



Organizado pelo
Núcleo de Estudos em Fitopatologia
Universidade Federal de Lavras

XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas

BIOTECNOLOGIA APLICADA À FITOPATOLOGIA



EDITORES

Jorge Teodoro de Souza
Yasmim Freitas Figueiredo
Thaís Conrado Nunes Santos
Letícia Gabriela Ferreira de Almeida
Vitória Moreno Tedardi
Vanessa Carvalho Cândido
Maria Carolina de Carvalho Rocha Souza
Larissa Maia de Oliveira
Kize Alves Almeida
Victor Augusto Maia Vasconcelos
Mário Roberto Nogueira Colares
Rafael Zaia
AnnyKellen Miranda Pereira
Cláudia Maria de Oliveira Veiga
Maria Eduarda Rodrigues Andrade
Carla Maria Cavalcanti Ribeiro
Joana Caroline D'arc de Oliveira
Nevenka de Matos Moura
Guilherme Swart
Felipe Douglas Soares Leal

REVISORES

Aline Ferreira Barros
Ana Cristina Andrade Monteiro
Daniel Henrique Ribeiro
Helon Santos Neto
Júlio Carlos Pereira da Silva
Mário Roberto Nogueira Colares
Sarah da Silva Costa
Silvino Intra Moreira

COORDENAÇÃO NEFIT / GESTÃO 2018



Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros (Coordenador Docente)

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE (2004). Mestre em Agronomia/Fitopatologia pela Universidade de Lavras - UFLA (2005). Doutor em Agronomia/Fitopatologia pela mesma Instituição (2009). Atualmente é professor Adjunto do Departamento de Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Yasmim Freitas Figueiredo (Coordenadora Geral)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal do Espírito Santo - UFES (2015). Mestre em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade de Lavras - UFLA (2017). Doutoranda em Agronomia/Fitopatologia na mesma instituição

Thaís Conrado Nunes Santos (Vice-Coordenadora Geral)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2017). Mestranda em Agronomia/Fitopatologia na mesma instituição.

Leticia Gabriela Ferreira de Almeida (Coordenadora de Finanças)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Vitória Moreno Tedardi (Vice-Coordenadora de Finanças)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Estadual de Londrina - UEL (2014). Mestranda em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Vanessa Carvalho Cândido (Coordenadora Administrativa)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2017). Mestranda em Agronomia/Fitopatologia na mesma instituição.

Maria Carolina de Carvalho Rocha Souza (Vice-Coordenadora Administrativa)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Larissa Maia de Oliveira (Coordenadora Técnico-Científica)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2015). Mestre em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2017). Doutoranda em Agronomia/Fitopatologia na mesma instituição.

Kize Alves Almeida (Vice-Coordenadora Técnico-Científica)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2014). Mestre em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2016). Doutoranda em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Victor Augusto Maia Vasconcelos (Coordenador Sócio-Cultural)

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2017). Mestrando em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Mário Roberto Nogueira Colares (Vice-Coordenador Sócio-Cultural)

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT (2016). Mestre em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2018). Doutorando em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Rafael Zaia (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Anny Kellen Miranda Pereira (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Cláudia Maria de Oliveira Veiga (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Maria Eduarda Rodrigues Andrade (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Carla Maria Cavalcanti Ribeiro (Trainee)

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE (2007). Mestre em Agronomia pela Universidade Federal de Roraima - UFRR (2016). Doutoranda em Agronomia/ Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Joana Caroline D’arc de Oliveira (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Nevenka de Matos Moura (Trainee)

Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras - UFLA (2018). Mestranda em Agronomia/ Fitopatologia na mesma instituição.

Guilherme Swart (Trainee)

Estudante de graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Felipe Douglas Soares Leal (Trainee)

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM (2018). Mestrando em Agronomia/ Fitopatologia pela Universidade Federal de Lavras - UFLA.

© Núcleo de Estudos em Fitopatologia

Capa: Diogo Rodarte Gonçalves

Projeto Gráfico / Diagramação: Ana Carolina Naves Campelo

**Ficha catalográfica preparada pela Coordenadoria de Processos
Técnicos da Biblioteca Universitária da UFLA**

Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas (18. : 2018 : Lavras, MG)
[Anais do] XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas :
biotecnologia aplicada à fitopatologia / organizado pelo Núcleo de
Estudos em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras ; editores,
Jorge Teodoro de Souza ... [et al.]. – Lavras : Ed. UFLA, 2018.
201 p. : il.

Bibliografias.

ISBN 978-85-54882-01-3

1. Biocontrole. 2. Biodiversidade. 3. Bioinformática. 4.
Microbioma. I. Souza, Jorge Teodoro de. II. Universidade Federal de
Lavras, Núcleo de Estudos em Fitopatologia. III. Título.

CDD - 632

Ficha elaborada por Márcio Barbosa de Assis (CRB 6/1930)

AGRADECIMENTOS

Aos coordenadores do Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT) por toda disposição de tempo e ideias para a organização do XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas “Biotecnologia aplicada à Fitopatologia”.

À Thaisa Conrado, vice-coordenadora geral, por ter sido meu braço direito, mesmo tendo caído de paraquedas nessa missão comigo.

Aos membros e trainees do NEFIT, por toda a dedicação e por estarem sempre dispostos a colaborar para obtermos o sucesso do evento.

Aos palestrantes pela confiança no núcleo, disponibilidade, empenho e dedicação na elaboração das palestras e dos capítulos presentes neste livro.

Aos revisores pela agilidade, ajuda, empenho e contribuição nos capítulos e anais do evento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), a qual temos o orgulho de fazer parte e o privilégio de fazermos parte dessa universidade maravilhosa.

Ao Departamento de Fitopatologia (DFP), por toda infraestrutura e financiamento concedido ao NEFIT e aos professores e funcionários do DFP, em especial, ao professor Eduardo Alves, chefe do Departamento e a secretária Ariane pelo apoio ao NEFIT.

Ao professor Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros por seu amor à Fitopatologia, por ser o coordenador docente do núcleo, ter prazer em contribuir no desenvolvimento do NEFIT e acreditar no potencial do NEFIT.

Ao professor Jorge Teodoro de Souza por coordenar a realização do simpósio e confecção do livro, por contribuir com suas ideias e por almejar sempre o novo.

Às empresas Biovalens e Farroupilha pelo apoio à publicação desta obra.

Ao CNPq pelo apoio científico ao evento.

Aos colegas que contribuíram de alguma forma ao núcleo: Gustavo Gatti, Neilton Araújo, Renê Medeiros, Julio Silva e Thácio Bruno.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com a realização do evento e publicação deste livro, meu muito obrigada!!!

Yasmim Freitas Figueiredo
Coordenadora Geral | Gestão 2018



PREFÁCIO

O Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas é realizado anualmente pelo Núcleo de Estudos em Fitopatologia (NEFIT), que é vinculado ao Departamento de Fitopatologia. O NEFIT é constituído por discentes do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia e de outros programas da UFLA, mas nos últimos anos o número de integrantes de cursos de graduação tem aumentado. A participação dos discentes no NEFIT proporciona treinamento em organização de eventos, como cursos específicos de formação, cursos de extensão e no debate de temas relativos à fitopatologia. O Programa de Pós-Graduação tem sempre contribuído para a consolidação e tem apoiado as atividades do grupo desde o seu surgimento no ano 2000.

Nesta edição de número XVIII, o tema central é “Aplicações da Biotecnologia na Fitopatologia”. A biotecnologia tem transformado todos os aspectos da fitopatologia e contribuído para o avanço no entendimento das interações entre plantas e patógenos, no melhoramento de plantas visando resistência, no diagnóstico de patógenos e no controle de doenças. Portanto, o XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas será bastante oportuno para debatermos os avanços nesta era da biotecnologia em que estamos vivendo.

Na edição XVIII, contaremos com palestrantes nacionais e internacionais, que apresentarão resultados de pesquisas utilizando técnicas biotecnológicas na fitopatologia. Os temas a serem tratados incluem interações planta-patógeno, melhoramento para resistência a doenças por transgenia, resistência a fungicidas, microbioma e a saúde das plantas e produtos biotecnológicos da biodiversidade brasileira.

Apesar da redução do financiamento público à pesquisa de modo geral, nosso Simpósio está contando com recursos do CNPq e de empresas do ramo biotecnológico com aplicações diretas na agricultura e meio ambiente.

Este livro é composto por capítulos com o conteúdo das palestras do Simpósio e será disponibilizado pela primeira vez em um pendrive para todos os inscritos no evento. Para os que não estão inscritos, mas tem interesse no conteúdo, o livro poderá ser baixado sem custo do site do NEFIT: <http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefit/>. Esperamos que o mesmo seja útil para o público interessado na área e que sirva como atualização no uso de ferramentas da biotecnologia na Fitopatologia.

Jorge Teodoro de Souza

Coordenador Geral do XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas
“Biotecnologia Aplicada à Fitopatologia” 2018, Professor Adjunto - DFP/UFLA,
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia - UFLA

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Aplicações da biotecnologia na fitopatologia: o futuro é agora	012
--	-----

Kize Alves Almeida

Rafaela Araújo Guimarães

Thaís Conrado Nunes Santos

Vitória Moreno Tedardi

Yasmim Freitas Figueiredo

Jorge Teodoro de Souza

1. Introdução	012
2. Diagnóstico de doenças de plantas na era biotecnológica	015
3. Interações microrganismo-planta	017
3.1. Padrões recorrentes nas interações microrganismo-planta	018
3.2. Ferramentas da biotecnologia utilizadas nos estudos das interações planta-patógeno	019
4. Aplicações da biotecnologia no melhoramento genético de plantas	020
4.1. Técnicas e aplicações no melhoramento genético	021
5. Controle de doenças de plantas na agricultura moderna	023
5.1. Controle biológico de doenças de plantas	024
5.2. Engenharia de microbiomas para o controle de doenças	025
5.3. Controle alternativo e o uso de moléculas de baixo impacto	027
6. Perspectivas futuras	028
Referências	030

CAPÍTULO 2

Ferrugem-asiática da soja: estudo sobre sensibilidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> a fungicidas	036
--	-----

Louise Larissa May De Mio

Ana Cláudia Klosowski

Mônica Anghinoni Müller

1. Introdução	036
2. A cultura da soja e a importância da ferrugem-asiática da soja	036
3. Sensibilidade alterada ao longo dos anos em relação à eficiência de fungicidas	044
4. Estudos de alterações na sensibilidade de <i>P. pachyrhizi</i> aos IDMS	047
5. Estudos de alterações na sensibilidade de <i>P. pachyrhizi</i> aos IQeS	050

6. Estudos de alterações na sensibilidade de <i>P. pachyrhizi</i> aos ISDHs	054
7. Adaptabilidade associada à resistência a fungicidas	056
8. Estratégias de manejo para reduzir alterações em sensibilidade e prolongar eficiência dos fungicidas	061
Referências	062

CAPÍTULO 3

Resistência de citros à patógenos: genomas e efetores	069
--	------------

Eduardo Henrique Goulin

Carolina Munari Rodrigues

Mariana Massoco Tarallo

Paulo José Camargo dos Santos

Marcos Antonio Machado

1. Introdução	069
2. Diversidade dos citros e suas aplicações no melhoramento genético	070
3. Patógenos de citros e seus efetores	072
4. Transcriptomas da interação citros/patógenos	075
5. Conclusões	080
Referências	080

CAPÍTULO 4

RNAi based transgenic common bean resistant to *Bean golden*

<i>mosaic virus</i>	090
----------------------------------	------------

Josias Correa de Farias

Francisco José Lima Aragão

1. Introduction	091
2. Common bean and its importance for the Brazilian population	091
3. Genetic Engineering of resistance to BGMV	094
4. Antisense of ORFs AC1, AC2, AC3 and BC1	095
5. Transdominant lethal construct	097
6. The RNAi technology	099
References	103

CAPÍTULO 5

Os impactos da lei de biodiversidade na pesquisa – O cadastro no

SISGEN – Patrimônio Genético	107
---	------------

Ricardo Gomes Figueiroa
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Raissa De Luca Guimarães

1. Introdução	109
2. Da obrigatoriedade de cadastro das atividades de acesso ao patrimônio genético junto ao SISGEN	110
3. Das formas de mitigar os impactos da lei 13.123/2015, das câmaras setoriais e da legislação do CGEN	113
Referências	115

CAPÍTULO 6

Phytochemistry, organic synthesis and computational chemistry: development of new products to control phytopathogens	116
---	------------

Denilson Ferreira de Oliveira

Introdução	116
References	127

CAPÍTULO 7

Filogenia molecular para o reconhecimento de espécies de <i>Fusarium</i>	130
---	------------

Sarah da Silva Costa
Gláucia Mara Moreira

1. Introdução	130
2. Conceitos de espécies utilizados para a identificação de fungos	131
3. Reconhecimento de espécies filogenéticas com base em concordância genealógica de genes	132
4. Estudos de caso	134
4.1 <i>Fusarium solani</i> species complex (FSSC)	134
4.1.1 Diversidade de espécies do FSSC envolvidos na etiologia da podridão vermelha da raiz da soja	135
4.2 <i>Fusarium oxysporum</i> species complex (FOSC)	136
4.2.1 Diversidade de espécies do FOSC envolvidos na etiologia da doença do mal do panamá	136
4.3 <i>Fusarium fujikuroi</i> species complex (FFSC)	137
5. Conclusão	138
Referências	138

CAPÍTULO 8

Avanços na Biotecnologia aplicada ao controle de fitonematoides	143
--	------------

Julio Carlos Pereira da Silva

Yasmim Freitas Figueiredo

1. Introdução	143
2. Mecanismos de defesa ativados contra fitonematoides	145
3. Busca de resistência natural em populações de plantas	147
4. Abordagens transgênicas aplicadas no controle de fitonematoides	148
4.1 Inibidores de proteinase	149
4.2 RNA interferente no silenciamento gênico	149
5. Bioprospecção de novos compostos nematicidas	150
6. Agentes de controle biológico e o microbioma antagonista a fitonematoides	152
Referências	159

RESUMOS	165
----------------------	------------

Aplicações da biotecnologia na fitopatologia: o futuro é agora

Kize Alves Almeida
Rafaela Araújo Guimarães
Thaís Conrado Nunes Santos
Vitória Moreno Tedardi
Yasmim Freitas Figueiredo
Jorge Teodoro de Souza

1. Introdução

A palavra biotecnologia é composta por três termos de origem grega, sendo eles “*bio*” que significa vida, “*ternos*” expressa técnica e “*logos*” remete a conhecimento. Assim, biotecnologia é definida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia como um conjunto de técnicas de diferentes áreas da ciência, como química, biologia e engenharia (Figura 1). A biotecnologia envolve a manipulação de sistemas biológicos, microorganismos e derivados, como biomoléculas, organelas e células para criar, alterar e melhorar métodos e ferramentas que serão utilizadas para progresso na saúde humana e animal, na agricultura e na geração de energia (Salles-Filho et al., 2001). A biotecnologia pode ser aplicada à fitopatologia em diversos processos de interesse dessa ciência (Figura 1).

A biotecnologia começou há milhares de anos atrás com a produção de bebidas através da fermentação. Atualmente diversos produtos utilizam substâncias essenciais na fermentação, como queijo, vinhos, cerveja e pão, que são obtidos através de bactérias, leveduras, fungos e algas. Na década de 30 os estudos eram voltados para saúde animal e humana, com ênfase na produção de antibióticos. Apenas na década de 70 que as plantas entraram em foco na biotecnologia, com os primeiros estudos relacionados a sequenciamento e recombinação de DNA (Carrer et al., 2010).

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras MG, jgeteodoro@gmail.com

O crescimento populacional acarreta um aumento da preocupação e a necessidade de produzir alimentos e energia de maneira sustentável, sem esgotar os recursos naturais. Assim, a biotecnologia se mostra como uma grande impulsora do desenvolvimento agrícola. A partir dos transgênicos é possível obter variedades com características desejadas de diferentes plantas bem como de microorganismos, o que resulta em alimentos mais nutritivos, colheitas mais produtivas e sustentáveis, uma diminuição dos custos de produção devido a uma redução na dependência de produtos químicos, bem como uma maior facilidade na diagnose de doenças e pragas (Silveira et al., 2005). Além de todas essas vantagens no manejo da agricultura, com a biotecnologia é possível desenvolver novas fontes de bioenergia, como biocombustíveis através de algas geneticamente modificadas (Carrer et al., 2010).

