. ÁCIDO JASMÓNICO (JA)

O ácido jasmónico (JA) é uma molécula de sinalização pertencente à família das oxilipinas, formada pela via octadecanoide através da oxigenação do ácido gordo linolénico pelas enzimas lipoxigenases (LOX – do inglês “Lipoxygenase”) (Vick & Zimmerman, 1984; Walters, 2011a; Weber, 2002; Zhai et al., 2017).

Esta molécula, para além de estar envolvida no desenvolvimento das plantas, tem um papel fundamental na sua defesa (Pieterse, Van Der Does, Zamioudis, Leon-Reyes, & Van Wees, 2012; Santino et al., 2013), uma vez que desencadeia a **síntese** de compostos de defesa de baixo peso molecular, como as fitoalexinas **flavonóides**, **alcalóides** e **terpenóides** (Blechert et al., 1995; Gundlach, et al., 1992; Mizukami et al. , 1993; Waternack & Parthier, 1997), **defensinas** e **proteínas PR** (Epple et al., 1995; Penninckx et al., 1998). A via JA também promove o desenvolvimento de estruturas morfológicas, como tricomas glandulares, canais de resina e nectários que produzem uma vasta variedade de compostos com funções diretas ou indiretas na defesa (Dicke & Baldwin, 2010; Hudgins, Christiansen, & Franceschi, 2004; Juge, 2006; Li et al., 2004; Peiffer, Tooker, Luthe, & Felton, 2009; Qi et al., 2011; Radhika, Kost, Mithöfer, & Boland, 2010; Traw & Bergelson, 2003; Van Poecke & Dicke, 2002; Yoshida, Sano, Wada, Takabayashi, & Okada, 2009).

Contrariamente aos microrganismos biotróficos, os necrotróficos beneficiam da morte da célula hospedeira, pelo que não são limitados pela morte celular e defesas dependentes de ácido salicílico, mas sim por um conjunto diferente de respostas de defesa ativadas pelo ácido jasmónico e sinalização de etileno (Glazebrook, 2005). Deste modo o ácido jasmónico desempenha a função fundamental de resistência basal a microrganismos necrotróficos como, por exemplo, o fungo *Botrytis cinerea* var *cinerea* Pers (1974), a bactéria *Erwinia carotovora* (Jones, 1901) Bergey et al. (1923) e o fungo *Alternaria brassicola* (Schwein.) Wiltshire (1947) (Pieterse et al., 2012; Santino et al., 2013; Thaler, Owen, & Higgins, 2004; Ton, J., & van Loon, 2006). No entanto, segundo Guerreiro et al. (2016) a sinalização mediada pelo ácido jasmónico pode estar envolvida na resistência da videira contra patogénios biotróficos, como oídio e míldio.

Junto com etileno, o ácido jasmónico tem ainda função **reguladora da resistência sistémica induzida (ISR)**, que é invocada por micróbios não patogénicos, como rizobactérias (Alazem & Lin, 2015).

8.3. ETILENO (ET)

O etileno (ET) é uma hormona vegetal gasosa considerada uma componente importante da resposta imune das plantas aos patógenos, sintetizada a partir do aminoácido metionina, após conversão por várias enzimas (Figura 16) (Argueso, Hansen, & Kieber, 2007). As etapas iniciais que precedem a ativação da biossíntese de ET envolvem o reconhecimento de moléculas elicitoras e/ou avirulentas (Broekaert et al., 2006).

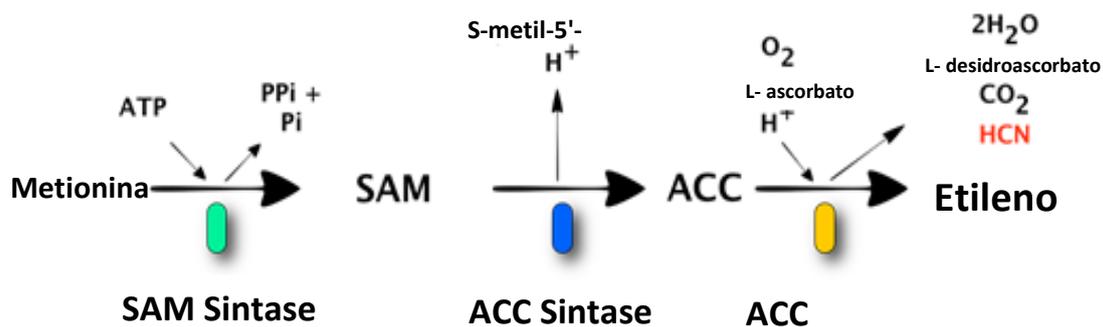


Figura 16 Esquema da síntese de etileno. Adaptado de ("Ethylene pathway selection," n.d.)

Segundo Glazebrook (2005), Penninckx et al. (1998) e Thomma et al. (2001) as vias de sinalização JA e ET operam frequentemente em sinergia, de forma a ativar a expressão de alguns genes relacionados à defesa após inoculação do patógeno. Contudo, o etileno por si só desempenha funções no **fortalecimento da parede celular** (Brisson, Tenhaken, & Lamb, 1994), na **oclusão dos vasos xilémicos** (VanderMolen, Labavitch, Strand, & DeVay, 1983), na **produção de metabolitos secundários** (Pedras, Okanga, Zaharia, & Khan, 2000), dependente do tipo de fitoalexina e da via metabólica envolvida, nomeadamente de fitoalexinas derivadas da via fenilpropanoide (Chung, Park, Rehman, & Yun, 2001; Ishigaki, Asamizu, Arisawa, & Kurosaki, 2004; Kamo, Hirai, Tsuda, Fujioka, & Ohigashi, 2000) e na **indução de proteínas PR** (Broekaert et al., 2006). Como mencionado acima, junto com o JA, tem ainda função na **resistência sistêmica induzida (ISR)** (Alazem & Lin, 2015).

9. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA INDUZIDA

Quando uma planta é atacada por um microrganismo patogênico, para além da reação localizada, pode também criar uma resposta sistêmica, estabelecendo uma capacidade defensiva melhorada nas partes distantes do local do primeiro ataque. Este fenómeno é conhecido por **resistência induzida** (Hammerschmidt & Kué, 1982).

Existem dois tipos de resistência induzida: a **resistência sistêmica adquirida (SAR)** e a **resistência sistêmica induzida (ISR)** (Gao, Dai, & Liu, 2010; Oliveira et al., 2016). O sinal envolvido na SAR e ISR é complexo, sendo a SAR induzida por patogénios, através da via de sinalização regulada por SA e a acumulação de proteínas PR, nomeadamente quitinases e glucanases (Choudhary, Prakash, & Johri, 2007), e a ISR potenciada por microrganismos benéficos, nomeadamente, rizobactérias, através das vias de sinalização reguladas por JA e ET, na maioria dos casos (Pieterse, Ton, & van Loon, 2001; Pieterse et al., 2014; Yan et al., 2002).

9.1. RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA (SAR)

A **resistência sistêmica adquirida (SAR)** é aquela que, após a infecção primária, provocada por patogénios indutores de necrose, ou seja, de morte celular, se desenvolve sistemicamente nos tecidos, tornando as partes distantes, e não infetadas, da planta mais resistentes a um amplo espectro de patogénios, induzindo igualmente reações de defesa que a irão proteger de subsequentes ataques (Figura 17) (Durrant & Dong, 2004; Hammerschmidt & Kué, 1982; Oliveira et al., 2016). Estas reações de defesa compreendem modificações na parede celular, produção de fitoalexinas e translação de proteínas

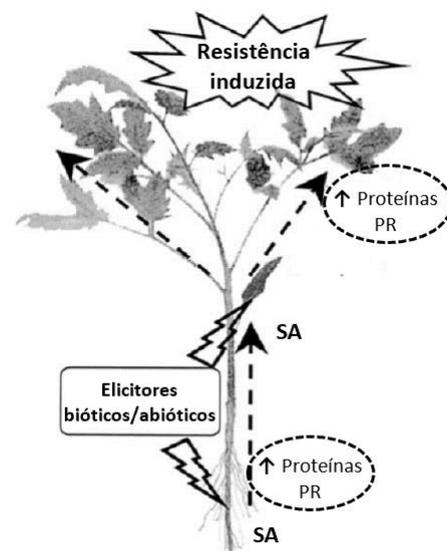


Figura 17 Resistência sistêmica adquirida (SAR) induzida pela exposição de stress biótico ou abiótico dependente da fitohormona ácido salicílico (SA) e associada à acumulação de proteínas PR. Adaptado de (Vallad & Goodman, 2004)

PR, através do aumento da expressão genética (Oliveira et al., 2016). Foi demonstrada em muitas interações planta-patogénio e é tipicamente caracterizada pela restrição do

crescimento deste último e supressão do desenvolvimento dos sintomas da doença, em comparação com plantas não induzidas, infetadas pelo mesmo patógeno (Hammerschmidt, 1999), atuando de forma inespecífica (Agrios, 2004).

A resistência sistêmica adquirida é codificada pelos genes SAR e induzida por microrganismos patogênicos ou ativadores químicos (Agrios, 2004; Mandal, 2010; Mishina & Zeier, 2006) e mediada pelo ácido salicílico (SA) e ROS (Gao et al., 2010; Guzman & Heil, 2014; Petriacq, Stassen, & Ton, 2016). Está ainda associada à síntese de proteínas PR, que maioritariamente apresentam atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência (Oliveira et al., 2016).

Embora seja eficaz contra uma ampla gama de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e oomicetas (Kuc, 1982), parece predominantemente eficaz contra patógenos com um estilo de vida biotrófico ou hemibiotrófico (Ton et al., 2002), como por exemplo os fungos *Blumeria graminis* (DC.) Speer e *Monilophthora roleri* (Cif.) H.C.Evans, Stalpers, Samson & Benny, respetivamente.

9.2. RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA (ISR)

A **resistência sistêmica induzida (ISR)** é um tipo de resistência potenciada por rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (PGPR – do inglês “Plant growth-promoting rhizobacteria”) - microrganismos benéficos que não causam danos visíveis ao sistema radicular destas e induzem a planta a uma proteção sistêmica (Pieterse et al., 1996). Esta proteção é incitada pela colonização dos microrganismos benéficos, uma vez que estes vão induzir respostas imunes locais nas raízes do hospedeiro. Embora suprimidas transitoriamente pelas PGPR, permitindo que se propaguem na epiderme da raiz ou intracelularmente, estas respostas, expressas localmente, são subseqüentemente comunicadas sistemicamente