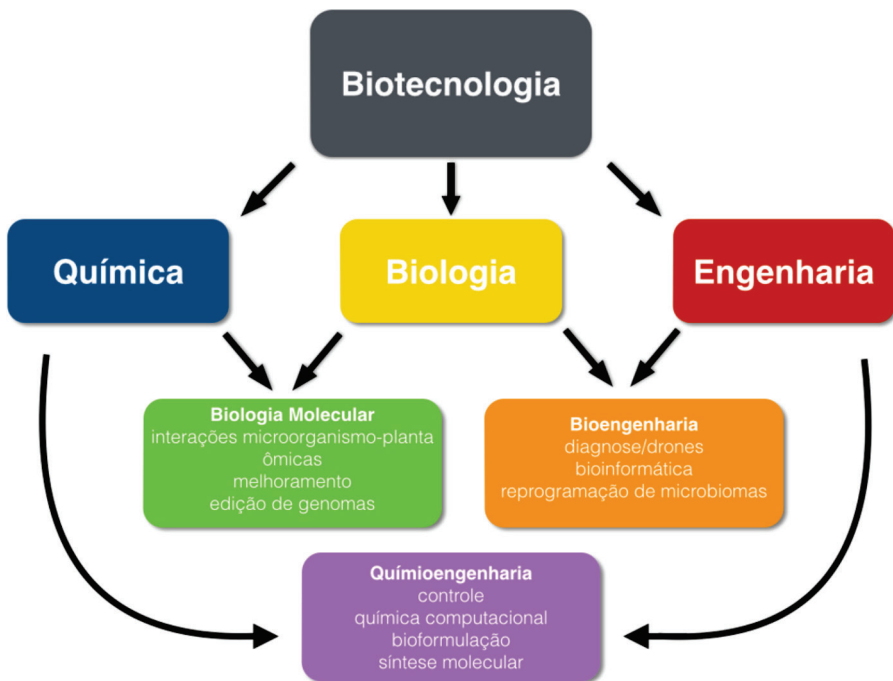


FIGURA 1. Conceito de biotecnologia e algumas aplicações na fitopatologia. A biotecnologia é o resultado da fusão entre a biologia, química e engenharia. A combinação destas resultou em ciências que são utilizadas na fitopatologia e utilizadas no estudo de diversas áreas, como as interações entre microorganismos e plantas, melhoramento visando resistência e o controle de doenças.

De acordo com o IBGE, o mercado brasileiro de biotecnologia, corresponde à cerca de 2,8% do produto interno bruto (PIB) e 23% do PIB de 2017 é decorrente da agricultura brasileira. No último ano o setor agrícola foi responsável por 70% (233,1 milhões de reais) de todo o crescimento anual do PIB, que foi de 1% (333 milhões de reais). A produção de grãos é uma grande responsável por todo esse crescimento juntamente com a biotecnologia, uma vez que quase 78% das áreas cultivadas no Brasil são culturas transgênicas (Embrapa, 2018), sendo as principais: soja, milho, algodão. Os transgênicos são utilizados não só no Brasil mas em diversos países espalhados pelo mundo, entretanto, 90% das áreas plantadas com plantas geneticamente modificadas estão concentradas em apenas 5 países (ISAAA, 2017). Estima-se que 30% a 40% da produção de todas as culturas no mundo pode ser reduzida devido a pragas, doenças e plantas daninhas. Cerca de 15% dessas perdas são causadas apenas por doenças de plantas, o que pode acarretar em uma perda de até 200 bilhões de dólares em todo o mundo (Cavalcanti e Garrido, 2015). Assim, a biotecnologia se alia a fitopatologia com o propósito de criar processos e produtos capazes de diminuir a incidência de doenças bem como de controlá-las, reduzindo assim, as perdas ocasionadas por doenças.

Diversas técnicas da biotecnologia foram desenvolvidas para o controle e a diagnose de doenças. Os dados de sequenciamento de DNA, principalmente por métodos conhecidos como de próxima geração (NGS), tem se tornado cada vez mais acessíveis em bancos de dados genéticos. A genômica tem como objetivo entender os genes, sua organização dentro do genoma e suas funções. Outras técnicas, coletivamente conhecidas como ômicas, tem contribuído para o entendimento das relações planta-patógeno e desses com outros microorganismos do sistema. A transgenia, por meio da edição e da transferência, tanto de genes de outras plantas como de outros organismos, possibilitou a obtenção de plantas resistentes a patógenos (Carrer et al., 2010). Com isso há uma redução no uso de produtos químicos, tratamentos culturais, diminuindo os custos de produção.

Marcadores moleculares ligados a genes de resistência são utilizados para construção de mapas genéticos e na seleção de genótipos resistentes (Alzate-Marin et al., 2005; Carrer et al., 2010). Outra aplicação dos marcadores é na identificação de patógenos, estudos de variabilidade genética e na caracterização de microorganismos com atividade anti-microbiana, possibilitando a criação de produtos biológicos capazes de controlar doenças (Berbara e Briosso, 2011).

Para identificação e detecção dos patógenos de plantas, tem sido desenvolvidas novas técnicas e o aprimoramento de outras já existentes para maior precisão na diagnose de doenças de plantas. Por meio da utilização de sondas moleculares, primers em testes moleculares e anticorpos em testes sorológicos, é possível detectar patógenos em materiais vegetais e também diferenciar cultivares resistentes das suscetíveis a fitopatógenos (Briosso, 2013). Com o avanço da tecnologia, a utilização de programas e aplicativos vem se tornando comum no campo, permitindo uma maior precisão, praticidade e melhor armazenamento de dados, o que facilita a diagnose em

tempo real no campo. Além de facilitar o monitoramento, permite que as doenças sejam identificadas precocemente, possibilitando um controle mais exato e o uso racional de produtos químicos.

As aplicações da biotecnologia na fitopatologia tem contribuído para o desenvolvimento de processos e produtos contra doenças de plantas, diminuindo os prejuízos e tornando a agricultura mais sustentável. Neste capítulo vamos tratar de algumas aplicações da biotecnologia na fitopatologia, incluindo principalmente o estudo das interações microrganismo-planta, diagnose, melhoramento visando a resistência e o controle de doenças de plantas.

2. Diagnose de doenças de plantas na era biotecnológica

Os problemas fitossanitários das plantas geralmente surgem a partir de estresses bióticos causados por patógenos, estresses abióticos advindos de problemas ambientais e, muitas vezes, surgem da combinação desses dois fatores. Constantemente os sintomas visuais causados por esses estresses são semelhantes e podem ser confundidos no diagnóstico. Ambos os estresses bióticos e abióticos causam danos às plantas e perdas significativas na produção (Abrahams e Rensburg, 2017). Para administrar de maneira eficaz as consequências de determinada doença é imprescindível realizar um diagnóstico preciso que será essencial na adoção de estratégias de manejo. A incapacidade de lidar adequadamente com uma doença pode ser atribuída ao fracasso em diagnosticar corretamente o problema e resultar em epidemias, desperdício de produtos, diminuição na produtividade e prejuízos econômicos (Abrahams e Rensburg, 2017).

A tecnologia e a informática, que realizaram uma extraordinária revolução tecnológica nas duas últimas décadas, estão cada vez mais presentes em nossas vidas e isso não é diferente para os agricultores. Computadores com acesso em tempo real aos principais sites, celulares que possibilitam a conexão com todo o mundo, informações meteorológicas antecipadas, analisadores de solo e GPS para identificar as características de cada trecho da propriedade são algumas das ferramentas que possibilitaram aos produtores rurais brasileiros a alta competitividade internacional. Até pouco tempo os diagnósticos dessas doenças e pragas eram realizados apenas em laboratórios especializados, muitas vezes, bem distantes das fazendas. Entre o envio das amostras pelo agricultor, o recebimento pelos técnicos responsáveis e a posterior entrega dos resultados, havia um intervalo que na maioria das vezes era bastante longo e em alguns casos comprometia a sanidade dos cultivos.

Existem diferentes métodos de se realizar esses diagnósticos para identificação de patógenos, como, por exemplo, a detecção rápida de proteínas ou DNA específicos, a utilização de equipamentos de laboratório mediante treinamento pessoal, além de avaliação no local com auxílio de equipamentos especiais (Tabela 1). A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) do DNA é um método para a detecção específica de DNA genômico usando um conjunto de seis primers oligonucleotídicos com

oito locais de ligação que se hibridizam especificamente a diferentes regiões de um gene alvo. A DNA polimerase de *Geobacillus stearothermophilus* é utilizada para a amplificação isotérmica do DNA. O método tem sido aplicado em vários ensaios para o diagnóstico de bactérias, vírus e fungos de amostras ambientais, por um aparelho portátil que pode ser utilizado em estufas, campo ou laboratório. Além disso, permite que o RNA de patógenos ou pragas possa ser detectado (Notomi et al., 2000).

De acordo com Santos e Barbedo (2017) a identificação automática de doenças em plantas a partir de imagens obtidas em condições reais de campo, com o uso de processamento de imagens

TABELA 1. Principais características dos métodos de identificação de doenças de plantas

Métodos	Patógenos detectados	Local de uso	Observações	Referências
LAMP	Bactérias, vírus e fungos	Campo, estufas e laboratórios	Aparelho portátil; altamente específico; necessita de primers específicos; detecta DNA e RNA.	Notomi et al., 2000
Imagens digitais	Principais patógenos das culturas	Campo	Softwares ou aparelhos portáteis; comparação com banco de dados; necessita celular ou notebook.	Santos e Barbedo, 2017
VANTs (Drones)	Estresses bióticos e abióticos	Campo	Alto custo; necessita de pessoas treinadas; sensores capturam comprimento de onda.	Jensen, 2009
Alerta doenças	Bactérias, vírus, fungos e nematóides	Campo	Melhor eficiência e redução das aplicações; avaliação das combinações do ambiente, patógeno e hospedeiro.	Angelotti et al., 2012
Kits de identificação	Bactérias, vírus e fungos	Campo	Fácil, rápido e barato; só existem para alguns patógenos.	Khater et al., 2017; Ray et al., 2017

Recentemente, os veículos aéreos não tripulados (VANT), também conhecidos como drones, vêm assumindo proeminência no mercado da geoinformação, no desenvolvimento de técnicas de detecção de estresses em cultivos e na necessidade

de estudos que forneçam bases teórica e metodológica, a quais incluem a modelagem matemática e estatística (Sousa, 2017; Furtado e Passos, 2015). Os sensores presentes nos drones são capazes de capturar a intensidade com que determinados comprimentos de onda são refletidos pelo dossel das plantas, o que podemos chamar de resposta espectral. Plantas saudáveis absorvem mais a luz visível do que plantas com algum tipo de estresse seja ele biótico ou abiótico, em que nesta condição refletem mais a luz na faixa do infravermelho. Plantas estressadas são menos eficientes para fotossíntese, refletindo mais a luz visível (Jensen, 2009).

Outra ferramenta disponível para algumas culturas é o sistema de alerta de doenças. Esse sistema reúne e processa dados meteorológicos obtidos de estações automáticas e de prognósticos de tempo, de modelos de crescimento e desenvolvimento da cultura, além de modelos epidemiológicos das doenças. Em resumo, agrega informações sobre a interação patógeno-hospedeiro-ambiente, simula o risco de ocorrer doenças e deixa a informação disponível para os produtores. Com acesso à internet e uso do computador, o produtor vai estar à frente da plataforma digital e consultar previsões do risco de ocorrência dos patógenos responsáveis por causar as doenças (Ribeiro, 2014).

O diagnóstico precoce de doenças de plantas é fundamental para aplicar estratégias de manejo no início da doença, quebrar o ciclo do patógeno e evitar desperdícios na produção. A biotecnologia na diagnose de doenças facilita a ocorrência desse processo e faz com que ferramentas de identificação de doenças sejam mais acessíveis aos produtores com resultados mais rápidos.

3. Interações microrganismo-planta

As plantas são colonizadas por comunidades microbianas complexas que desempenham papéis diferentes em relação ao seu crescimento e a sua saúde. Alguns promovem o crescimento das plantas e/ou aumentam a aquisição de nutrientes, tolerância a estresses abióticos e resistência a patógenos, já outros podem ser prejudiciais e causam doenças (Brader et al., 2017).

As plantas possuem um sistema de defesa para afastar possíveis ameaças (Boutrot e Zipfel, 2017). Os tipos de defesa da planta em resposta à presença de microorganismos podem ser divididos em imunidade basal e adaptativa. A imunidade basal é primeira linha de defesa da planta, porque reconhece moléculas microbianas amplamente conservadas, denominadas Padrões Moleculares Conservados Associados a Microorganismos (MAMPs) (Peyraud et al., 2017). Este reconhecimento ocorre na membrana e é realizado por meio dos Receptores de Reconhecimento de Padrões Moleculares (PRR), desencadeando a imunidade induzida por MAMPs (MTI), que na maioria das vezes induz o fechamento estomático, restringindo a entrada dos patógenos nos espaços intracelulares (Boutrot e Zipfel, 2017). O MTI atua na resistência basal contra patógenos adaptados (biotróficos e necrotróficos) e na resistência de não-hospedeiro em patógenos não adaptados (Couto e Zipfel,

2016). A segunda linha de defesa das plantas, a imunidade adaptativa, pode ser ativada por sinais específicos dos patógenos como efetores e proteínas de avirulência (Peyraud et al., 2017). Estes afetam as respostas de defesa das plantas para facilitar o desenvolvimento da doença. O reconhecimento do patógeno é realizado por receptores citoplasmáticos ou apoplásticos denominados genes de resistência (genes R), induzindo a reação de hipersensibilidade (HR), que é a morte programada das células (Zhang e Coaker, 2017). A imunidade basal atua contra patógenos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos, já a imunidade adaptativa não atua contra patógenos necrotróficos, apenas em biotróficos e hemibiotróficos por gerar HR (Walters et al., 2013).

3.1. Padrões recorrentes nas interações microrganismo-planta

Microorganismos que utilizam nutrientes derivados de plantas estabelecem com estas relações comensais, mutualísticas ou parasitárias. O parasitismo ocorre quando patógenos infectam o tecido vegetal e causam doenças, vencendo o aparato de defesa das plantas. No entanto há outros microorganismos que são endofíticos e não são patogênicos às plantas, porque se relacionam com estas por mutualismo e comensalismo. Os microorganismos podem ser encontrados no exterior das plantas, como na rizosfera, filosfera, ou mesmo no interior das plantas, na endosfera. Para modular a colonização microbiana e promover ou manter associações simbióticas, provavelmente o sistema imune das plantas evoluiu mecanismos para atuar na detecção de patógenos e interromper sua multiplicação e também para atuar como um sistema de vigilância (Brader et al., 2017). Esse sistema limita o crescimento microbiano em geral e permite a colonização a longo prazo por comunidades microbianas menos abundantes, mas altamente diversificadas. Podendo ser visto como um sistema de manejo microbiológico que também está envolvido na acomodação controlada por microorganismos benéficos (Brader et al., 2017). É sugerido que a variação de PRRs específicos em diferentes famílias de plantas está relacionado com a faixa de hospedeiros que os microorganismos colonizadores são bem-sucedidos. Provavelmente ocorre tanto para colonização de patógenos quanto para comensais (Hacquard et al., 2017).

A exposição da planta a alguns padrões moleculares, efetores, estímulos físicos, químicos e/ou microorganismos não-patogênicos pode resultar na expressão de um conjunto de respostas de defesa de maneira local e sistêmica (Mauch-Mani et al., 2017). O estímulo microbiano nas plantas demonstra a capacidade de uma célula ou órgão de responder às adversidades do ambiente. Desta forma, as respostas imunológicas locais e sistêmicas ativadas levam ao aumento da resistência ao estresse em geral (Hacquard et al., 2017). *Priming* é o estado de alerta ativado por fatores bióticos ou abióticos que permite a planta estar preparada para infecções futuras. Esse fenômeno é eficaz contra patógenos, artrópodes e estresses abióticos (Mauch-Mani et al., 2017). Com isso, caso ocorra a sinalização de estresse abiótico e este se sobreponha à defesa do hospedeiro contra um patógeno, o *priming* é o uso da resposta ao estresse

abiótico fornecendo uma medida de proteção contra a invasão por patógenos (Suzuki et al., 2013). Portanto, o sistema de defesa inato das plantas é necessário tanto para a limitação do patógeno quanto para a permanência de microorganismos benéficos. O equilíbrio dessas atividades implica na relação entre a homeostase microbiana com a saúde das plantas, sugerindo que plantas saudáveis vivem em íntima associação com microorganismos (Hacquard et al., 2017).

O sucesso da colonização das plantas e das interações patogênicas ou benéficas entre plantas e microorganismos está condicionada à capacidade dos microorganismos manipularem as defesas da planta (Lo Presti et al., 2015). Apenas uma pequena proporção da microbiota tem o potencial de suprimir as respostas de defesa da planta. Ao comparar organismos não-patogênicos com patogênicos associados à planta, percebe-se uma redução na quantidade de genes efetores e a falta de fatores de virulência específicos. Embora alguns organismos presentes na microbiota vegetal tenham desenvolvido outras estratégias para atenuar as respostas imunes do hospedeiro (Hacquard et al., 2017). Microorganismos benéficos podem manipular a imunidade do hospedeiro para estabelecer um relacionamento bem-sucedido.

3.2. Ferramentas da biotecnologia utilizadas no estudos das interações planta-patógeno

A construção de mutantes é uma das tecnologias mais recorrentes no estudo das interações microrganismo-planta, principalmente nas patogênicas. Dentre os métodos de mutagênese mais utilizados atualmente estão a inserção ao acaso de transposons e mutações sítio-dirigidas com *Agrobacterium tumefaciens*, recombinação homóloga e CRISPR-Cas (Repetições Palindrômicas Curtas, Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas a endonuclease Cas) (Nejat et al., 2016).

O avanço tecnológico levou a criação das ômicas, metodologias modernas que podem ser utilizadas no estudo das interações microrganismo-planta. As metodologias ômicas tem em comum o alto processamento combinado com novas abordagens na análise de dados. Estas são tecnologias que medem todo o conjunto, ou pelo menos uma grande parte, de um único tipo de biomoléculas. Dentre eles estão a genômica, proteômica, transcriptômica, metabolômica e efetorômica, que permitem o estudo do conjunto dos genes, proteínas, transcritos, metabólitos e efetores, respectivamente em interações entre microorganismos e plantas (Figura 2). Essas técnicas permitiram também o estudo de genomas inteiros de microorganismos de interesse e a identificação de genes responsáveis pela virulência de patógenos a plantas hospedeiras. A identificação de genes chave na interação com plantas hospedeiras evidenciou alvos importantes para a produção de inibidores específicos.

O uso dessas novas tecnologias tem ajudado no entendimento das interações entre plantas e microorganismos e também nas interações entre microorganismos por meio da metagenômica/microbiômica.

4. Aplicações da biotecnologia no melhoramento genético de plantas

O foco inicial do melhoramento genético foi a obtenção de elevados níveis de produtividade. Em regiões temperadas e tropicais de cultivo foram observadas perdas de rendimento (tanto quantitativos quanto qualitativos) pelo ataque de patógenos de plantas (Acquaah, 2009). Este problema não é sanado atualmente apenas com a aplicação de químicos protetores e/ou curativos.

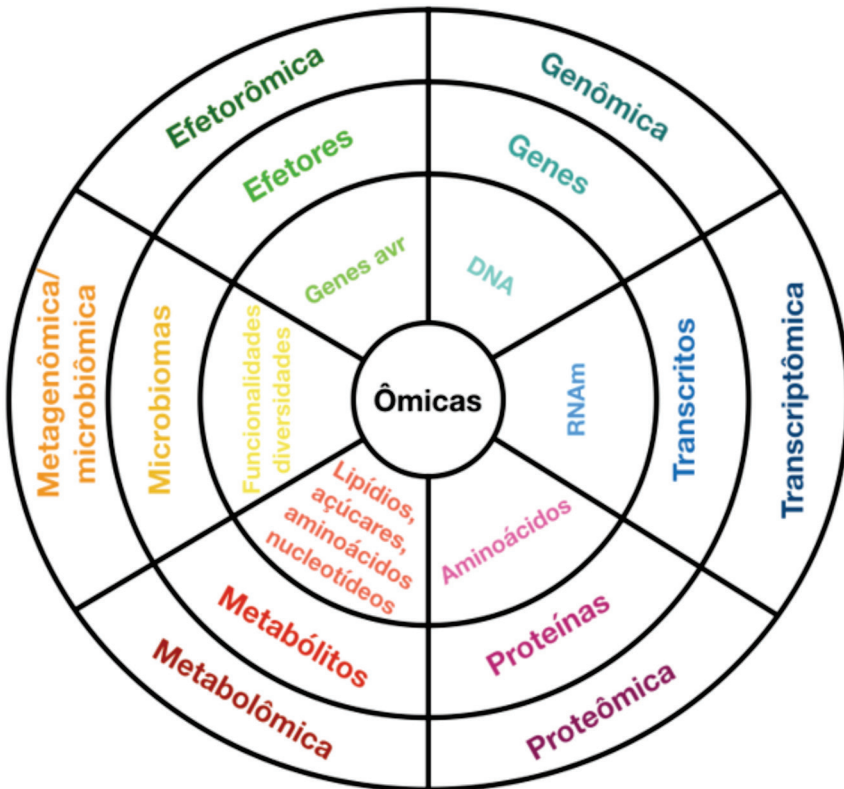


FIGURA 2. Metodologias ômicas utilizadas no estudo das interações entre microorganismos e plantas.

Houve assim a necessidade de aproximação dos melhoristas de plantas com os fitopatologistas na busca por plantas resistentes aos patógenos, diminuindo as aplicações de produtos químicos, consequentemente reduzindo os riscos do

surgimento de patógenos resistentes (Staub, 1991; Russell, 1995; Brent e Hollomon, 1995; Bartlett et al. 2002; Ishii e Holloman, 2015).

O conceito de melhoramento clássico foi resignificado com a manipulação direta do DNA ou RNA pela biotecnologia, ficando conhecido como transgenia (ou GM do inglês, *genetically modified*). No melhoramento tradicional são manuseados milhares de genes, muitas vezes de forma simultânea, enquanto que no processo de transgenia são um ou poucos genes manuseados separadamente (Ramalho e Furtini, 2015). Dentre as aplicações da biotecnologia na fitopatologia estão a busca e posterior inserção de genes para resistência às doenças de plantas. O grande marco de expansão da biotecnologia ocorreu a partir de 1970 com a biologia molecular e as técnicas de culturas de tecidos de plantas que permitiram a produção de plantas transgênicas com expressão de resistência a determinados fitopatógenos (Brioso, 2013).

4.1. Técnicas e aplicações no melhoramento genético

As tecnologias do DNA recombinante, fertilização *in vitro*, fusão de protoplastos, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA são as principais técnicas utilizadas no melhoramento visando resistência a doenças. A transferência gênica é um passo fundamental no desenvolvimento de plantas transgênicas, pois permite a integração de novas características no genoma da planta hospedeira. As transferências gênicas tem sido tradicionalmente feitas (i) por *Agrobacterium* (transferência indireta de genes); (ii) por bombardeamento de partículas (transferência direta de genes) e (iii) por meio da fusão de protoplastos. Após a transferência, é essencial observar a integração do gene (transferido) na planta hospedeira, sendo necessário o uso de um promotor específico que tenha capacidade de atuar como marcador seletivo. Esses promotores são muitas vezes constitutivos e a região 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) vem sendo amplamente utilizado (Turrini et al. 2015).

Plantas transgênicas são normalmente produzidas por meio da integração do gene ao acaso no genoma da planta, mas as técnicas mais modernas permitem um controle mais preciso do local de integração. Inserções ou deleções em locais definidos e com precisão em um genoma específico, podem ser obtidas por ferramentas como nucleases dirigidas ao local (SDN - site-directed nucleases) dos tipos dedos de zinco (ZFN - zinc finger nucleases), TALENs (Transcription activator-like effector nuclease) ou CRISPR/Cas9 (van de Wiel et al., 2017). A edição por CRISPR/Cas9 tornou-se uma importante ferramenta pois é um método que serve tanto adicionar quanto remover genes de plantas com maior rapidez, precisão e facilidade quando comparada com outras técnicas. Diversos trabalhos com resistência de doenças de plantas vem usando a edição por CRISPR/Cas9 com técnica contra alguns fitopatógenos. Por exemplo, a tecnologia CRISPR/Cas9 foi utilizada para eliminar os três homoelelos do gene MLO e assim conferir resistência do trigo a oídio (*Blumeria*

graminis f. sp. *tritici*) (Wang et al., 2014). Também têm sido desenvolvidos trabalhos pioneiros com arroz, tomate e citrus por edição genômica com CRISPR/Cas9 contra patógenos de plantas (Tabela 2). Todos os eventos com resistência a doenças de plantas ainda estão em fase de testes e necessitam ser aprovadas para o cultivo em campo, o que está previsto para se iniciar em 2020.

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing*, PTGS) que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA). Esse mecanismo permite “desligar” a função de genes em qualquer organismo vivo. Esse mecanismo é mediado por pequenos RNAs de fita dupla (*double stranded RNA*, dsRNAs) capazes de reconhecer especificamente uma sequência de mRNA-alvo (*messenger RNA*) e clivar ou reprimir genes específicos. O mecanismo de silenciamento em plantas permite que quando o dsRNA é absorvido pelas raízes, este acione o RNAi sistêmico e silencie o gene alvo em toda a planta (Coleman et al. 2014). Esta tecnologia já foi utilizada no Brasil para a produção de plantas com resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BGMV). Estudos em campo já foram conduzidos em diferentes regiões para caracterização molecular e estabilidade do transgene por oito gerações, como pode ser visto no capítulo “RNAi based transgenic common bean resistant to Bean Golden Mosaic Virus” (Aragão et al. 2013; Faria et al. 2014).

TABELA 2. Plantas com resistência a patógenos por meio da tecnologia CRISPR/Cas9 e potencial para uso em campo

Planta	Gene editado	Patógeno	Referência
Arroz	<i>OsERF922</i> ¹ <i>WRKY</i> gene 45 ²	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Wang et al., 2016
Trigo	<i>MLO</i> ³ <i>TaEDR1</i> ⁴	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Wang et al., 2014 Zhang et al. 2017
Tomate	<i>SIMlo1</i> ⁵	<i>Oidium neolycopersici</i>	Nekrasov et al. 2017
Citrus	<i>CsLOB1</i> ⁶	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Jia et al., 2017
Pepino	<i>eIF4E</i> ⁷	Membros da família Potyviridae	Chandrasekaran et al., 2016

¹*OsERF922* gene que codifica um fator de transcrição do tipo APETELA2 / fator de resposta ao etileno (AP2 / ERF) que é rápido e fortemente induzido por ácido abscísico (ABA) e sal, bem como por patovares virulentos e avirulentos da brusone do arroz; ²Fator de transcrição para os ativadores de plantas como benzotiadiazol via ácido salicílico; ³gene *MLO* (Mildew Locus O) codifica proteínas específicas de plantas contendo sete domínios transmembranares e provavelmente atuando na transdução de sinal de um modo dependente de cálcio e calmodulina; ⁴*TaEDR1* regula negativamente a resistência do oídio em trigo; ⁵*SIMlo1* é um tipo de *MLO* que confere susceptibilidade a oídio; ⁶*CsLOB1* gene crítico de susceptibilidade ao cancro cítrico e ⁷*eIF4E* (eukaryotic translation initiation factor 4E) gene recessivo de patogenicidade de Potyviridae.

O primeiro evento de silenciamento com RNAi veio com o desastre econômico causado pelo vírus da mancha anelar da mamoeiro (PRSV) no distrito de Puna, Havaí. A planta resultante pela tecnologia RNAi expressava o gene da capa protéica (cp) de um isolado havaiano de PRSV, fato que resultou em plantas resistentes ao vírus (Tennant et al., 2001). As cultivar com a tecnologia foi comercialmente liberadas em maio de 1998, seis anos após o mês da descoberta do PRSV em Puna (Gonsalves et al., 2004). Outros eventos usando RNAi como PTGS para resistência ou redução na severidade de doenças de plantas são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Plantas transgênicas com genes silenciados por RNAi para resistência a patógenos

Planta	Gene silenciado	Patógeno	Referência
Ceraia	HIGS ¹ CYP51 ²	<i>Fusarium graminearum</i> (FHB) ⁸	Machado et al., 2018 Kock et al. 2013
Trigo	Chs ³	<i>Fusarium graminearum</i> (FHB) e <i>Fusarium culmorum</i> (FSB) ⁹	Cheng et al., 2015
Tomate	Bc-DCL1 e Bc-DCL2 ⁴	<i>Botrytis cinerea</i>	Wang et al., 2016
Feijão	AC1 ⁵	BGMV ¹⁰	Farias et al., 2014
Mamão	CP ⁶	PRSV ¹¹	Gonsalves et al., 2004
Uva	16D10 ⁷	<i>Meloidogyne</i> sp.	Yang et al., 2013

¹Silenciamento do gene induzido pelo hospedeiro (HIGS) usado no momento da tentativa de infecção e, portanto, reduz os níveis de doença; ²gene da P450 lanosterol C-14 α -desmetilase (CYP51) que são essenciais para a biossíntese do ergosterol, e assim restringir as infecção por fungos; ³Chs gene da família sintase quinase que atua na sobrevivência e infecção fúngica; ⁴Dicer-like protein 1 (Bc-DCL1) gene que atenua a patogenicidade e o crescimento dos fungos; ⁵AC1 gene responsável pela replicação viral; ⁶CP gene da cápsula proteica; ⁷16D10 gene efetor para mortalidade; ⁸*Fusarium* head blight (FHB); ⁹*Fusarium* seedling blight (FSB); ¹⁰BGMV *Bean golden mosaic virus* e ¹¹ PRSV *Papaya ringspot virus*.

5. Controle de doenças de plantas na agricultura moderna

A agricultura é a base da economia mundial. É a principal fonte de alimentos e matéria prima para grande parte de tudo que consumimos. Estima-se que anualmente são produzidos 4 bilhões de toneladas de alimentos no mundo e uma oferta ainda maior será necessária para atender as mais de 9 bilhões de pessoas em 2050, de acordo com as estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). O Brasil tem um papel crucial na produção de alimentos e, assim como outros países, enfrenta grandes desafios para a produção sustentável e segura.

Os esforços para atender a essas exigências fazem parte da agenda do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (Sustainable Development Goals – SDGs) da FAO, assinado em 2015 pelos 193 países do globo terrestre com metas de erradicação da fome, desnutrição e produção sustentável até 2030 (<http://www.fao.org/sustainable-development-goals/en>). Além disso, leis de exportação e importação de alimentos restringem o uso indiscriminado de pesticidas químicos e aquecem o mercado de biológicos e produtos alternativos para a proteção de cultivos.

Desde a primeira Revolução Verde, iniciada em 1950 nos Estados Unidos, o setor agrícola vem atingindo metas cada vez maiores de produção e produtividade com o desenvolvimento de híbridos, cultivares, transgênicos, novas moléculas químicas, fertilizantes e maquinários de alta tecnologia. No entanto, o crescimento veio acompanhado pelo monocultivo, uso excessivo de pesticidas e um sistema altamente dependente de moléculas químicas e fertilizantes. Consequentemente, exaustão dos recursos edáficos, contaminação de cursos d'água e inúmeros casos de quebra de resistência ocorreram e desafiam o novo modelo de agricultura nos próximos anos (Foley et al., 2011). Em decorrência disso, outros sistemas como plantio direto, rotação de culturas, manejo integrado de pragas e fórmulas químicas de moderado a baixo impacto vem sendo desenvolvidas e implementadas nos novos sistemas de produção. Com isso, o mercado de produtos biológicos para controle de pragas e doenças e uso de métodos de controle alternativos tem sido empregados para impulsionar a produção de alimentos de maneira sustentável.

5.1. Controle biológico de doenças de plantas

Os microorganismos do solo, por muitos anos negligenciados, passaram a protagonistas do novo modelo de agricultura. Interações entre microorganismos e plantas são intensivamente estudadas objetivando o controle de doenças, pragas e promoção de crescimento. O controle biológico é caracterizado pela redução da densidade de inóculo ou agentes determinantes da doença causada por um patógeno e controlada por um ou mais organismos (Cook e Backer, 1983) e é o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e antagonista(s), fortemente influenciados pelo ambiente. As relações patógeno-antagonista podem ocorrer por diversos mecanismos como parasitismo, antibiose, competição por nicho e/ou nutrientes, indução de resistência e predação.

Atualmente o mercado de biológicos movimenta bilhões de dólares no mundo e cerca de 500 milhões de reais no Brasil. A adoção do setor de biológicos pelas multinacionais demonstra a importância e a proporção que os biodenfosivos tem atingido (Tabela 4). No Brasil, existem 122 produtos biológicos registrados para o controle de pragas e doenças (MAPA). Interessantemente, aqueles relacionados ao controle de doenças se concentram em 13 agentes, dos quais 54% são a base de bactérias, especialmente as do gênero *Bacillus*, seguidos de fungos do gênero *Trichoderma* que representam 23% das formulações (Tabela 4). Embora a adoção

do controle biológico seja evidente, um dos pontos críticos para sua utilização é a eficácia e tempo de prateleira dos bioprodutos. Essas duas características estão ligadas a ação do antagonista em si e a formulação do biodefensivo.

TABELA 4. Bioprodutos registrados para o controle de doenças de plantas no Brasil

Agentes de controle biológico	Nº de registros	Alvos	Titular de registro
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 21882	1	<i>Aspergillus flavus</i>	Biosphere Indústria e Comércio de Insumos Agrícolas Ltda
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	<i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sphaeroteca fuliginea</i> <i>Phyllosticta citricarpa</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos Ltda. Iharabras
<i>Bacillus firmus</i>	7	<i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne javanica</i>	Bayer S.A.
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	2	<i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Pratylenchus zeae</i>	FMC
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	1	<i>Meloidogyne javanica</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i>	Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda.
<i>Bacillus pumilus</i>	1	<i>Alternaria porri</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sphaeroteca macularis</i>	Bayer S.A.
<i>Bacillus subtilis</i>	3	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria porri</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Sphaeroteca macularis</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Hemileia vastatrix</i>	Bayer S.A. Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda. Arysta

cont.