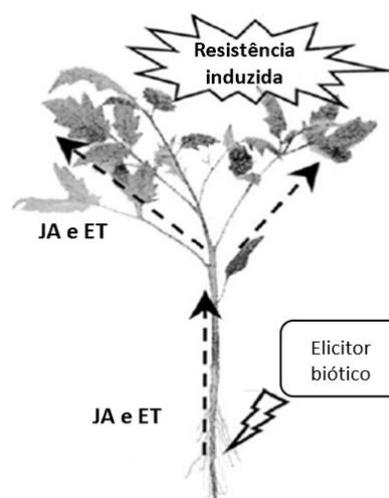


Figura 18 Resistência sistêmica induzida (ISR) incitada pela exposição das raízes a estirpes específicas de rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR), dependente das fitohormonas ácido jasmónico (JA) e etileno (ET). Adaptado de (Vallad & Goodman, 2004)

às camadas celulares internas e às partes da planta acima do solo, conferindo a resistência sistêmica induzida (Pieterse et al., 2014). Deste modo, através de mecanismos mediados pela ISR, algumas estirpes de rizobactérias são capazes de reduzir a incidência de doenças em partes das plantas acima do solo (Van Loon, Bakker, & Pieterse, 1998).

Neste mecanismo, não há acumulação de proteínas PR e a planta que sofre indução não apresenta alterações (Van Loon et al., 1998;). Ao contrário da SAR, a ISR não envolve a acumulação de SA (Pieterse et al., 1996), em vez disso, é mediada pelas vias de sinalização de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) (Figura 18) (Knoester et al., 1999; Pieterse et al., 1998; Yan et al., 2002; Farouk e Osman, 2011).

Segundo Pieterse et al. (2000) e Van Wees, Luijendijk, Smoorenburg, Van Loon e Pieterse (1999) a ISR é baseada na maior sensibilidade às hormonas JA e ET, em vez de um aumento na sua biossíntese, ou seja, está associada à potencialização da expressão de genes regulados por estas hormonas (Verhagen et al., 2004). Esta preparação de toda a planta para melhor combater o ataque de patógenos ou insetos é chamada de *priming* e é caracterizada por uma ativação mais rápida e/ou mais forte das defesas celulares após a invasão, resultando num maior nível de resistência (Conrath et al., 2006).

Segundo Van Loon et al. (1998), assim como a SAR, a ISR mediada por rizobactérias é eficaz contra um amplo espectro de patógenos, incluindo oomicetas, fungos, bactérias e vírus. Contudo, enquanto a SAR é predominantemente operativa contra patógenos biotróficos, a ISR funciona também contra patógenos necrotróficos, como por exemplo os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not., que são suscetíveis a respostas dependentes de JA e ET (Guzman & Heil, 2014; Petriacq et al., 2016; Ton et al., 2002).

CONCLUSÃO

As plantas estão constantemente expostas ao *stress* biótico, que provoca alterações no metabolismo vegetal envolvendo danos fisiológicos que levam à redução de sua produtividade (Boyd et al., 2013). Com o crescente aumento da população humana, o modo como produzimos os alimentos deve ser rentabilizado e melhorado de forma a ser mais sustentável. Este desafio é dificultado pelas mudanças nas condições climáticas e ambientais que, para além de limitarem os cultivos em determinadas zonas do globo, resultam na perda de fontes de resistência anteriormente eficazes e no aparecimento de novas doenças (Boyd et al., 2013).

Conhecer as interações planta-patogénio, os mecanismos de defesa das plantas associados, bem como os mecanismos de resistência, é fundamental para auxiliar no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, evitando perdas importantes de produtividade e económicas (Gimenez, Salinas, & Manzano-Agugliaro, 2018), quer através de estratégias de melhoramento das plantas (Qaim, 2020), quer através de aplicação de substâncias sintetizadas que mimetizem ou induzam as defesas/resistência das plantas (Agrios, 2004).

Este conhecimento já tem vindo a ser explorado não só através da seleção de variedades/híbridos mais tolerantes a doenças, como por exemplo, a variedade de batata Hermes que, por ter a cutícula das folhas mais espessa, dificulta a entrada de patogénios como o pseudofungo *Phytophthora infestans*, ou o híbrido de milho P1574, mais tolerante ao fungo *Harpophora maydis* (Samra, Sabet and Hingorani) Gams, como também através da aplicação de elementos químicos como o cobre, que para além de mediar a atividade anti-microbiana, promove a cicatrização de feridas através da ativação das defesas da planta (Liu et al., 2015) e o cálcio, que ajuda no reforço da parede celular das células das folhas e frutos, dificultando a entrada de fungos como *Venturia oleaginea* (Castagne) Rossman & Crous (sin. *Spilocaea oleaginea* (Castagne) S. Hughes e *Fusicladium oleagineum* (Castagne) Ritschel & U. Braun), causador da doença conhecida como olho-de-pavão em oliveiras e também dos fungos do género *Colletotrichum* spp., causadores da antracnose da oliveira (Caeiro et al., 2018).

Adicionalmente, a falta de alternativas químicas para o combate das doenças e pragas, levou à procura de novas alternativas inseridas numa economia circular, marcada pela reutilização contínua de materiais e recursos, regenerando capital. São exemplos destas práticas a rotação batata → (*Raphanus raphanistrum* subsp. *raphanistrum* → *Avena strigosa*) → batata, uma vez que a consociação não só limita o desenvolvimento de nemátodes e tem ação anti-fúngica, através da libertação de metabolitos secundários pelas raízes no solo, como melhora a estrutura do mesmo, uma vez que os *Raphanus raphanistrum* têm raiz pivotante explorando mais camadas de solo e descompactando-o, e é utilizada como adubação verde, através da sua incorporação no solo; e a gestão da entrelinha em culturas perenes, como olival ou vinha, que tem enorme influência na manutenção da biodiversidade, ajudando na preservação da micro-fauna auxiliar, e sendo igualmente utilizada como adubação verde.