Agentes de controle biológico	Nº de registros	Alvos	Titular de registro
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	<i>Meloidogyne incognita</i>	Ballagro Agro Tecnologia Ltda.
<i>Pasteuria nishizawae</i>	1	<i>Heterodera glycines</i>	Syngenta
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	1	<i>Meloidogyne javanica</i>	Rizoflora Biotecnologia AS
<i>Trichoderma asperellum</i>	3	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i>	Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda. Novozymes BioAg Produtos para Agricultura Ltda.
<i>Trichoderma harzianum</i>	6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Ballagro Agro Tecnologia Ltda. Koppert do Brasil Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos Ltda.
<i>Trichoderma stromaticum</i>	1	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	CEPLAC - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

A formulação de bioprodutos é dispendiosa e utiliza de múltiplas tecnologias até atingir a escala comercial. As características ecofisiológicas do microrganismo, fontes de açúcar, carreadores e adjuvantes devem ser cuidadosamente analisados para que haja sinergismo entre os componentes do produto e possibilite a sobrevivência, estabilidade, proteção e eficiência do microrganismo no campo. Os estudos com nanopartículas tem ganhado espaço nas formulações de fertilizantes e pesticidas (Mishra et al., 2017).

5.2. Engenharia de microbiomas para o controle de doenças

Plantas, assim como o corpo humano, hospedam uma grande quantidade de microorganismos que auxiliam no seu desenvolvimento. Ao conjunto de microorganismos interagindo em um ambiente dá-se o nome de microbioma. O Projeto Microbioma Humano, iniciado em 2007 pelo *National Institutes of Health* (NIH) nos Estados Unidos, resultou em importantes descobertas para a área médica como a relação entre a doença de Alzheimer e a microbiota intestinal (Jiang et al., 2017). Análogo a isso, as mesmas abordagens podem ser empregadas na agricultura para melhorar o desempenho de plantas de maneira sustentável (Mendes et al., 2015).

O microbioma da rizosfera exerce grande influência no crescimento e desenvolvimento vegetal e apresenta alto potencial biotecnológico para usos em diversas áreas, como a médica pela produção de novas drogas a partir de metabólitos de microorganismos e para a agricultura com a promoção da saúde vegetal. Relações entre filós de bactérias habitantes da rizosfera de plantas e aquelas encontrados no intestino humano não são apenas coincidências (Mendes et al., 2015).

As plantas recrutam seu microbioma de acordo com o genótipo (Peiffer e Ley, 2013; Mendes et al., 2018), idade (Peiffer et al., 2013), e o utilizam para se defender de patógenos (Chapelle et al., 2016; Mendes et al., 2011), pragas (Pineda et al., 2017) e se adaptar a condições adversas (Santos-Medellín et al., 2017). Em troca, os microorganismos utilizam dos exsudatos radiculares para seu desenvolvimento. Recentemente, foi demonstrada a indução de resistência sistêmica mediada pela microbiota rizosférica de *Arabidopsis thaliana* sob ataque de *Hyaloperonospora arabidopsidis*, agente causal do míldio (Berendsen et al., 2018). Semelhante aos sistemas imunes de mamíferos, o solo também possui uma memória como sistema de defesa para limitar novas infestações e ataques de patógeno às plantas (Berendsen et al., 2018). Identificar comunidades padrões ligadas à saúde e doença de plantas tem sido o objetivo de muitos estudos.

A engenharia de microbiomas é uma nova abordagem para melhorar a saúde vegetal através da seleção artificial da microbiota associada ao hospedeiro, além de conferir plasticidade ambiental frente a possíveis estresses ambientais ou antropogênicos contribuindo para a resiliência do agroecossistema. Estudos sugerem que parte dos microbiomas podem ser herdados em gerações seguintes (Peiffer et al., 2013). Com isso, o melhoramento genético pode utilizar dessa ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de novas cultivares e híbridos capazes de favorecer comunidades antagonistas e promotoras de crescimento.

Outro conceito aplicado principalmente no controle de fitopatógenos de solo é a supressividade. Solos supressivos são aqueles que limitam a multiplicação do patógeno ou da doença, mesmo em condições ideais para que ela ocorra. Além da origem em propriedades químicas e físicas do solo (Meyer e Shew, 1991), a supressividade está muitas vezes relacionada às comunidades microbianas que podem ser transplantadas em solos condutivos e conferir supressividade (Mendes et al., 2011; Chapelle et al., 2016; Elhady et al., 2018).

A suplementação dos solos com microbiomas específicos sugere uma drástica mudança na formulação de microorganismos que passa de um agente de biocontrole para um consórcio de microorganismos supressores a doenças. Ainda mais desafiador, será necessário uma combinação ótima de organismos que tenham amplo espectro de ação (Mendes et al., 2018).

5.3. Controle alternativo e o uso de moléculas de baixo impacto

Outras formas de controle podem ser empregadas para a sustentabilidade do sistema. O controle alternativo se caracteriza pelo uso de compostos naturais como

extratos de plantas, biofertilizantes, leite cru, urina de vaca, emulsão de peixe e extratos de fungos (Cantrell et al., 2012). Todas essas substâncias podem ser utilizadas como alternativa ao uso de moléculas sintéticas. No período de 1997 a 2010, 63,1% dos pesticidas registrados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos foram de origem biológica ou natural e os sintéticos derivados de naturais representaram 6,1% (Cantrell et al., 2012).

A utilização desse tipo de controle tem sido incentivada tanto pela eficácia quanto pelo baixo custo em relação aos outros métodos. A calda de leite cru pode ser utilizada para controlar várias doenças de plantas, desde aquelas causadas por fungos biotróficos como no caso dos oídios. O leite pode ter efeito direto no patógeno pela sua atividade germicida e efeito indireto estimulando a microbiota nativa ou induzindo resistência em plantas (Bettiol, 1999). *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* estão entre os filos de bactérias mais abundantes no microbioma do leite cru, filos estes que abrigam diversos agentes de biocontrole de doenças de plantas (Li et al., 2018).

Produtos alternativos mostraram ser tão eficazes quanto as moléculas convencionais. Biofertilizantes e leite cru e derivados (soro) foram aplicados em couve para o controle da podridão negra das crucíferas (*Xanthomonas campestris* pv *campestris*) e controlaram 56% e 44% da doença em campo, respectivamente. Além do controle, esses produtos agregaram valor nutricional à couve e aumentaram a atividade antioxidante (Nuñez et al., 2018).

Com propriedades nematicidas, muitos extratos de plantas tem sido testados para controle de nematóides. Compostos orgânicos voláteis (COVs) de uma variedade de plantas tem sido testados para o controle de espécies de *Meloidogyne* (Barros et al., 2014a, 2014b; Silva et al., 2018). Os ácidos orgânicos também são utilizados na agricultura para controlar doenças, principalmente aquelas ligadas à fungos de solo como *Verticillium dahliae* e *Pythium ultimum* (Abbasi et al., 2009). Outros exemplos de substâncias utilizadas no controle alternativo de doenças podem ser consultadas em Stangarlin et al. (2011) e Oliveira (2018).

6. Perspectivas futuras

Todos os aspectos da fitopatologia foram influenciados pelos avanços na biotecnologia. Há pouco mais de 50 anos atrás iniciou-se a era do DNA recombinante seguido por outras tecnologias genéticas. A corrida armamentista entre plantas e patógenos é bem conhecida atualmente graças a estes avanços, que permitiram a utilização dos efetores de patógenos no melhoramento para a obtenção de variedades resistentes a patógenos, tornando a agricultura mais sustentável e menos dependente de agroquímicos. No futuro, espera-se que esses estudos continuem, mas em um ritmo mais acelerado, uma vez que a grande disponibilidade de genomas de patógenos obtidos por NGS permitirão a rápida recuperação e o estudo dos efetores por meio de genômica comparativa e funcional. As diferenças entre microorganismos benéficos,

como bactérias endofíticas e micorrizas, e patógenos biotróficos e necrotróficos estão se confirmando cada vez menores do que se esperava, graças aos estudos com as técnicas ômicas (De Wit et al., 2009; De Wit, 2016).

A diagnose de doenças de plantas tem sofrido grandes mudanças na precisão, rapidez e reprodutibilidade. As principais tecnologias responsáveis pelos desenvolvimentos da diagnose incluem a biologia molecular, sorologia, engenharia e física. Os métodos baseados em sensoriamento remoto tem ganhado popularidade no contexto da agricultura de precisão. Veículos aéreos, drones ou satélites podem ser utilizados para as determinações das propriedades espectroscópicas (ópticas e térmicas) de plantações a serem diagnosticadas. Da mesma forma, métodos que resultem em diagnóstico no campo tem ganhado popularidade. Dentre estes, destacam-se LAMP e métodos colorimétricos capazes de detectar *in situ* a presença de material genético, proteínas ou de metabólitos específicos de patógenos. Apesar dos avanços já obtidos, a amostragem e a sensibilidade de muitos métodos de diagnose ainda permanecem como desafios a serem superados (Martinelli et al., 2015).

O controle de doenças de plantas é o principal objetivo prático da fitopatologia e tem experimentado desenvolvimentos sem precedentes com o uso da biotecnologia. O melhoramento de plantas por meio de métodos biotecnológicos tem sido tradicionalmente controlado por multinacionais, que possuem em seus portfólios diversas cultivares transgênicas melhoradas para resistência a patógenos a serem liberadas nos próximos anos. As características dessas cultivares incluem resistência a insetos e patógenos e tolerância a fatores abióticos e herbicidas em culturas como milho, algodão, soja, colza, arroz, batata, beterraba e trigo. No entanto, a maior parte das tecnologias são desenvolvidas em instituições públicas de pesquisa (Parisi et al., 2016).

O crescente descontentamento do público com os resíduos químicos nos alimentos tem levado cientistas e a indústria a buscarem por alternativas mais sustentáveis. O controle biológico inundativo possui limitações, levando a comunidade científica da área a estudar mais ativamente o engenheiramento e reprogramação dos microbiomas para a promoção da saúde integrada do sistema solo-planta (Ahkami et al., 2017). Os métodos moleculares e a bioinformática tem tido um papel fundamental na viabilização desses estudos. Um dos grandes desafios para o futuro é determinar as condições necessárias para direcionar os microorganismos do solo e das plantas para obter a tão desejada saúde integrada do sistema. Em muitos casos, certos agentes de controle biológico serão os responsáveis pela reprogramação, mas em outros o fornecimento de nutrientes específicos farão esse papel.

Desde os primórdios da humanidade até os dias atuais a ciência da fitopatologia sempre influenciou a agricultura. A biotecnologia continuará a impulsionar os estudos para o entendimento dos patógenos, suas relações com as plantas e em última instância o seu controle, em um enlace sem fim.

Referências Bibliográficas

- Abbasi PA, Lazarovits G, Jabaji-Hare S (2009). Detection of High Concentrations of Organic Acids in Fish Emulsion and Their Role in Pathogen or Disease Suppression. *Disease Control and Pest Management*, 99: 274-281. doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0274
- Abrahams A, Rensburg BJ (2017). *Procedures in the diagnosis of plant diseases: The path to effective control measures*. Potchefstroom: ARC-Grain Crops. Retrieved October 18, 2018, from <https://www.grainsa.co.za/procedures-in-the-diagnosis-of-plant-diseases-the-path-to-effective-control-measures>
- Ahkami AH, White RA, Handakumbura PB, Jansson C (2017). Rhizosphere engineering: enhancing sustainable plant ecosystem productivity. *Rhizosphere*, 3:233–243. doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.04.012
- Alzate-Marin AL, Cervigni GDL, Moreira MA, Barros EG (2005). Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4), 333-342. doi.org/10.1590/S0100-41582005000400001
- Angelotti F, Gava CAT, Batista DC, Fernandes JMC, Pavan W (2012). Sistema de Alerta e Previsão para Doenças da Videira. Ed. 1, Petrolina: *EMBRAPA/MAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Semiárido e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, 36 p.
- Aragão FJ, Nogueira EO, Tinoco MLP, Faria JC (2013). Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of biotechnology*, 166:42-50. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.009
- Barros AF, Campos VP, Silva JCP, Estupiñan LL, Silva AP, Pozza EA, Pedroso LA (2014a). Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 44:190-199. doi: 10.1002/ps.5142
- Barros AF, Campos VP, Silva JCP, Pedroso MP, Medeiros FHV, Pozza EA, Reale AL (2014b). Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, 80:34-43. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.02.011
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58:649-662. doi: 10.1002/ps.520
- Berbara RLL, Brioso PST Micélio + carga enzimática. Evolução dos Biológicos. *Revista Campo & Negócios HF, Uberlândia*, v.79, p.64-65. 2011.
- Berendsen RL, Vismans G, Yu K, Song Y, de Jonge R, Burgman WP, Burmølle M, Herschend J, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (2018) Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME Journal*, 12:1496–1507. doi.org/10.1038/s41396-018-0093-1
- Bettiol W (1999) Effectiveness of cow's milk against zucchini squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. *Crop Protection*, 18:489-492. doi: 10.1016/S0261-2194(99)00046-0

- Boutrot F, Zipfel C (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of Phytopathology*, 55, 257-286. doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106
- Brader G, Compant S, Vescio K, Mitter B, Trognitz F, Ma LJ, Sessitsch A (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annual review of phytopathology*, 55, 61-83. doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641
- Brent KJ, Hollomon DW (1995). *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?* (p. 48). Brussels: GIFAP. ISBN 90-72398-07-6
- Brioso, PST (2013). Sustentabilidade, Biotecnologia Vegetal e suas interações com a Fitopatologia. *EDUCamazônia*, 10:158-164. ISSN 2318-8766
- Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO (2012) Natural products as sources for new pesticides journal of natural products. *J. Nat. Prod.*, 75:1231-1242. doi: 101021/np300024u
- Carrer H, Barbosa AL, Ramiro DA (2010). Biotecnologia na agricultura. *Estudos Avançados*, 24(70), 149-164. https://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142010000300010
- Cavalcanti FR, Gariido LR (2015). Controle de Doenças. Produção Integrada de uva para processamento. Brasília, DF: Embrapa, vol 4, p 34-48. ISBN 978-85-7035-477-8
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, ... & Gal-On A (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*, 17:1140-1153. doi: 10.1111/mpp.12375
- Chapelle E, Mendes R, Bakker PAH, Raaijmakers JM (2016). Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *The ISME Journal*, 10:265–268. doi.org/10.1038/ismej.2015.82
- Cheng W, Song XS, Li HP, Cao LH, Sun K, Qiu XL, ... , Qu B (2015). Host-induced gene silencing of an essential chitin synthase gene confers durable resistance to *Fusarium* head blight and seedling blight in wheat. *Plant biotechnology journal*, 13:1335-1345. doi: 10.1111/pbi.12352
- Coleman AD, Wouters RHM, Mugford ST, Hogenhout SA (2014). Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *Journal of experimental botany*, 66:541-548. doi.org/10.1093/jxb/eru450
- Cook RJ, Baker KF (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society. ISBN : 0890540535
- Couto D, Zipfel C (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16:537.
- De Wit PJ, Mehrabi R, Van den Burg HA, Stergiopoulos I (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology*, 10:735–747. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00591.x
- De Wit, PJGM (2016). Apoplastic fungal effectors in historic perspective; a personal view. *New Phytologist*, 212: 805–813. doi: 10.1111/nph.14144
- Elhady A, Adss S, Hallmann J, Heuer H (2018). Rhizosphere microbiomes modulated by pre-crops assisted plants in defense against plant-parasitic nematodes. *Front Microbiol*, 9:1133. doi.org/10.3389/fmicb.2018.01133
- Faria JC, Valdisser PAMR, Nogueira EOPL, Aragão FJL (2014). RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean shows simple inheritance for both transgene and disease

resistance. *Plant Breed.* 133:649-653.

Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, ... , Zaks DPM (2011) Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 478:337-342. doi.org/10.1038/nature10452

Furtado EL, Passos JRS (2015). *Uso de VANTs no monitoramento de doenças*. In: Baldin ELL, Kronka AZ, Fujihara RT. (Org.). *Proteção vegetal*. Botucatu: Fepaf, cap.2. p.15-27. doi: 10.18677/EnciBio_2018A80

Gonsalves D, Gonsalves C, Ferreira S, Pitz K, Fitch M, Manshardt R, Slightom J (2004). Transgenic virus resistant papaya: From hope to reality for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. *APSnet feature story for July*.

Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P (2017). Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual review of phytopathology*, 55:565-589. doi. org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623

ISAAA (2017). Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief No. 53. ISBN: 978-1-892456-67-2.

Ishii H, Holloman DW (2015). Fungicide resistance in plant pathogens. *Tokyo: Springer*. doi: 10.1007/978-4-431-55642-8

Jensen JR. Sensoriamento remoto do ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres. São José dos Campos: Parêntese, 2009. 598 p.

Jia H, Zhang Y, Orbović V, Xu J, White FF, Jones JB, Wang N (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene Cs LOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant biotechnology journal*, 15:817-823. doi: 10.1111/pbi.12677

Jiang C, Li G, Huang P, Liu Z, Zhao B (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 58:1-15. doi: 103233/jad-161141

Khater M, Escosura-Muñiza A, Merkoçia A (2017). Biosensors for plant pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 93:72–86. doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.091

Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J, Kogel KH (2013). Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:19324-19329. doi: 10.1073/pnas.1306373110

Li N, Wang Y, You C, Ren J, Chen W, Zheng H, Liu Z (2018). Variation in Raw Milk Microbiota Throughout 12 Months and the Impact of Weather Conditions. *Scientific Reports*, 8:2371. doi:10.1038/s41598-018-20862-8

LIMA J (2017). NASA confirma dados da Embrapa sobre área plantada no Brasil. Embrapa. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30972114/nasa-confirma-dados-da-embrapa-sobre-area-plantada-no-brasil>>. Acesso em: 9 de novembro de 2018.

Lo Presti L *et al.* 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 66:513–45.

Machado AK, Brown NA, Urban M, Kanyuka K, Hammond-Kosack KE (2018). RNAi as an emerging approach to control *Fusarium* head blight disease and mycotoxin contamination in cereals. *Pest management science*, 74(4), 790-799.

- Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G. et al.. 2015. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35 (1), pp.1-25.
- Mauch-Mani B *et al.*, 2017. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual review of plant biology*, 68: 485-512.
- Mendes LW, Mendes R, Raaijmakers JM, Tsai SM (2018). Breeding for soil-borne pathogen resistance impacts active rhizosphere microbiome of common bean, *The ISME Journal*. doi. org/10.1038/s41396-018-0234-6
- Mendes R, Raaijmakers JM (2015). Cross-kingdom similarities in microbiome functions. *The ISME Journal*, 9:1905–1907. doi.org/10.1038/ismej.2015.7
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH et al. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332:1097–1100. doi: 10.1126/science.1203980
- Meyer JR & Shew HD (1991). Soils supressive to Black Root Rot of Burley Tobacco caused by *Thielaviopsis basicola*. *Ecology and Epidemiology*, 81:946-954
- Mishra S, Keswani C, Abhilash PC, Fraceto LF, Singh HB (2017). Integrated Approach of Agri-nanotechnology: Challenges and Future Trends. *Frontiers in plant Science*. 8:471. doi:10.3389/fpls.2017.00471
- Nejat N *et al.*, 2016. Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2): 229-237.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 482.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- Nuñez AMP, Rodríguez GAA, Monteiro FP, Faria AF, Silva JCP, Monteiro ACA, ... Medeiros FHV (2018). Bio-based products control black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) and increase the nutraceutical and antioxidant components in kale. *Scientific Reports*, 8:10199. doi.org/10.1038/s41598-018-28086-6
- Oliveira DF (2018). Phytochemistry, organic synthesis and computational chemistry: development of new products to control phytopathogens. In: *Biotecnologia aplicada à fitopatologia*. Org: Souza JT et al., NEFIT, Universidade Federal de Lavras, 2018.
- Parisi C, Tillie P, Rodríguez-Cerezo E. (2016). The global pipeline of GM crops out to 2020. *Nature biotechnology*, 34(1), 31.
- Peiffer JA & Ley RE (2013) Exploring the maize rhizosphere microbiome in the field: A glimpse into a highly complex system. *Communicative & Integrative Biology*, 6: e25177. doi. org/104161/cib25177
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS*, 110:6548-53. doi: 10.1073/pnas.1302837110
- Peyraud R *et al.* 2017. Advances on plant–pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. *The Plant Journal*, 90(4): 720-737.
- Pineda A, Kaplan I, Bezemer TM (2017). Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. *Trends in Plant Science*, 22:770-778. doi: 10.1016/j.tplants.2017.07.002

- Ramalho MAP, Furtini IV (2015). Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites. *Ceres*, 56(4).
- Ray M, Ray A, Dash S, Mishra A, Achary KG, Nayak S, Singh S (2017). Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87:708-723. doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.032
- Ribeiro M. (2014). *Sistema de Alerta: ferramenta para auxiliar no controle de doenças da videira*. Embrapa Semiárido. Recuperado em 19 outubro, 2018, de <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1904464/sistema-de-alerta-ferramenta-para-auxiliar-no-controle-de-doencas-da-videira>
- Russell PE (1995). Fungicide resistance: occurrence and management. *The Journal of Agricultural Science*, 124:317-323. doi.org/10.1017/S0021859600073275
- Salles Filho SLM, Bonacelli MBM, Mello DL (2001). Estudos em Biotecnologia: Instrumentos de apoio à definição de políticas embiotecnologia. In *Estudos em Biotecnologia: Instrumentos de apoio à definição de políticas embiotecnologia*.
- Santos V, Barbedo J (2017). Aplicativo para captura de imagens de doenças em plantas. In *Embrapa Informática Agropecuária-Artigo em anais de congresso (Alice)*. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica 11., 2017, Campinas. Anais...[sl: sn].
- Santos-Medellín C, Edwards J, Liechty Z, Nguyen B, Sundaresan V (2017). Drought Stress Results in a Compartment-Specific Restructuring of the Rice Root-Associated Microbiomes. *mBio*, 8: e00764-17. doi: 10.1128/mBio.00764-17
- Silva JCP, Campos VP, Barros AF, Pedroso MP, Terra WC, Lopez LE, Souza JT (2018). Plant volatiles reduce the viability of the root-knot nematode either directly or when retained in water. *Plant disease*, Pdis-01-18-0143-00. doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0143-RE
- Silveira JMFJ, Borges IC, Buainain AM (2005). Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. *São Paulo em perspectiva*, 19:101-114. doi.org/10.1590/S0102-88392005000200009
- Sousa HL (2017). *Sensoriamento remoto com VANTs: uma nova possibilidade para a aquisição de geoinformações*. *Revista Brasileira de Geomática*, Apucarã, v. 5, n. 3, p. 326–342. doi: 10.3895/rbgeo.v5n3.5511.
- Stangarlin JR, Kuhn OJ, Assil L, Schwan-Estrada KRF (2011) Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi In: MéndezVilas, A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz: Formatex. p. 1033-1042
- Staub T (1991). Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annualreview of Phytopathology*, 29:421-442. doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002225
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203(1), 32-43. doi.org/10.1111/nph.12797
- Tennant P, Fermin G, Fitch MM, Manshardt RM, Slightom JL, Gonsalves D (2001). Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology*, 107(6), 645-653. doi.org/10.1023/A:1017936226557
- Turrini A, Sbrana C, Giovannetti M (2015). Belowground environmental effects of transgenic

- crops: a soil microbial perspective. *Research in microbiology*, 166:121-131. doi.org/10.1016/j.resmic.2015.02.006
- Van de Wiel CCM, Schaart JG, Lotz LAP, Smulders MJM (2017). New traits in crops produced by genome editing techniques based on deletions. *Plant Biotechnol Rep*, 11:1-8. doi: 10.1007/s11816-017-0425-z
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot*, 64:1263-1280. doi: 10.1093/jxb/ert026
- Waltz E (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature News*, 532(7599), 293.
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, ... , Zhao K (2016). Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. *PloS one*, 11: e0154027. doi.org/10.1371/journal.pone.0154027
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology*, 32:947-951. doi: 10.1038/nbt.2969
- Yang Y, Jittayasothorn Y, Chronis D, Wang X, Cousins P, Zhong GY (2013). Molecular characteristics and efficacy of 16D10 siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. *PloS one*, 8: e69463. doi: 10.1371/journal.pone.0069463
- Zhang M & Coaker G (2017). Harnessing effector-triggered immunity for durable disease resistance. *Phytopathology*, 107:912-919. doi: 10.1094/PHYTO-03-17-0086-RVW
- Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D (2017). Simultaneous modification of three homoeologs of Ta EDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *The Plant Journal*, 91:714-724. doi: 10.1111/tpj.13599

Ferrugem-asiática da soja: estudos sobre sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas

Louise Larissa May De Mio
Ana Cláudia Klosowski
Mônica Anghinoni Müller

1. Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, representando um terço da produção mundial desta *commoditie*. A ferrugem-asiática da soja (FAS), causada por *Phakopsora pachyrhizi*, é a principal doença da cultura da soja no Brasil desde a sua detecção. Sua importância está associada ao potencial de dano que ela pode causar devido à desfolha precoce que interfere diretamente na formação e enchimento dos grãos. O controle da doença está baseado principalmente no vazio sanitário e no uso de fungicidas, sendo o primeiro para reduzir o inóculo primário e o segundo para minimizar a disseminação secundária da doença dentro da área. Os fungicidas de ação em sítio específico pertencentes a diferentes grupos químicos (IDMs, IQes e ISDHs) vêm tendo sua eficiência reduzida ao longo do tempo. Devido a isso, fungicidas multissítios têm sido incorporados ao manejo na tentativa de garantir um controle mais eficiente. Além disso, corrobora como medida anti-resistência associada à rotação de grupos químicos. Este capítulo mostra resultados de pesquisa brasileiras e internacionais sobre as detecções das populações e isolados com mutações ou baixa sensibilidade aos diferentes grupos de modo de ação específicos, bem como estudos de adaptabilidade, competição e resistência múltipla. O impacto destes estudos com indicações e limitações para o manejo da doença serão discutidos.

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor de Ciências Agrárias, Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID). Rua dos Funcionários 1540, CEP 80.035-050. Curitiba - Paraná – Brasil.

2. A cultura da soja e a importância da ferrugem-asiática da soja

O Brasil é um grande produtor de grãos, colhendo em 2017 232 milhões de toneladas. A soja (*Glycine max* (L.) Merr) representa uma grande parcela deste montante, qualificando o país como segundo maior produtor mundial do grão (FAO, 2018). Sua importância está relacionada às diversas finalidades dos seus produtos e subprodutos, que incluem a alimentação humana e animal e a produção de biodiesel (Hirakuri & Lazzarotto, 2014). O Brasil tem uma área plantada de 35.151,4 mil hectares e, na safra 2017-2018, alcançou a produção recorde de 118.885,8 mil / toneladas, 4,2% superior àquela obtida na safra anterior. Os principais estados produtores são o estado do Mato Grosso (área de 9.518,6 mil hectares e produção de 32.306,1 mil toneladas) seguido pelo estado do Paraná (área de 5.464,8 mil hectares e produção de 19.170,5 mil toneladas) (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento, 2018) (Figura 1).

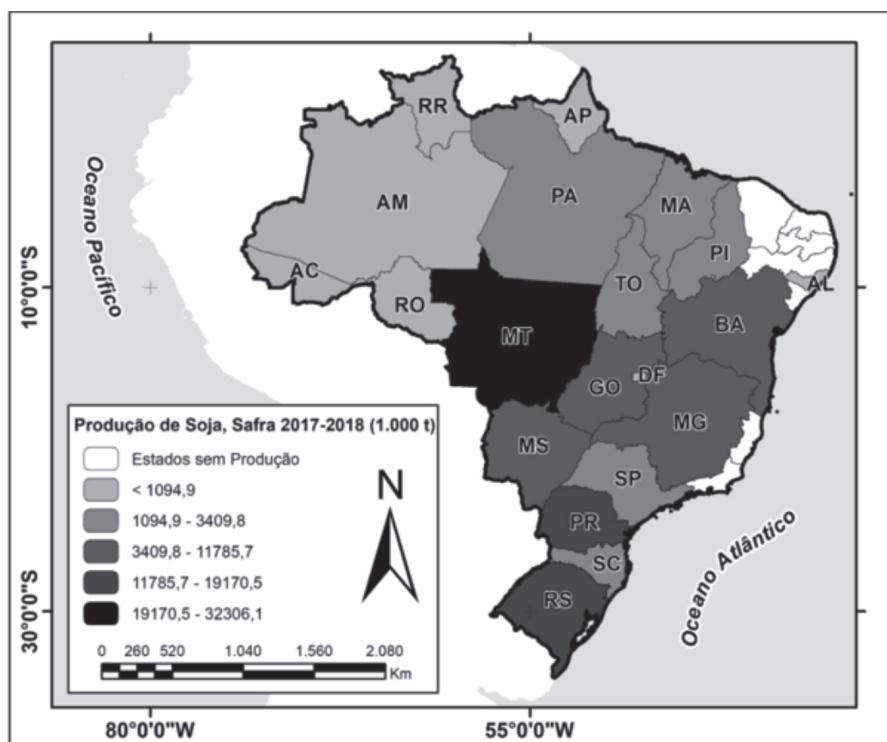


FIGURA 1. Distribuição da produção de soja no Brasil por estados (siglas) na safra de 2017-2018. Adaptado por Felipe Jauchde: CONAB, 2018.

As condições climáticas das regiões produtoras no Brasil são propícias para altas produtividades, em contraponto, são também favoráveis ao desenvolvimento de doenças. A ferrugem-asiática da soja (FAS), causada pelo patógeno *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd., é a principal doença foliar da soja no Brasil e pode causar danos de até 80% na produção quando medidas de controle não são aplicadas (Bromfield, 1984; Hartman et al., 1991; Yang et al., 1991). Em estágios avançados da doença ocorre a desfolha precoce, impedindo a plena formação de grãos e causando perda no rendimento e na qualidade do produto (Reiset et al., 2006). A FAS é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento (Del Ponte et al., 2006).

O urediniósporo de *P. pachyrhizi* pode germinar entre uma e seis horas sob condições ótimas de molhamento e temperaturas variando de 8 a 30°C, sendo as mais favoráveis de 15 a 25°C (Alves et al., 2006). Temperaturas constantes maiores ou iguais a 35 °C impedem a colonização de *P. pachyrhizi*, mesmo se o processo de infecção for iniciado em temperaturas ideais (Alves, 2007). Sob condições adequadas, os urediniósporos germinam e penetram após a deposição, diretamente na epiderme da folha, ao contrário da maioria das outras ferrugens, que penetram através de aberturas estomatais (Figura 2) (Magnani et al., 2007). Em trabalho desenvolvido no Brasil com populações, o período de incubação da doença foi de 6 dias e o período de latência, de 6 a 12 dias, quando ocorre a produção de urediniósporos (Zambenedetti et al., 2007). Com isolados monourediniais a variação do período de latência foi de 8 a 11 dias e o período de incubação foi de 7 dias (Klosowski et al., 2018).

Após sobreviver na entressafra, principalmente em plantas de soja espontâneas originadas dos grãos perdidos na colheita, a dispersão do inóculo ocorre pelo vento e por meio de pessoas que podem transportar urediniósporos nas roupas (Isard et al., 2005; Hartman & Haudenschild, 2009). O inóculo primário em uma lavoura de soja é o principal fator associado a epidemias, sendo que a sua chegada precoce está associada à maior gravidade da epidemia e maiores dificuldades no controle. Este inóculo é constituído basicamente por urediniósporos de *P. pachyrhizi* e outras espécies hospedeiras e de plantas de soja espontâneas. Embora teliosporos do fungo tenham sido observados na Ásia em vários hospedeiros, incluindo a soja, sua germinação nunca foi relatada no campo (Bromfield, 1984). Sua formação é rara em regiões tropicais, onde não há temperatura favorável, em torno de 10 °C (Bromfield, 1984).

A FAS foi relatada pela primeira vez no Japão em 1902, onde o patógeno foi considerado endêmico (Kitani & Inoue, 1960). A doença causa severos danos na região de clima tropical e subtropical na Ásia, que equivale ao sul da China, onde a soja é pouco plantada (Tan et al., 1996). A FAS foi encontrada na América do Sul na safra de 2000-2001 no Paraguai, em seguida foi relatada no Brasil após o término da safra, ainda no ano de 2001, e na Argentina no ano de 2002, se mostrando altamente agressiva e se tornando uma das principais doenças foliares da soja (Yorinori et al., 2005).

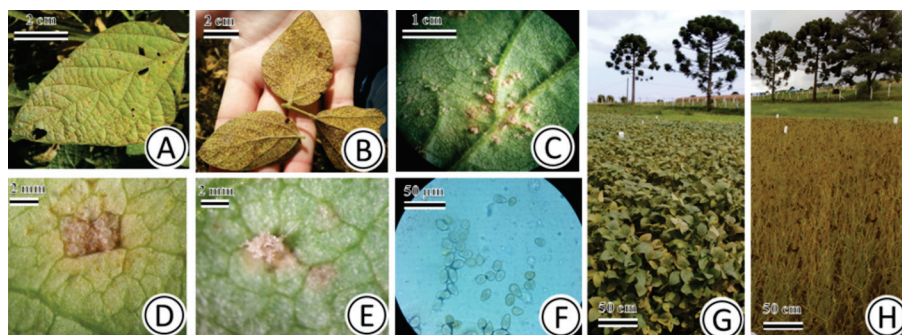


FIGURA 2. Sintomas (A) e sinais (B) da ferrugem-asiática da soja (*Glycinemax*), causada por *Phakopsorapachyrhizi*; urédias iniciando a liberação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em folha de soja, visualizadas sob microscópio estereoscópico com aumento de 40x (C); urediniósporos hialinos de *P. pachyrhizi* em folha de soja com sintomas de ferrugem-asiática, visualizados sob microscópio estereoscópico com aumento de 40x (D) e 20x (E); urediniósporos de *P. pachyrhizi* observados em microscópio de luz com objetiva de aumento de 10x (F) plantas de soja atacado por ferrugem-asiática da soja (G); Desfolha precoce causada por ferrugem-asiática da soja (H).