Resultado da saída de inúmeras substâncias ativas do mercado, pelo seu efeito toxicológico nefasto para a fauna e flora, as empresas têm, cada vez mais, se esforçado para criarem produtos ecologicamente mais interessantes, mais técnicos e mais eficazes, aliando o conhecimento dos mecanismos de defesa das plantas. Por exemplo os fungicidas Aliette Flash (Bayer), à base de fosetil de alumínio, e Bion 500 (Syngenta), à base de acibenzolar-S-metílico, induzem a imunidade inata das plantas e a nova molécula química fungicida Zorvec Active (Corteva) aumenta a tolerância a doenças.

No que diz respeito aos vírus, embora estes sejam capazes de causar doenças devastadoras, e de não existirem tratamentos disponíveis, possuem a grande vantagem de poderem ser manipulados, devido à sua simplicidade, com o objetivo de se tonarem benéficos e poderem, assim, ser utilizados para diferentes fins em inúmeras áreas, sendo um deles como vetores de genes ou porções de genes utilizados para induzir o mecanismo de silenciamento nas plantas a proteger. Na agricultura tem-se recorrido a estes agentes para introduzir características desejáveis nas plantas, como por exemplo criar resistência a *stresses* bióticos ou abióticos (Zaidi & Mansoor, 2017). Estudos recentes mostram que também se podem utilizar os vírus para transportar e depositar produtos fitofarmacêuticos no solo para um uso mais eficiente e racional (Chariou et al., 2019). Com esta prática de agricultura de precisão é possível introduzir no local adequado a concentração mínima necessária, melhorando assim a eficácia dos produtos

químicos, reduzindo custos e minimizando a poluição ambiental. Atualmente, e neste sentido, está a decorrer um projeto (TOMVIRPROTECT) que tem como principal objetivo desenvolver, otimizar e estabelecer, para usos futuros, um vetor viral baseado em necrovírus, que possa ser utilizado como uma ferramenta de proteção de plantas. Com uma utilidade imediata este vetor será utilizado para silenciar o vírus TSWV (do inglês “*Tomato spotted wilt virus*”), conferindo proteção às plantas contra este, sem o recurso à transformação genética (Varanda et al., 2019).

A minha visão da agricultura é que esta irá mudar, ou seja, o caminho é de facto uma produção mais sustentável, amiga do ambiente e dos seres vivos, baseada na utilização não só de meios de luta química, mas também de outros “naturais” que beneficiem as culturas, como por exemplo a rotação, que representa múltiplas vantagens, originando economia circular. Neste sentido tem havido também, por parte da comunidade científica, um grande esforço no campo do *stress* biótico com o objetivo de compreender, regular e controlar os danos causados nas plantas por agentes patogénicos, o que é fundamental para um modo de produção mais sustentável, ecológico e competitivo.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. (2004). *Plant Pathology* (5th ed.). USA: Elsevier Academic Press.
- Aist, J. R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annual Review of Phytopathology*, *14*, 145–163.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.14.090176.001045>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, *16*(5), 529–540.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, *53*(6), 412–428. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x>
- Argandona, V. H., Zuniga, G. E., & Corcuera, L. J. (1987). Distribution of gramine and hydroxamic acids in barley and wheat leaves. *Phytochemistry*, *26*, 1917–1918.
- Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007). Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, *26*, 92–105. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0013-5>
- Arneson, P. ., & Durbin, R. . (1968). The sensitivity of fungi to α -tomatine. *Phytopathology*, *58*, 536–537.
- Baebler, S., Witek, K., Petek, M., Stare, K., Tusek-Znidaric, M., & Pompe-Novak, M. (2014). Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance gene-mediated response against Potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, *65*, 1095–1109.
- Bailey, J. A., & Mansfield, J. W. (1982). *Phytoalexins*. Glasgow, U.K.: Blackie and Son.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, *431*, 356–363.
<https://doi.org/10.1042/bio03702010>
- Beattie, G. A., & Freeman, B. C. (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008->

- Bednarek, P., & Schulze-Lefert, P. (2009). Role of Plant Secondary Metabolites at the Host-Pathogen Interface. *Annual Plant Reviews - Molecular Aspects of Plant Disease Resistance*, 34, 220–260. <https://doi.org/10.1111/b.9781405175326.2009.00008.x>
- Bent, Andrew F.; Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 399–436. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427>
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T. M., Mueller, M. J., ... Zenk, M. H. (1995). The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4099–4105. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4099>
- Bloem, E., Haneklaus, S., & Schnug, E. (2005). Significance of sulphur compounds in the protection of plants against pests and diseases. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 763–784.
- Boyd, L. A., Ridout, C., O’Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>
- Brisson, L. F., Tenhaken, R., & Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6, 1703–1712.
- Broekaert, W. F., Delauré, S. L., De Bolle, M. F. C., & Cammue, B. P. A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>
- Buscaill, P., & Rivas, S. (2014). Transcriptional control of plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 35–46.
- Caeiro, L., Materatski, P., Vestia, J., Rato, A. E., Carvalho, T., Varanda, C., ... Félix, M. R. (2018). Suplementação em cálcio: uma ajuda promissora na prevenção da gafa da

azeitona. In *VIII Simpósio Nacional de Olivicultura. 7 a 9 de junho, Santarém, Portugal*.