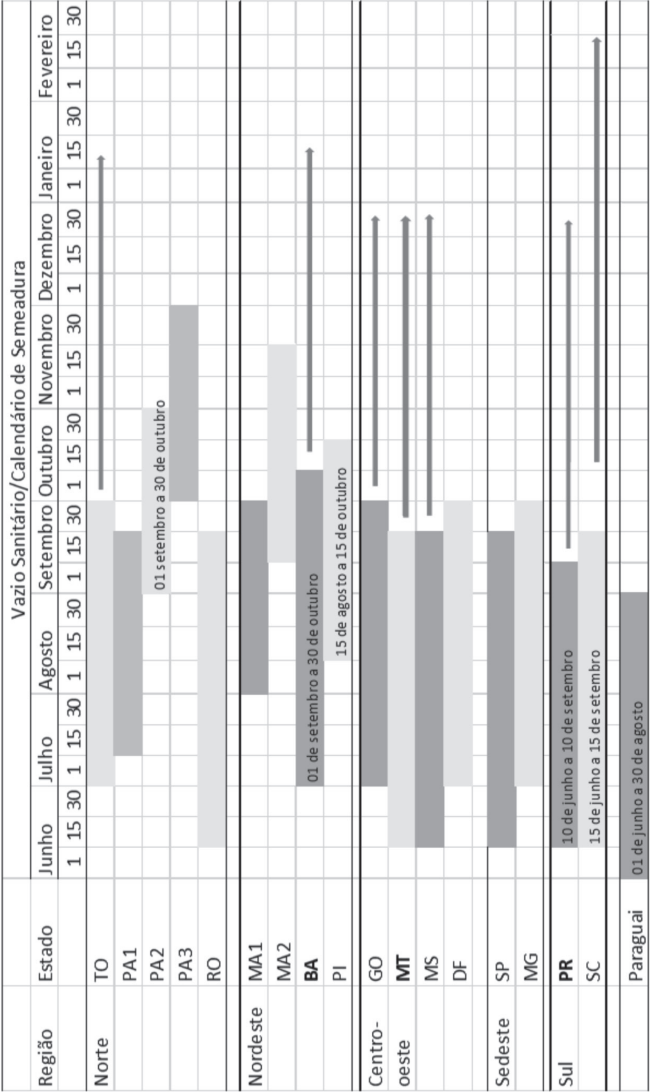
A ferrugem está presente em todos os estados brasileiros produtores de soja. Além disso, a doença ocorre em todos os países produtores de soja no mundo, em regiões com condições climáticas diversas, incluindo climas tropical, subtropical e temperado, em diferentes continentes (Li et al., 2010). Os maiores danos na produção ocasionados pela doença são observados na América do Sul, onde a soja é a cultura que ocupa a maior área plantada e a ausência de um inverno rigoroso permite que o inóculo sobreviva na entressafra, em plantas vivas cultivadas ou plantas espontâneas, favorecendo a ocorrência da doença na safra da soja (Li et al., 2010).

O nível de dano causado pela FAS depende do momento em que ela ocorre no ciclo da soja, das condições climáticas, do nível de resistência ou tolerância e ciclo da cultivar utilizada. Foram relatados danos de até 80% da produção em situações em que medidas de controle não foram aplicadas (Bromfield, 1984; Hartman et al., 1991; Yang et al., 1991). No Brasil, danos de até 75% da produção foram relatados na safra de 2003-2004, na região central do país, onde as condições climáticas são altamente favoráveis para o desenvolvimento da doença (Yorinori et al., 2005). Dalla Lana et al. (2015) demonstraram que uma redução de 60 kg/ha, considerando uma produtividade esperada de 3.000 kg/ha, pode estar associada a severidades baixas, tais como 3%.

Medidas de controle da FAS estão baseadas no controle químico, no manejo de fontes de inóculo, como o vazio sanitário, e em práticas de manejo cultural. O vazio sanitário é uma medida legislativa adotada pelas Secretarias de Agricultura de vários estados brasileiros que determina a erradicação de plantas vivas de soja

no período de 60 a 90 dias, para evitar a sobrevivência do fungo *P. pachyrhizi* no hospedeiro durante a entressafra (Seixas & Godoy, 2007). O período pode variar conforme o estado, respeitando-se as particularidades ambientais para o cultivo de soja, como pode ser observado na Tabela 1. Outra medida legislativa adotada recentemente por alguns estados produtores é a chamada calendarização do plantio da soja, por meio da qual se limita a época de plantio da cultura visando eliminar a soja de segunda época, também chamada de safrinha de soja. Essa medida visa diminuir o número de aplicações de fungicidas e, consequentemente, diminuir o risco de exposição dos produtos e a pressão de seleção de isolados com menor sensibilidade, pois a pressão da doença em plantios tardios é consideravelmente maior devido ao aumento de inóculo na safra de verão. Além disso, tem-se recomendado medidas de manejo cultural que visam à fuga da época mais favorável ao desenvolvimento da doença, como o uso de cultivares de ciclo precoce e o plantio antecipado, no início do período recomendado (Yorinori et al., 2004; Reis et al., 2006). Os principais genes de resistência à ferrugem foram incorporados em cultivares por meio de melhoramento genético, mas essa é uma medida que deve ser adotada com cautela, devido à variabilidade genética do patógeno, que já foi relatada em vários estudos (Freire et al., 2008, Tschurtschenthaler et al., 2012; Jorge et al., 2015; Rocha et al., 2015). Portanto, o uso de cultivares resistentes é recomendado associado com o controle químico, visando preservar a eficácia dos genes de resistência. A resistência genética é do tipo incompleta, não torna a planta imune mas retarda o avanço da doença no campo, pois limita o crescimento e reprodução do fungo nas folhas de soja (Childs et al., 2018). Como medidas complementares, é importante realizar a eliminação de plantas de soja voluntárias na entressafra e de espécies hospedeiras e executar o monitoramento da lavoura desde o início do plantio.

TABELA 1. Vazio sanitário indicado para diferentes estados da Federação (barras) e a calendarização de semeadura da cultura da soja (setas) no Brasil, 2018.



PA (1): Microrregiões de Conceição do Araguaia, Redenção, Marabá, São Feliz do Xingu, Parauapebas, Itaituba (com excessados municípios de Rurópolis e Trairão), e Altamira (Distritos de Castelo dos Sonhos e Cachoeira da Serra). PA (2): Microrregiões de Paragominas, Bragançinha, Guamã, Tomé-Açu, Salgado, Tucuruí, Castanhal, Arari, Belém, Cametá, Furos de Breves e de Portel. PA (3): Microrregiões de Santarém, Almeirim, Óbidos, Itaituba (municípios de Rurópolis e Trairão) e de Altamira (com excessão dos Distritos de Castelo de Sonhos e Cachoeira da Serra). MA (1): Microrregiões de Alto Mearim, Grajaú, Balsas, Imperatriz e Porto Franco. MA (2): Microrregiões de Baixada Maranhense, Caxias, Chapadinha, Codó, Coelho Neto, Gurupi, Itapecuru Mirim, Pindaré, Presidente Dutra, Rosário, Paço do Lumiar, Raposa, São José de Ribamar, São Luís. Fonte: Adaptado da Embrapa (<https://www.embrapa.br/soja/ferrugem/vaziosanitariocalendarizacao>).

Embora a utilização de fungicidas não se constitua na única medida de controle para a ferrugem da soja, esta ainda tem sido a prática mais realizada, auxiliando, desta forma, na manutenção da produtividade da cultura. Diante do risco de danos que a ferrugem representa, o produtor deve realizar aplicações de fungicidas no início do aparecimento dos sintomas ou preventivamente, levando em conta a presença do fungo na região, idade da planta e condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da doença, além de considerar a logística da aplicação, presença de outras doenças e o custo do controle, evitando aplicações em alta pressão da doença e rotacionando produtos com diferentes modos de ação (Godoy et al., 2017). A média do número de aplicações de fungicidas difere de acordo com a época de plantio da soja, que determina a intensidade da doença, sendo de aproximadamente duas aplicações para plantios no início da época recomendada, quatro aplicações para plantios tardios e seis aplicações para plantios de soja de segunda safra (Godoy et al., 2016). A Tabela 2 mostra uma evolução no controle químico da FAS; ao longo das safras, ampliou-se o número de grupos de fungicidas utilizados e reduziu-se os intervalos de aplicação, antecipando os estádios para primeira aplicação. A eficácia dos fungicidas mais comumente utilizados e de compostos em fase de registro é avaliada em uma rede de ensaios coordenada pela EMBRAPA SOJA, Tagro Tecnologia Agropecuária Ltda (empresa de pesquisa privada) e Universidade de Rio Verde (Universidade Estadual no Estado de Goiás), desde a safra de 2003-2004. A perda da eficiência dos fungicidas dos principais grupos (IDMs, IQes e ISDHs) no controle da FAS já foi relatada (Godoy et al., 2015; Godoy et al., 2016; Godoy et al., 2017), e está associada à menor sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos fungicidas, já confirmada em trabalhos realizados com isolados do Brasil (Schmitz et al., 2014; Klosowski et al., 2016; Simões et al., 2017), possivelmente relacionada à intensa utilização de produtos do mesmo grupo químico, com o mesmo modo de ação, sob condições de alta pressão da doença.

TABELA 2. Fases do controle químico da ferrugem asiática da soja entre 2003 – 2018 relacionados a relatos de resistência e redução de eficiência em campo.

Fases	Grupos Fungicidas registrados	Número de aplicações	Estádio inicial de controle	Intervalo em dias	Relato de resistência ^x	Redução de eficiência
I	IDMs e IQes	2 a 3	pós-florescimento	21-28	IDMs 2009/10 (Schmitz et al. 2014)	2007
II	IDMs e IQes	4 a 5	início florescimento	15-20	IQes 2012/13 (Kłosowski et al. 2016)	2011
III	IDMs* IQes ISDH	4 a 5	pré-fechamento	15	ISDH 2015/16 (Simões et al. 2017)	2015
IV	IDMs* IQes ISDH Protetores	4 a 6	V6-V8	15	Resistência Múltipla (Müller et al. 2018)	2017

*Triazóis e triazolinonas. IDMs – inibidores da desmetilação, IQes – Inibidores da quinona externa, ISDH – Inibidores da succinatodesidrogenase.

Fonte: Adaptado de departamento de Agronomia Dupont Pioneer (<http://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/193/o-comportamento-da-ferrugem-asiatica-na-soja-ao-longo-dos-anos-dificuldades-de-controle-e-seus-custos>).

Os fungicidas historicamente aplicados são do grupo dos inibidores da desmetilação (IDMs), representado pelos triazóis, e dos inibidores da quinona externa (IQes), também chamados de estrobilurinas, de forma isolada ou em mistura. Até 2015 mais de 99% dos fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da FAS no Brasil incluíam moléculas de um destes dois grupos ou de ambos (MAPA, 2015). No decorrer dos anos este cenário mudou, a eficiência desta combinação caiu e novos ingredientes ativos necessitaram ser incorporados no manejo, ao mesmo tempo que ocorreu a retirada de produtos comerciais ineficientes do mercado. Na busca por diferentes moléculas, foi incorporado um ingrediente ativo pertencente ao subgrupo triazolintionas (protioconazole), do grupo dos IDMs e, na sequência, as carboxamidas, pertencentes ao grupo dos inibidores de succinato desidrogenase (ISDHs), com o lançamento do princípio ativo fluxapiroxade em 2013 e do benzovindiflupir em 2014 (Godoy et al., 2017).

Atualmente aproximadamente 60% dos produtos comerciais possuem triazóis (IDMs) e estrobilurinas (IQes). As carboxamidas, incluídas em 2013, estão presentes em 18% dos produtos comerciais, muitas vezes em misturas triplas com triazóis e estrobilurinas. Os produtos protetores, indicados no manejo anti-resistência, estão presentes em aproximadamente 50% dos produtos comerciais registrados para ferrugem-asiática da soja (MAPA, 2018).

A seguir serão abordados estudos sobre resistência e monitoramento da sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas considerando dados da literatura nacional e internacional e pesquisas associadas ao grupo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), do laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID).

3. Sensibilidade alterada ao longo dos anos em relação à eficiência de fungicidas

A FAS tem sido monitorada em relação à eficiência dos fungicidas registrados, além de produtos em fase de registro, ao longo dos últimos anos por uma grande equipe formada por pesquisadores de diferentes regiões produtoras de soja no Brasil (Godoy et al., 2018). Os dados coletados envolvem fungicidas dos diferentes grupos e tem mostrado mudança de comportamento em relação à eficiência no controle da doença em campo (Figura 3).

A resistência a fungicidas é definida como uma alteração herdável e estável de um fungo em resposta a aplicação de um fungicida, resultando na redução da sensibilidade do mesmo a um produto (Brent & Hollomon, 2007a). A resistência pode ser induzida de forma artificial em laboratório ou pode ocorrer de forma natural nas populações do patógeno no campo. Nos casos em que a resistência de campo resulta em perda de eficiência dos fungicidas para o controle da doença, denomina-se como resistência prática (Brent & Hollomon, 2007a).

O surgimento de isolados com menor sensibilidade aos fungicidas é explicado por eventos genéticos de mutação e de seleção. Mutações espontâneas podem ocorrer

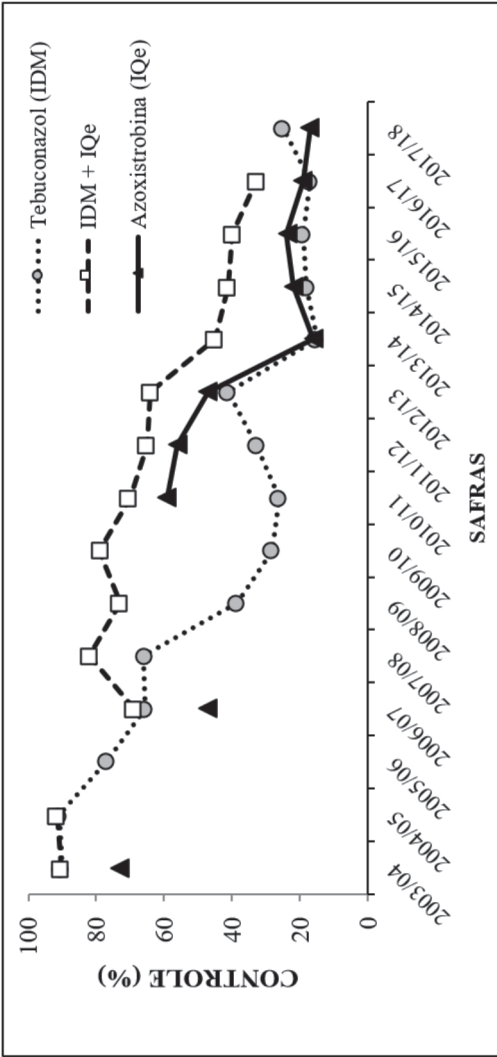


FIGURA 3. Porcentagem de controle da ferrugem-asiática da soja nos ensaios cooperativos ao longo de 15 safras (Godoy et al., 2018).

em alguns isolados de uma população, tornando-os resistentes a um determinado produto, o qual selecionará estes isolados resistentes, resultando no aumento da frequência dos mesmos dentro da população (Dekker, 1995; Ghini & Kimati, 2000). A seleção dos isolados resistentes e o aumento da sua frequência de forma significativa estão relacionados ao uso inadequado dos fungicidas, como o uso repetido de um mesmo produto ou o uso de diferentes fungicidas com mecanismo de ação em comum, além da utilização de doses diferentes da recomendada, sejam elas sub ou sobredoses, do uso do produto de forma curativa, dentre outros fatores que favorecem a seleção de indivíduos resistentes (Ghini & Kimati, 2000; Brent & Hollomon, 2007a; Brent & Hollomon, 2007b).

Existem vários mecanismos genéticos e bioquímicos que podem levar ao surgimento de resistência dos fungos aos fungicidas, dentre eles a alteração do sítio alvo devido à mutação no gene que o codifica; a redução da absorção ou aumento do efluxo do produto; a detoxificação da molécula; a falta de conversão para o composto ativo; a compensação por meio do aumento da produção da enzima alvo; o desenvolvimento de vias metabólicas alternativas que não incluem o sítio alvo do fungicida, dentre outros (Leroux et al., 2002; Yamaguchi & Fujimura, 2005; Brent & Hollomon, 2007a). Segundo Brent e Hollomon (2007a), o mecanismo mais comum de resistência é a alteração do sítio alvo dos fungicidas, ocasionada por mutações no gene que codifica a proteína alvo. Isso explica a razão da resistência ser um problema para os fungicidas modernos, também chamados sítio-específicos. Enquanto fungicidas antigos, de ação multi-sítio, agem inibindo enzimas em geral atuando em diversos mecanismos bioquímicos do fungo, os fungicidas de ação sítio-específica agem primariamente em um único sítio alvo e uma única mutação no gene respectivo pode alterar esse sítio, tornando-o menos sensível ou não sensível ao fungicida.

A resistência de patógenos a fungicidas pode ser avaliada e monitorada por meio de diferentes métodos. De acordo com Russel (2004), testes *in vitro* podem ser utilizados para parasitas obrigatórios e não obrigatórios. Normalmente, utiliza-se meio de cultura sólido com adição de diferentes concentrações do fungicida e se avalia a porcentagem de inibição do crescimento em relação ao meio sem fungicida. Para os parasitas obrigatórios, o método se restringe à avaliação da germinação de esporos. Testes *ex vivo* são desenvolvidos para patógenos e/ou moléculas que possuem propriedades que tornam o teste *in vitro* inadequado. Estes testes podem ser realizados em partes destacadas da planta, especialmente folhas, e suas avaliações normalmente estão baseadas no controle da doença expresso pelo desenvolvimento de lesões e/ou produção de esporos nas lesões.

O parâmetro de avaliação geralmente utilizado em ambos os métodos é a CE_{50} (concentração efetiva), utilizado para expressar o grau de toxicidade de uma substância, que representa a concentração de um composto químico onde 50% de seu efeito máximo é observado (Oga, 2008). Se a CE_{50} de um fungicida, ao longo do tempo, apresentar alteração para valores superiores aos inicialmente estabelecidos,

visando ao controle de um determinado patógeno, poderá indicar redução na sensibilidade àquele fungicida (Reis et al., 2007).

4. Estudos de alterações na sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos IDMS

A resistência aos IDMS é denominada de resistência quantitativa ou contínua, porque ela se manifesta gradualmente, de forma parcial e variável em grau. Dessa forma, uma população com condição menos sensível pode ser revertida para mais sensível se o fungicida for usado de forma menos intensa ou se fungicidas alternativos forem utilizados para o controle da doença (Brent & Hollomon, 2007a).

Relacionado a esta característica, evidências bioquímicas indicam que a resistência aos IDMS é poligênica, envolvendo pelo menos quatro mecanismos. Em estudos com *Candida albicans*, um patógeno humano que é referência nos estudos da resistência aos IDMS, foram encontradas diferentes mutações no mesmo gene alvo em um único isolado, e seus efeitos podem ser aditivos ou possivelmente sinérgicos (Sanglard et al., 1998).

A perda de sensibilidade aos IDMS tem sido relatada há muitos anos para vários fitopatógenos, dentre eles *Botrytis cinerea*, *Uncinula necator*, *Venturia inaequalis*, *Erysiphe graminis*, *Cercospora beticola*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum cereale*, *Podosphaera aphanis* e *Monilinia fructicola* (Stehmann & Waard., 1996; Délye et al., 1997; Köller et al., 1997; Délye et al., 1998; Karaoglanidis et al., 2000; Stammler et al., 2008a; Wong & Midland, 2007; Sombardier et al., 2010; May De Mio et al., 2011).

O primeiro trabalho sobre sensibilidade de isolados de *P. pachyrhizi* aos IDMS foi desenvolvido no Brasil, onde foi observada oscilação nos valores de CE₅₀ para os fungicidas ciproconazol, metconazol, tebuconazol e prothioconazol, variando de 0,02 a 3,89 ppm, sendo considerada uma resposta normal a partir de diferentes genótipos que constituem populações de diversas regiões do Brasil (Koga et al., 2011). Somente em 2014 foi relatada a perda de sensibilidade de isolados de *P. pachyrhizi* da safra de 2009-2010 aos IDMS, associada a mutações no gene da enzima 14- α -desmetilase dependente do citocromo P450 (*CYP51*), um gene nuclear que codifica para a proteína alvo do fungicida (Schmitz et al., 2014). Neste trabalho, foram detectadas mutações em diferentes pontos do gene *CYP51*, sendo elas: substituição de fenilalanina por leucina no códon 120, tirosina por histidina/fenilalanina no códon 131, lisina por arginina na posição 142, isoleucina por fenilalanina no códon 145 e isoleucina por treonina na posição 475 (Schmitz et al., 2014).

O mecanismo de ação dos IDMS envolve a inibição da desmetilação do carbono 14- α do lanosterol ou 24-metileno dihidrolanosterol (eburicol), que são substratos para a enzima 14- α -desmetilase dependente do citocromo P450 na biossíntese de esteróis como ergosterol, prejudicando a síntese deste na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (Gisi et al., 2000).

Os resultados do grupo da UFPR laboratório LEMID estão baseados no artigo já publicado (Klosowski et al., 2018). Isolados de *P. pachyrhizi* foram coletados nas safras 2012-2013 e 2013-2014 em campos de produção de soja orgânica (sem aplicação de fungicidas dos grupos dos IDMs, IQes e ISDHs) e campos de produção de soja convencional, com aplicação de fungicidas do grupo dos IDMs e dos IQes. Foram realizados testes de sensibilidade ao tebuconazol seguidos do cálculo da CE_{50} e, em seguida, os isolados foram submetidos à análise molecular para investigação de mutações no gene *CYP51*.

Em geral, os isolados provenientes do sistema de produção convencional apresentaram CE_{50} maior quando comparados com os isolados do sistema orgânico (Fig.4) e, na segunda safra, 60% dos isolados do sistema convencional apresentaram CE_{50} superior a $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que todos os isolados do sistema orgânico apresentaram valores inferiores a $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Usando a classificação de Schmitz et al. (2014) para a sensibilidade de isolados de *P. pachyrhizi* baseada nos valores de CE_{50} , que está ilustrada na Figura 4, temos que, na primeira safra, 60% e 40% são considerados isolados sensíveis no sistema orgânico e convencional, respectivamente, 40% e 40% foram considerados sensíveis a moderadamente resistentes, 0% e 20% foram considerados moderada a altamente resistentes. Já na segunda safra, as proporções para o sistema orgânico e convencional foram de 40% e 0% de isolados sensíveis, 20% e 20% de isolados sensíveis a moderadamente resistentes, 40% e 20% de isolados moderada a altamente resistentes e 0% e 60% de isolados altamente resistentes (Fig. 4). No mesmo trabalho conduzido na Alemanha com isolados brasileiros, um isolado do ano de 2004 foi considerado como a referência altamente sensível, tendo uma CE_{50} de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sendo assim, dois isolados do sistema orgânico e um do sistema convencional apresentaram uma CE_{50} de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerados altamente sensíveis ao tebuconazol.

As mutações detectadas no gene *CYP51* ocorreram sempre de forma combinada, com duas ou três mutações ocorrendo no mesmo isolado. A maioria dos isolados de *P. pachyrhizi* (80%) apresentaram as mutações F120L+Y131H. Apenas um isolado testado não apresentou mutações no gene *CYP51*, sendo considerado tipo selvagem para esse gene, três apresentaram as mutações Y131F+I475T e dois isolados apresentaram uma combinação de três mutações no gene *CYP51* (F120L+Y131F+I475T) (Fig. 6).

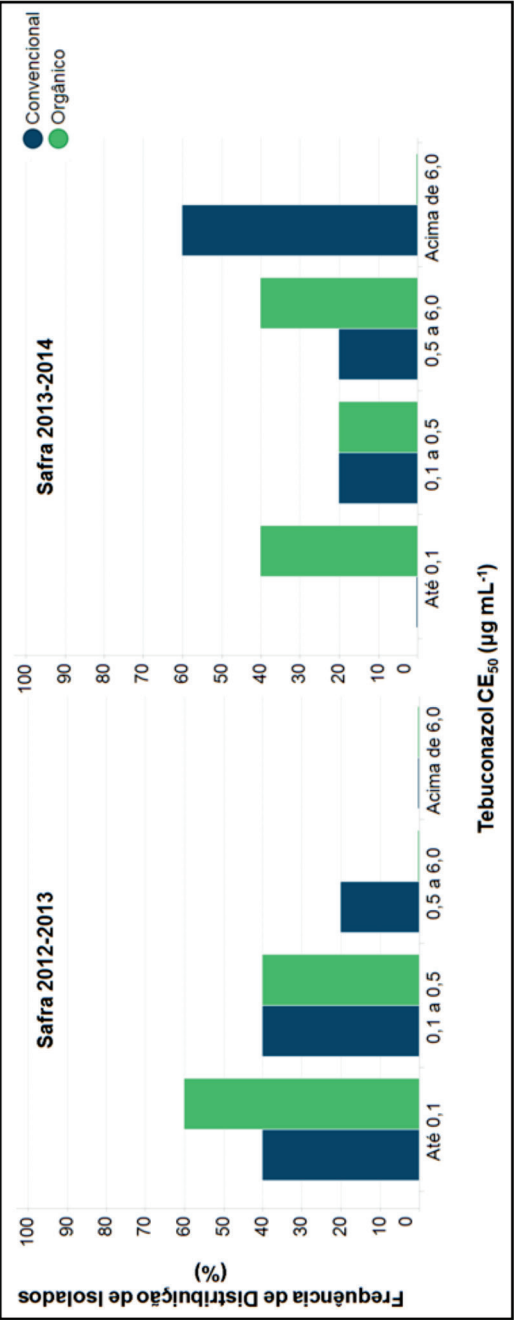


FIGURA 4. Distribuição da sensibilidade de isolados monoreduzidos de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em campos de soja (*Glycine max*) com sistema de produção orgânico e convencional de acordo com a concentração efetiva do fungicida tebuconazol que reduz a atividade da população em 50% (CE₅₀). Total de 20 isolados (10 do sistema de produção orgânico – cinco da safra 2012-2013 e cinco da safra 2013-2014; 10 do sistema de produção convencional – cinco da safra 2012-2013 e cinco da safra 2013-2014).

5. Estudos de alterações na sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos IQes

A resistência aos IQes está normalmente associada à substituição de uma glicina por uma alanina na posição 143 do gene do citocromob (*CYTB*), que está relacionada a altos níveis de resistência e, consequentemente, a menor eficiência no controle da doença (Gisi et al., 2002). Com base nessa mutação, a resistência aos IQes é denominada qualitativa ou discreta, caracterizando a ocorrência de apenas duas classes de sensibilidade, sensível e resistente. Uma vez desenvolvida, ela tende a ser estável, mesmo se o fungicida for usado de forma menos intensa. Este tipo de resistência é regulada por um gene principal, e uma mutação pontual que cause mudança em um único aminoácido da proteína alvo pode resultar em alto nível de resistência, caso da mutação G143A (Brent & Hollomon, 2007a).

Outras mutações podem ocorrer no gene *CYTB*, como F129L (substituição de fenilalanina por leucina) e G137R (substituição de glicina por arginina), ambas relacionadas a baixos níveis de resistência ou resistência quantitativa, com pequeno ou nenhum efeito na eficiência do fungicida para o controle da doença (Gisi et al., 2002; FRAC, 2006).

A análise da sequência do gene *CYTB* revelou que ferrugens, inclusive *P. pachyrhizi*, contém um íntron tipo I logo após o códon 143 e a substituição do nucleotídeo nesta posição impediria a remoção do íntron, sendo letal para o fungo (Grasso et al., 2006). Além das ferrugens, patógenos como *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Alternaria solani* e *Pyrenophora teres* também apresentam o íntron logo após o códon 143 sendo que os dois últimos desenvolveram a mutação F129L, que têm se mostrado menos efetiva com relação ao nível de resistência (Miessner & Stammler, 2010; Stammler, 2012).

O mecanismo de ação dos IQes envolve a inibição da respiração mitocondrial por meio da ligação ao sítio Qo do complexo do citocromo *bcl* (complexo III), impedindo a transferência de elétrons e, consequentemente, a produção de ATP, levando a deficiência energética nas células fúngicas. A proteína alvo dos IQes, citocromo *bcl*-ubiquinol oxidase, é codificada por um gene mitocondrial e, como os mecanismos de reparo do DNA são menos efetivos para o DNA mitocondrial em relação ao nuclear, os genes mitocondriais são mais suscetíveis a mutações (Brent & Hollomon, 2007a).

Os resultados do grupo da UFPR, laboratório LEMID, já publicados (Klosowskiet al., 2016b; 2018) avaliaram os mesmos isolados caracterizados quanto à sensibilidade ao tebuconazol, para a sensibilidade à azoxistrobina e foram também submetidos à análise de mutações no gene alvo dos IQes, o *CYTB*.

Na primeira safra, não foi possível determinar a CE_{50} da azoxistrobina para os isolados monourediniais, pois o princípio ativo inibiu 100% da germinação de esporos na 3ª ou 4ª dose testadas (0,5 ou 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), dependendo do isolado, o que impossibilitou a análise de regressão. No entanto, é possível afirmar que a CE_{50} da azoxistrobina foi menor que 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados provenientes dos campos de

soja orgânica e convencional. Na safra 2013-2014, os isolados mostraram valores de CE_{50} variando de 0,14 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e um isolado do sistema convencional mostrou valor de CE_{50} acima de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig.5).

Em um trabalho conduzido no Brasil, com populações de *P.pachyrhizi* coletadas na safra 2004-2005, o valor de CE_{50} de 0,07 foi considerado pelo autor como o valor da linha de base (“baseline”) (Blum & Reis, 2013). Portanto, foram identificados valores superiores a esse indicando que houve diminuição da sensibilidade à azoxistrobina com o passar do tempo e intensificação do uso do produto.

A mutação F129L foi a única detectada no gene *CYTB* (Fig. 6), ao passo que as mutações G143A e G137R, relatadas para outros patógenos, não foram detectadas em *P. pachyrhizi* (Klosowski et al., 2016).

A mutação F129L foi detectada em aproximadamente 60% dos isolados testados (Fig.6), sendo, em geral, mais frequente nos isolados provenientes do sistema convencional. A maioria desses isolados apresentou essa mutação no gene *CYTB*, além da mutação F120L+Y131H no gene *CYP51*, evidenciando a ocorrência da resistência múltipla dupla, ou seja, resistência aos fungicidas do grupo dos IDMs e do grupo dos IQes (Fig. 7).

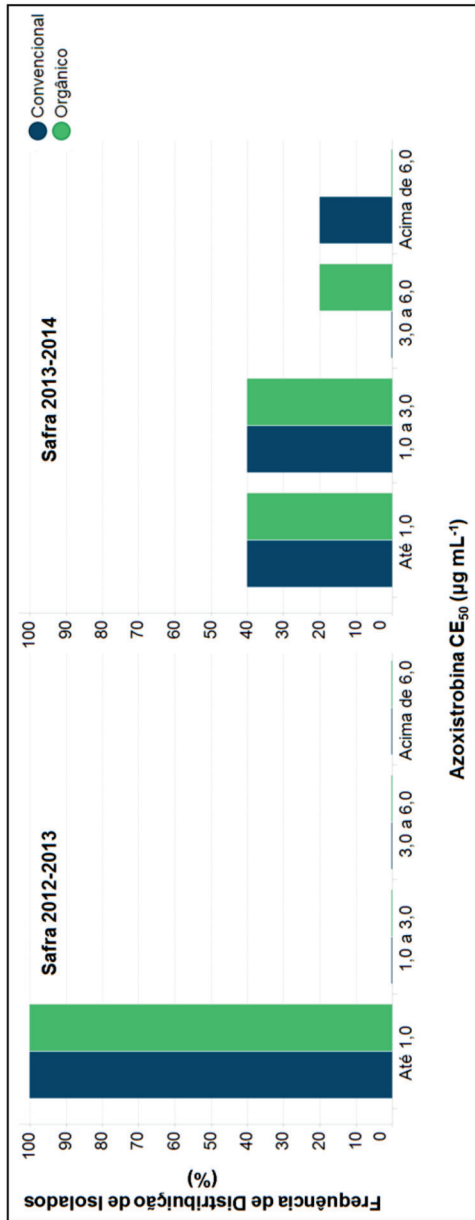


FIGURA 5. Distribuição da sensibilidade de isolados monoreduzidos de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em campos de soja (*Glycine max*) com sistema de produção orgânico e convencional de acordo com a concentração efetiva do fungicida azoxistrobina que reduz a atividade da população em 50% (CE₅₀). Total de 20 isolados (10 do sistema de produção orgânico – cinco da safra 2012-2013 e cinco da safra 2013-2014; 10 do sistema de produção convencional – cinco da safra 2012-2013 e cinco da safra 2013-2014).