Camagna, M., & Takemoto, D. (2018). Hypersensitive response in plants. In L. John Wiley & Sons (Ed.), *eLS*. Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020103.pub2>

Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Robbins, M. P., & Zeyen, R. J. (1998). Phenylalanine ammonia-lyase inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *52*, 223–243. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0148>

Chakraborty, S., Moeder, W., & Yoshioka, K. (2017). *Plant Immunity*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12154-5>

Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature*, *410*(37–40).

Chariou, P. L., Dogan, A. B., Welsh, A. G., Saidel, G. M., Baskaran, H., & Steinmetz, N. F. (2019). Soil mobility of synthetic and virus-based model nanopesticides. *Nature Nanotechnology*, *14*, 712–718. <https://doi.org/s41565-019-0453-7>

Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, *47*, 289–297.

Chung, I. M., Park, M. R., Rehman, S., & Yun, S. J. (2001). Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants. *Molecules and Cells*, *12*, 353–359.

Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G., & Ausubel, F. M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, *323*, 95–100.

Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... Mauch-Mani, B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interact*, *19*, 1062–1071.

- Crawford, N. M., Kahn, M. ., Leustek, T., & Long, S. R. (2000). Nitrogen and sulfur. In B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. . Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 824–849). Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Croteau, R. B. (1988). Metabolism of plant monoterpenes. *ISI Atlas of Science: Biochemistry, 1*, 182–187.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology, 66*, 487–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>
- Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1984). Phytoalexins and their elicitors—a defence against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology, 35*, 243–275.
- De Silva, N. I., Lumyong, S., Hyde, K. D., Bulgakov, T., Phillips, A. J. L., & Yan, J. Y. (2016). Defining biotrophs and hemibiotrophs. *Mycosphere, 7*, 545–559. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/5/2>
- De Vleeschauwer, D., Xu, J., & Höfte, M. (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: From rice to Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science, 5*, 611.
- DeYoung, B. J., & Innes, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology, 7*, 1243–1249. <https://doi.org/doi:10.1038/ni1410>
- Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore induced plant volatiles: beyond the ‘cry for help’.’ *Trends in Plant Science, 15*, 167–175.
- Dickison, W. C. (2000). Defense mechanisms and structural responses of plants to diseases, pests, and mechanical injury. In *Integrative Plant Anatomy* (pp. 357–381). Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-012215170-5/50011-X>
- Dinesh-Kumar, S. P., Tham, W. H., & Baker, B. J. (2000). Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proceeding of National Academy of Sciences, 97*, 14789–14794.
- Ding, P., & Y, D. (2020). Stories of salicylic acid: a plant defense hormone. *Trends in Plant Science, 1–17*.

- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, *411*, 843–847.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 539–548.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., & Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, *27*, 706–713.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, *328*, 912–916. <https://doi.org/10.1126/science.1185880>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistanc. *Annual Review of Phytopathology*, (*42*), 185–209.
- Ebrahim, S., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*.
- Epple, P., Apel, K., & Bohlmann, H. (1995). An Arabidopsis thaliana Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology*, *109*, 813–820. Retrieved from <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.813%0A%0A>
- Ethylene pathway selection. (n.d.). Retrieved from <http://2013.igem.org/Team:UNITN-Trento/Safety>
- Faulkner, C. (2016). Defense Mechanisms in Plants. *Encyclopedia of Immunobiology*, *1*, 389–396. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12001-6>
- Fraga, B. M. (1988). Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, *5*, 497–521.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, *261*, 754–756.
- Gao, F.-K., Dai, C., & Liu, X. (2010). Mechanism of fungal endophytes in plant protection

- against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 1346–1351.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., & Vandelle, E. (2006). Early signalling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant Microbe Interact*, 19, 711–724.
- Gershenson, J., & Croteau, R. (1991). Terpenoids. In G. A. Rosenthal & M. R. Berenbaum (Eds.), *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites* (2nd ed., pp. 165–219). San Diego: Academic Press.
- Gimenez, E., Salinas, M., & Manzano-Agugliaro, F. (2018). Worldwide Research on Plant Defense against Biotic Stresses as Improvement for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 10(391). <https://doi.org/10.3390/su10020391>
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
- Goodman, R. N., & Novacky, A. J. (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. S. Paulo: APS Press.
- Grant, M., & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 414–420.
- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A Survey of Antifungal Compounds from Higher Plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19–42. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85005-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85005-4)
- Grayson, D. H. (1998). Monoterpenoids. *Natural Product Reports*, 5, 497–521.
- Gross, D., Porzel, A., & Schmidt, J. (1994). Phytoalexine mit Indolstruktur aus Kohlrabi [Phytoalexins with indole structure from Kohlrabi]. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 49(5–6), 281–285.
- Grubb, C. D., & Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, 11, 89–100.
- Guerreiro, A., Figueiredo, J., Figueiredo, A., & Silva, M. S. (2016). Linking Jasmonic Acid to Grapevine Resistance against the Biotrophic Oomycete *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, 7(42). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00565>

- Guest, D. I. (2017). Phytoalexins, Natural Plant Protection. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (2^o Ed., Vol. 3, pp. 124–128). Elsevier Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00062-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00062-9)
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *PNAS*, *89*(6), 2389–2393.
- Guzman, G. G., & Heil, M. (2014). Life histories of hosts and pathogens predict patterns in tropical fungal plant diseases. *New Phytologist*, *201*, 1106–1120.
- Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 303–333.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, *37*, 285–306.
- Hammerschmidt, R., & Kué, J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology*, *20*, 61–71.
- Harborne, J. B. (1979). Flavonoid pigments. In *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites* (pp. 619–655). New York: Academic Press.
- Harborne, J. B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry* (4th ed.). London: Elsevier Academic Press.
- Heath, M. C. (1981). A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology*, *71*, 1121–1123.
- Hudgins, J. W., Christiansen, E., & Franceschi, V. R. (2004). Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiology*, *24*, 251–264.
- Ingham, J. L. (1972). Phytoalexins and other natural products as factors in plant disease resistance. *The Botanical Review*, *38*, 343–424.
- Ingham, J. L. (1973). The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. *Phytopathologische Zeitschrift*, *78*, 314–335.
- Ishigaki, E., Asamizu, T., Arisawa, M., & Kurosaki, F. (2004). Cloning and expression of

- calmodulin genes regulating phytoalexin production in carrot cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*, 1308–1311.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*.
<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Juge, N. (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*, *11*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.05.006>
- Kaloshian, I. (2004). Gene-for-gene disease resistance: Bridging insect pest and pathogen defense. *Journal of Chemical Ecology*, *30*, 2419–2438.
- Kamo, T., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D., & Ohigashi, H. (2000). Changes in the content and biosynthesis of phytoalexins in banana fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *64*, 2089–2098.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., & Friting, B. (1987). Biological function of “pathogenesis-related” proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J*, *6*, 3209–3212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02637.x>
- Knoester, M., Pieterse, C. M. J., Bol, J. F., & Van Loon, L. C. (1999). Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant Microbe Interact*, *12*, 720–727.
- Kombrinck, E., & Somssich, I. E. (1995). Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research*, *21*, 2–33.
- Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., ... Burgyán, J. (2016). Distinct Effects of p19 RNA Silencing Suppressor on Small RNA Mediated Pathways in Plants. *PLOS Pathogens*, *12*(10), 1–26.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005935>
- Kou, Y., & Wang, S. (2010). Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.010>
- Kuc, J. (1982). Induced immunity to plant disease. *Bioscience*, *32*, 854–860.

- Kumar, J., Hückelhoven, R., Beckhove, U., Nagarajan, S., & Kogel, K. H. (2001). A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins. *Phytopathology*, *91*(2), 127–133.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arabidopsis Book*, *8*, e0136. <https://doi.org/10.1199/tab.0136>
- Lee, H.-A., Lee, H.-Y., Seo, E., Lee, J., Kim, S.-B., Oh, S., ... Choi, D. (2017). Current Understandings of Plant Nonhost Resistance. *MPMI*, *30*, 5–15.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., & Friting, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceeding of National Academy of Sciences*, *84*, 6750–6754.
- Leubner-Metzger, G., & Meins, F. J. (1999). Functions and regulation of plant B-1,3-glucanases (PR-2). In S. K. . Datta & S. Muthukrishnan (Eds.), *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (pp. 77–105). Florida: CRC Press.
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A., & Davies, J. P. (2000). Pathways and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *51*, 141–165.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., ... Howe, G. A. (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, *16*, 126–143.
- Lichtenthaler, H. K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 47–65.
- Liu, H., Zhang, B., Wu, T., Ding, Y., Ding, X., & Chu, Z. (2015). Copper ion elicits defense response in *Arabidopsis thaliana* by activating salicylate- and ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant*, *8*(10), 1550–1553. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.07.008>

- Loomis, W. D., & Croteau, R. B. (1980). Biochemistry of terpenoids. In P. K. Stumpf (Ed.), *Lipids, structures and functions. The Biochemistry of Plants* (pp. 363–418). New York: Academic Press.
- Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignina and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology*, *9*(47), 8038–8047.
- Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F. (2011). Role of Secondary Metabolites in Defense Mechanisms of Plants. *Biology and Medicine*, *3*, 232–249.
- Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, *105*, 467–472.
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2004). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Plant Biology*, *7*(356–364).
- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, *15*, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., ... Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, *250*, 1004–1006.
- Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R., & Schulze-Lefert, P. (2009). Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant Journal*, *57*, 986–999.
- Micali, C. O., Neumann, U., Grunewald, D., Panstruga, R., & O'Connell, R. (2009). Biogenesis of a specialized plant-fungal interface during host cell internalization of *Golovinomyces orontii* haustoria. *Cell Microbiology*, *150*, 1638–1647.
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2006). Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, *141*, 1666–1675.
- Mizukami, H., Tabira, Y., & Ellis, B. E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid

- biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, *12*(12), 706–709. <https://doi.org/10.1007/BF00233424>
- Molnar, A., Melnyk, C., & Baulcombe, D. C. (2011). Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology*, *12*(211), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-12-219>
- Morrissey, J. P., & Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiological Molecular Biological Reviews*, *63*, 708–724.
- Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2007). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, *59*(501–520).
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Bioscience*, *38*, 433–449.
- Nejat, N., & Mantri, N. (2017). Plant Immune System: Crosstalk Between Responses to Biotic and Abiotic Stresses the Missing Link in Understanding Plant Defence. *Current Issues Molecular Biology*, *23*, 1–16. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21775/cimb.023.001>
- Neuhaus, J. M. (1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In S. K. Datta & S. Mathukrishnan (Eds.), *Pathogenesis related proteins in plants* (Boca Raton, pp. 77–105). CRC Press.
- Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiology*, *150*, 1638–1647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.109.139709>
- Niemeyer, H. M. (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry*, *27*, 3349–3358.
- Niki, T., Mitsuhara, I., Seo, S., Ohtsubo, N., & Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR)

- protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiology*, *39*, 500–507.
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, *15*, 152–158.
- Oros, G., & Kállai, Z. (2019). Phytoanticipins: The Constitutive Defense Compounds as Potential Botanical Fungicides. In S. Jogaiah & M. Abdelrahman (Eds.), *Bioactive Molecules in Plant Defense - Signaling in Growth and Stress* (pp. 179–229). Gewerbestrasse: Springer. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/978-3-030-27165-7>
- Osborn, A. E. (1996). Saponins and Plant Defence - a soap story. *Trends in Plant Science*, *1*, 4–9.
- Pedras, M. S., Khan, A. Q., & Taylor, J. L. (1997). Phytoalexins from Brassicas: Overcoming plants defenses. In *Phytochemicals for pest control* (Vol. 658, pp. 155–166). ACS Symposium Series.
- Pedras, M. S., Khan, A. Q., & Taylor, J. L. (1998). The phytoalexin camalexin is not metabolized by *Phoma lingam*, *Alternaria brassicae*, or phytopathogenic bacteria. *Plant Science*, *139*, 1–8.
- Pedras, M. S., Okanga, F. I., Zaharia, I. L., & Khan, A. Q. (2000). Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry*, *53*, 161–176.
- Pedras, M. S., & Yaya, E. E. (2015). Plant Chemical Defenses: Are all Constitutive Antimicrobial Metabolites Phytoanticipins? *Natural Product Communications*, *10*(1), 209–218.
- Pedras, M. S., Yaya, E. E., & Glawischnig, E. (2011). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Natural Product Reports*, *28*(8), 1381–1405.
- Peiffer, M., Tooker, J. F., Luthe, D. S., & Felton, G. W. (2009). Plants on early alert: glandular trichomes as sensors for insect herbivores. *New Phytologist*, *184*, 644–

- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A. J., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *10*, 2103–2113.
- Petriacq, P., Stassen, J. H. M., & Ton, J. (2016). Spore density determines infection strategy by the plant pathogenic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant Physiology, American Society of Plant Biologists*.
- Pieterse, C. M. J., Ton, J., & van Loon, L. C. (2001). Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden. *Agricultural Biotechnology*, *3*, 1–8.
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 28.1-28.33. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., ... Van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *57*(3), 123–134. Retrieved from <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0291>
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, *8*, 1225–1237.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., & Gerrits, H. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *10*, 1571–1580.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

- Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wisser, R. J., Pratt, R. C., & Nelson, R. J. (2008). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, *14*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.006> A
- Qaim, M. (2020). Role of New Plant Breeding Technologies for Food Security and Sustainable Agricultural Development. *Applied Economic Perspectives and Policy*, *42*(2), 129–150. <https://doi.org/10.1002/aepp.13044>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., ... Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *23*, 1795–1814.
- Radhika, V., Kost, C., Mithöfer, A., & Boland, W. (2010). Regulation of extrafloral nectar secretion by jasmonates in lima bean is light dependent. *PNAS*, *107*, 17228–17233.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Robinson, T. (1980). *The Organic Constituents of Higher Plants* (4th ed.). Cordus Press.
- Rodrigues, F. Á., Jurick, W. M., Datnoff, L. E., Jones, J. B., & Rollins, J. A. (2005). Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-Magnaporthe grisea interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *66*(4), 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.06.002>
- Rodriguez, M. C., Peterson, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *61*, 621–649.
- Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (1992). *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.
- Ryals, J., Neuenschwander, H. U., Willits, M. G., Molina, A., Streiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, *8*, 1809–1819.
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant*

Physiology, 136, 2443–2450.

Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., & Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1085–1098. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1441-2>

Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101, 7–12.

Schulzen-Lefert, P., & Panstruga, R. (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 641–667.

Shamrai, S. N. (2014). Plant immune system: Basal immunity. *Cytology and Genetics*, 48(4), 258–271. <https://doi.org/10.3103/S0095452714040057>

Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 56, 174–189. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.005>

Sicker, D., Frey, M., Schulz, M., & Gierl, A. (2000). Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants. *International Review of Cytology - A Survey of Cell Biology*, 198, 319–346.

Singh, D. P., & Singh, A. (2005). *Disease and insect resistance in plants*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers.

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12, 89–100.

Stakman, E. C. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research*, 4, 193–299.

Stone, J. K. (2001). *Necrotroph*. *Encyclopedia of Plant Pathology* (OC Maloy, Vol. 2). New York.

Strawn, M. A., Marr, S. K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C., & Wildermuth, M. C. (2007).

- Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *Biological Chemistry*, *282*, 5919–5933. Retrieved from <https://www.jbc.org/content/282/8/5919>
- Sutherland, M. W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *39*, 79–93.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., ... Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, *15*, 317–330.
- Thakur, A., Verma, S., Reddy, V., & Sharma, D. (2019). Hypersensitive Responses in Plants. *Agricultural Reviews*, *40*(2), 113–120. <https://doi.org/10.18805/ag.R-1858>
- Thaler, J. S., Owen, B., & Higgins, V. J. (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, *135*, 530–538.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*, *13*, 63–68.
- Thompson, J. E., Legge, R. L., & Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, *105*, 317–344.
- Ton, J., Pieterse, C. M. J., & van Loon, L. C. (2006). The relationship between basal and induced resistance in Arabidopsis. In S. Tuzun & E. Bent (Eds.), *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (pp. 197–224). SpringerNew York.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylenedependent induced resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant Microbe Interact*, *15*, 27–34.
- Traw, M. B., & Bergelson, J. (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *133*, 1367–

1375.

- Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*, 3(85).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- Vallad, G. E., & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44(6), 1920–1934.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
- Van Der Biezen, E. A., & Jones, J. D. G. (1998). Plant disease-resistance proteins and gene-for-gene concept. *Frontlines*, 23(12), 454–456.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01311-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01311-5)
- Van Loon, L. C. (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4, 111–116.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453–483.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85–97.
- Van Poecke, R. M. P., & Dicke, M. (2002). Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1793–1799.
- Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (1999). Rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 41, 537–549.
- VanderMolen, G. E., Labavitch, J. M., Strand, L. L., & DeVay, J. E. (1983). Pathogen-induced vascular gels: ethylene as a host intermediate. *Physiology Plantarum*, 59, 573–580.

- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., & Farmer, E. E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoantecipins”. *Plant Cell*, *6*, 1191–1192.
- Varanda, C. M. R., Félix, M. R. F., Materatski, P., Campos, M. D., Marques, N., Clara, M. I., & Nolasco, G. (2019). Development of a viral vector to control TSWV in tomato plants. In *IV PhD Students Meeting in Environmental and Agriculture - Book of Abstracts* (p. 21). <https://doi.org/10.22323/1.340.0930>
- Varanda, C. M. R., Materatski, P., Campos, M. D., Clara, M. I. E., Nolasco, G., & Félix, M. R. (2018). Olive mild mosaic virus coat protein and P6 are suppressors of RNA silencing, and their silencing confers resistance against OMMV. *Viruses*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/v10080416>
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant Microbe Interact*, *17*, 895–908.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiology*, *75*(2), 458–461. <https://doi.org/10.1104/pp.75.2.458>
- Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*, 177–206. Retrieved from <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Voigt, C. A. (2014, April). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00168>
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics*, *17*(8), 449–459. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02367-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02367-8)
- Volk, R. J., Kahn, R. P., & Weintraub, R. L. (1958). Silicon content of the rice plant as a factor influencing its resistance to infection by the blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*, *48*, 179–184.
- Walters, D. R. (2011a). *Plant defense - Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants* (1st ed.). Willey-Blackwell.
- Walters, D. R. (2011b). What Defenses Do Plants Use? In *Plant Defense: Warding off*

- Attack by Pathogens, Herbivores and Parasitic Plants* (1st ed., pp. 15–76).
Edinburgh, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Ward, E., Uknes, S., Williams, S., Dincher, S., Wiederhold, D., Alexander, D., ... Ryals, J. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, *3*, 1085–1094.
- Waternack, C., & Parthier, B. (1997). Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science*, *2*(8), 302–307. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S1360138597899529/1-s2.0-S1360138597899529-main.pdf?_tid=db9e1f22-2071-11e3-a310-00000aab0f01&acdnat=1379516094_37e4e6b3b899ff99b95f9cc1b8e60bdb
- Weber, H. (2002). Fatty acid derived signals in plants. *Trends in Plant Science*, *7*, 217–224.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiology Review*, *79*, 143–180.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, *414*, 562–565.
- Wink, M. (1999). *Functions of Plant Secondary Metabolites and Their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press.
- Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* grand naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*, 308–314.
- Yan, Z., Reddy, M. S., Ryu, C. M., McInroy, J. A., Wilson, M., & Kloepper, J. W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, *92*, 1329–1333.
- Yoshida, Y., Sano, R., Wada, T., Takabayashi, J., & Okada, K. (2009). Jasmonic acid control of GLABRA3 links inducible defense and trichome patterning in *Arabidopsis*.

- Development*, 136(6), 1039–1048. <https://doi.org/10.1242/dev.030585>
- Zaidi, S. S.-E. A., & Mansoor, S. (2017). Viral Vectors for Plant Genome Engineering. *Frontiers in Plant Science*, 8, 539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00539>
- Zaynab, M., Mahpara, F., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 124, 198–202. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>
- Zeyen, R. J., Ahlstrand, G. G., & Carver, T. L. W. (1993). X-ray microanalysis of frozen-hydrated, freeze-dried, and critical point dried leaf specimens: Determination of soluble and insoluble chemical elements at Erysiphe graminis epidermal cell papilla sites in barley isolines containing MI-o and ml-o alleles. *Canadian Journal of Botany*, 71, 284–296.
- Zeyen, R. J., Carver, T. L. W., & Lyngkjaer, M. F. (2002). *Epidermal cell papillae. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press.
- Zhai, Q., Yan, C., Li, L., Xie, D., & Li, C. (2017). Jasmonates. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. Beijing, China: Elsevier Academic Press. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00007-4>
- Zhu, L. (2017). RNAi: Gene Knock-down! Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=9O3uxdDD1cA>
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>