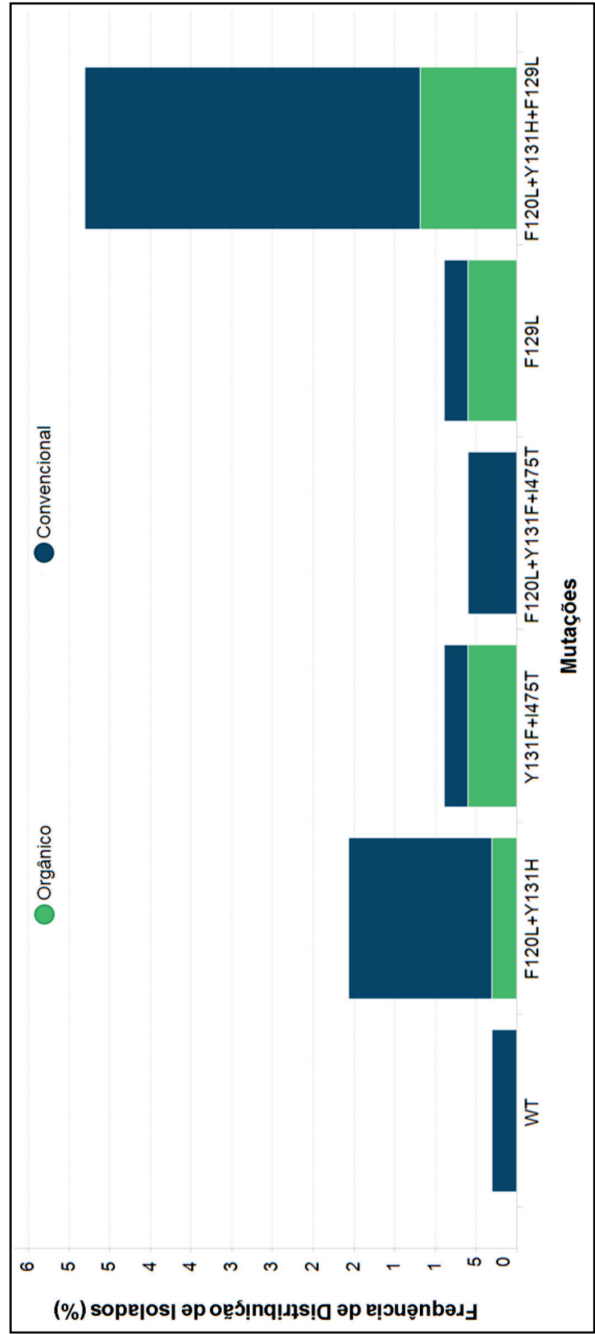


FIGURA 6. Distribuição da frequência de isolados monoreiniais de *Phakopsora pachyrhizi* coletados em campos de soja (*Glycine max*) com sistema de produção orgânico e convencional de acordo com a mutação detectada nos genes *CYP51* e *CYT8*. Total de 34 isolados (nove do sistema de produção orgânico – Paraná, Brasil; 25 do sistema de produção convencional – 12 provenientes do estado do Paraná, Brasil e 13 provenientes do estado do Mato Grosso, Brasil)
*WT=wildtype (nenhuma mutação detectada)
Mutações no gene *CYP51*: F120L; Y131H; Y131F e I475T.
Mutações no gene *CYT8*: F129L.

6. Estudos de alterações na sensibilidade de *P. pachyrhizi* aos ISDHs

A resistência aos fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (ISDHs) está associada a mutações no gene nuclear succinato desidrogenase (*SDH*) (Hägerhäll, 1997; Kuhn, 1984). O complexo SDH presente na mitocôndria é composto por quatro subunidades (A, B, C e D); as mutações que ocorrem no gene alteram as proteínas deste complexo. A estrutura tridimensional do complexo SDH revela que a subunidade A e B são expostas na parte interna da mitocôndria, chamada matriz mitocondrial, e as subunidades C e D são proteínas de membrana que ancoram o dímero AB à membrana interna das mitocôndrias (Sierotzki & Scalliet, 2013; Yankovskaya et al., 2003).

Para *P. pachyrhizi* a resistência aos fungicidas SDHI ocorre pela alteração da proteína que faz parte da subunidade C por uma mutação na posição 86 da subunidade do gene *SDH* (C-I86F), portanto a sequência de aminoácidos do gene que antes codificava a proteína isoleucina, com a mutação, irá codificar uma fenilalanina. Em outros patógenos, mutações associadas à resistência aos fungicidas SDHI ocorrem em diferentes subunidades do gene *SDH*, como nas subunidades B e D para *Alternaria solani* (Miles et al., 2014), na subunidade B para *Didymella bryoniae* (Avenot et al., 2012; Fernández-Ortuño et al., 2012), e nas subunidades B, C e D para os patógenos: *Alternaria alternata* (Avenot et al., 2008), *Botrytis cinerea* (Stammler et al., 2008; Veloukas et al., 2011; Lalève et al., 2014; Samaras et al., 2016), *Corynespora cassiicola* (Miyamoto et al., 2010), *Podosphaera xanthii* (Miyamoto et al. 2010), *Pyrenophora teres* (Stammler et al., 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (Glättli et al., 2009) e *Zymoseptoria tritici* (Skinner et al., 1998; Stammler et al., 2010; Fraaije et al., 2012; Scalliet et al., 2012).

A mutação C-I86F foi detectada em isolados de *P. pachyrhizi* na safra 2014-2015 no estado Rio Grande do Sul, apenas três safras após a introdução de fungicida inibidor da SDH no mercado, e nas safras seguintes foi detectada em diversas regiões brasileiras (Simões et al., 2017). Isolados que apresentaram a mutação C-I86F demonstraram redução na sensibilidade aos fungicidas benzovindiflupir, fluxapiroxade e bixafen, do grupo dos SDHIs, registrados para o controle da FAS (Fig.7). Entretanto, este resultado está baseado em apenas 2 isolados avaliados (Simões et al., 2017).

O mecanismo de ação dos fungicidas inibidores da succinato desidrogenase envolve a inibição da respiração mitocondrial dos fungos. Diferentemente dos IQes, os ISDHs inibem o complexo respiratório por se ligarem fortemente ao sítio de ligação da ubiquinona (Q) no complexo succinato desidrogenase (complexo II) do transporte eletrônico (Sierotzki&Scalliet, 2013). Estes processos fazem parte da cadeia respiratória e com a inibição dos mesmos não há a produção de energia na forma de ATP, essencial para o ciclo do ácido (Avenot et al., 2012; Horsefield et al., 2006; Huang et al., 2006). Quando ocorre mutação, o fungo é capaz de realizar o processo de transporte eletrônico, mesmo na presença dos fungicidas, que têm sua eficiência reduzida.

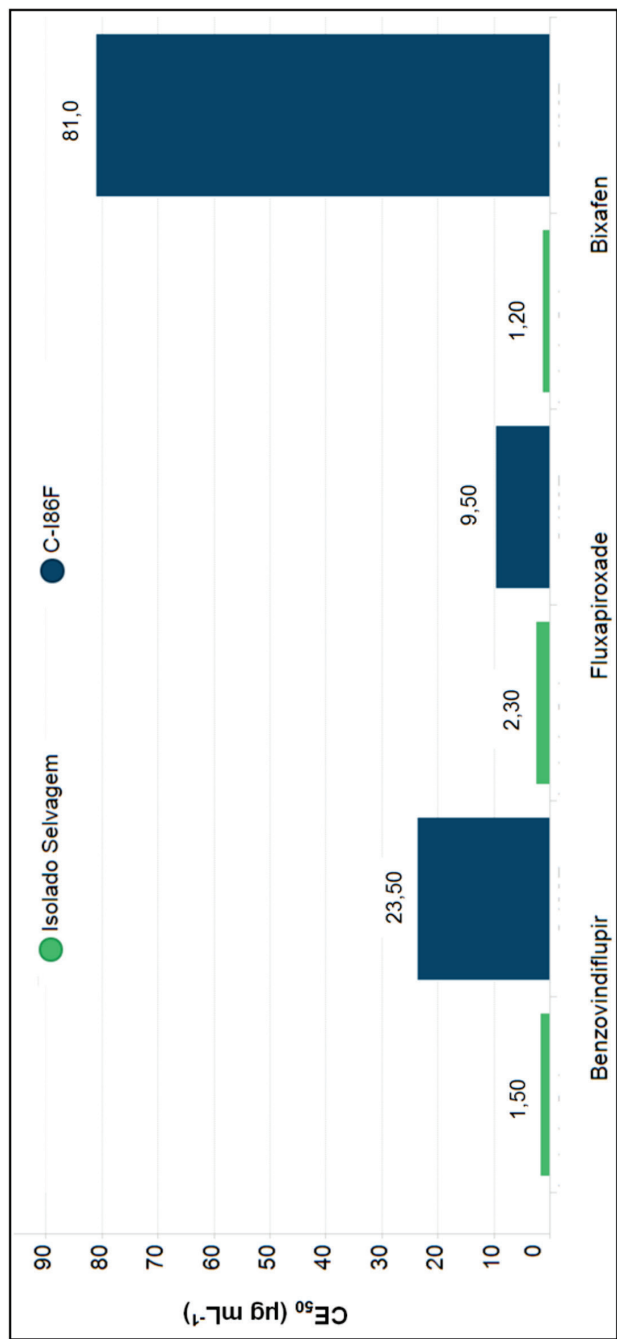


FIGURA 7. Valores médios de CE₅₀ (mg L⁻¹) para isolados selvagens e mutados no gene sdh sub unidade C (C-186F) em ensaios de folha destacada. Fonte: adaptado de Simões et al. 2017.

A redução da eficiência dos SDHIs a campo foi relatada a partir da safra 2015-2016, em monitoramento realizado por iniciativa da Embrapa e consórcio anti-ferrugem. Neste mesmo monitoramento, a eficiência do produto comercial que contém em sua formulação IQE (azoxistrobina) e SDHI (benzovindiflupir) caiu ao longo das safras (Fig. 8). Esta informação corrobora com testes realizados pelo grupo LEMID-UFPR, os quais demonstram que ao longo dos anos foi necessária maior concentração do princípio ativo benzovindiflupir para inibir 50% da FAS, conforme indicado na Figura 8. Na safra de 2016-2017, a CE_{50} aumentou consideravelmente em relação às safras anteriores, associada com o aumento do número de isolados mutantes (C-I86F). Entretanto, é importante ressaltar que o monitoramento da eficiência a campo foi feito com o produto comercial em mistura formulada e o teste de CE_{50} com o ingrediente ativo benzovindiflupir isolado.

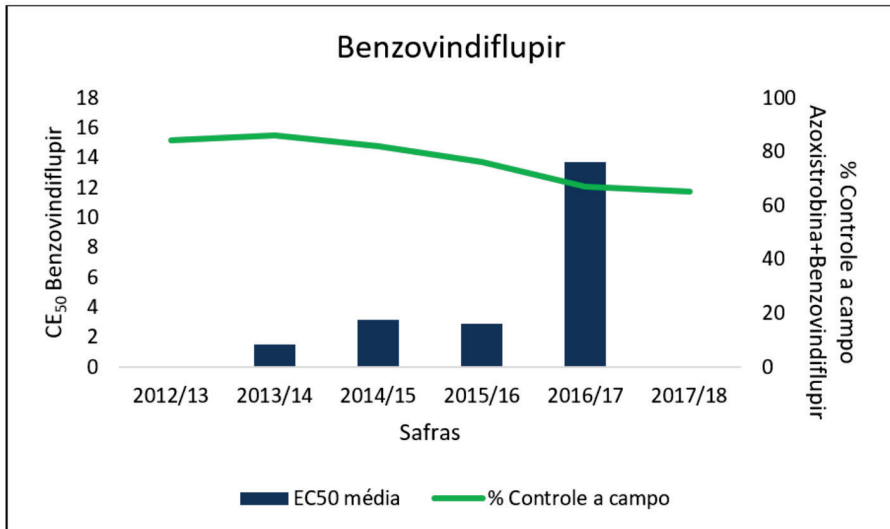


FIGURA 8. Eficiência do fungicida comercial (azoxistrobina+benzovindiflupir) em experimentos a campo realizados pela Embrapa e consórcio anti-ferrugem ao longo das safras e CE_{50} média (mg L⁻¹) de isolados monouredinais de *Phakopsora pachyrhizi* em relação ao princípio ativo benzovindiflupir (SDHI). Linha indica eficiência do fungicida comercial e barras indicam valores de CE_{50} .

7. Adaptabilidade associada à resistência a fungicidas

A adaptabilidade é definida como a habilidade de um isolado sobreviver, desenvolver e reproduzir quando comparado a outro isolado sob as mesmas

condições. A evolução da resistência a fungicidas em uma população fúngica é altamente dependente da adaptabilidade, que afeta a dinâmica da competição entre isolados resistentes e sensíveis, e assim, tem implicações importantes no manejo da doença (Parnell et al., 2005).

As mutações que resultam em resistência aos fungicidas podem reduzir a eficiência de importantes processos fisiológicos e bioquímicos do patógeno, levando a uma menor adaptabilidade (Ghini & Kimati, 2000). Portanto, quando o mesmo ponto de mutação que confere resistência aos fungicidas está relacionado com a perda de eficiência de algum mecanismo fisiológico assume-se que a resistência acarreta custos ou penalidades adaptativas ao patógeno (Ghini & Kimati, 2000). Como exemplo, mutações no códon 240 do gene da β -tubulina, que confere resistência aos benzimidazóis em isolados de *M. laxa*, também acarretam maior sensibilidade dos isolados ao calor (Ma et al., 2005).

Custos adaptativos associados com a resistência a fungicidas são frequentemente previstos, mas raramente relatados (Zhan & McDonald, 2013). Evidências experimentais sugerem que mutantes resistentes aos azoles se mostraram menos adaptados que isolados sensíveis, assumindo-se que os mesmos têm pequena chance de sobrevivência nas condições de campo (Köller & Scheinpflug, 1987). A resistência aos IDMs foi associada com penalidades adaptativas relacionadas à menor agressividade e produção de esporos e desvantagem competitiva em relação aos isolados sensíveis para *Cercospora beticola* (Karaoglanidis et al., 2001). Para *Penicillium expansum*, isolados resistentes apresentaram menor crescimento micelial e menor agressividade em relação aos isolados sensíveis (Karaoglanidis et al., 2011). Isolados resistentes de *Monilinia fructicola* também apresentaram menor adaptabilidade em relação aos isolados sensíveis, com base na taxa de crescimento, esporulação e tamanho da lesão (Chen et al., 2012). Para isolados de *Pyrenophora teres* resistentes não foi observado nenhum custo adaptativo com relação aos componentes período de latência e esporulação (Peever & Milgroom, 1994).

A associação entre a resistência aos IQes e as penalidades adaptativas ainda não está bem elucidada. Sugere-se que as substituições que ocorrem em isolados resistentes afetam a adaptabilidade de formas diferentes (Fernández-Ortuño et al., 2008). A mutação F129L, que pode ocorrer em ferrugens, foi associada a custos adaptativos para *Plasmopora viticola*, *Alternaria solani* e *Botrytis cinerea*, casos em que isolados resistentes apresentaram desvantagem em ensaios de competição com isolados sensíveis (Toffolatti et al., 2007; Pasche & Gudmestad, 2008; Kim & Xiao, 2011).

Klosowski et al. (2016) conduziram ensaios de competição entre um isolado sensível (tipo selvagem) e isolados com mutações nos genes *CYP51* e *CYTB* de *Phakopsora pachyrhizi*, em folhas destacadas de soja, durante quatro ciclos da doença, acompanhando a frequência de isolados mutados ao final de cada ciclo, por meio do método de pirosequenciamento. As misturas entre o isolado sensível (“8”) e isolados mutados (“72”, “62”, “63”, “27”, “28” e “GWH-B”) foram feitas conforme

ilustrado na Figura 9. Como a frequência das mutações relevantes no gene *CYP51* foram aproximadamente 30 e 50% (Schmitz et al., 2014), misturas na proporção de 80% dos isolados mutados e 20% do isolado sensível foram utilizadas para garantir um monitoramento confiável da frequência das mutações ao longo dos ciclos da doença, considerando que o limite de detecção do método de pirosequenciamento é de 5%. Para a mutação F129L no gene *CYTB*, o pirosequenciamento mostrou sempre a frequência de 100% no DNA de isolados monouredinais de *P. pachyrhizi* (Klosowski et al., 2015) e, portanto, foi possível testarmos as proporções de 50% do isolado sensível + 50% do isolado mutado e 20% do isolado sensível + 80% do isolado mutado, sem comprometer a quantificação da mutação na mistura ao longo dos ciclos da doença. Isolados com menor sensibilidade aos IDMs e diferentes haplótipos do gene *CYP51* (F120L+Y131H; Y131F+K142R; Y131F+I475T) apresentaram desvantagens competitivas comparados com o isolado sensível (Fig. 10). O isolado com a mutação F129L no gene *CYTB* competiu igualmente bem com o isolado sensível sob as condições deste experimento (Fig. 10). Para comprovação da eficiência do método, o estudo também constatou que os haplótipos dos genes *CYP51* e *CYTB* foram estáveis em todos os isolados monouredinais durante quatro ciclos da doença quando cultivados sozinhos. No mesmo trabalho, os autores testaram o efeito de folhas tratadas com o fungicida multi-sítio mancozebe nos ensaios de competição e não encontraram influência do composto na competitividade entre o isolado sensível e os isolados com mutações nos genes *CYP51* e *CYTB*.

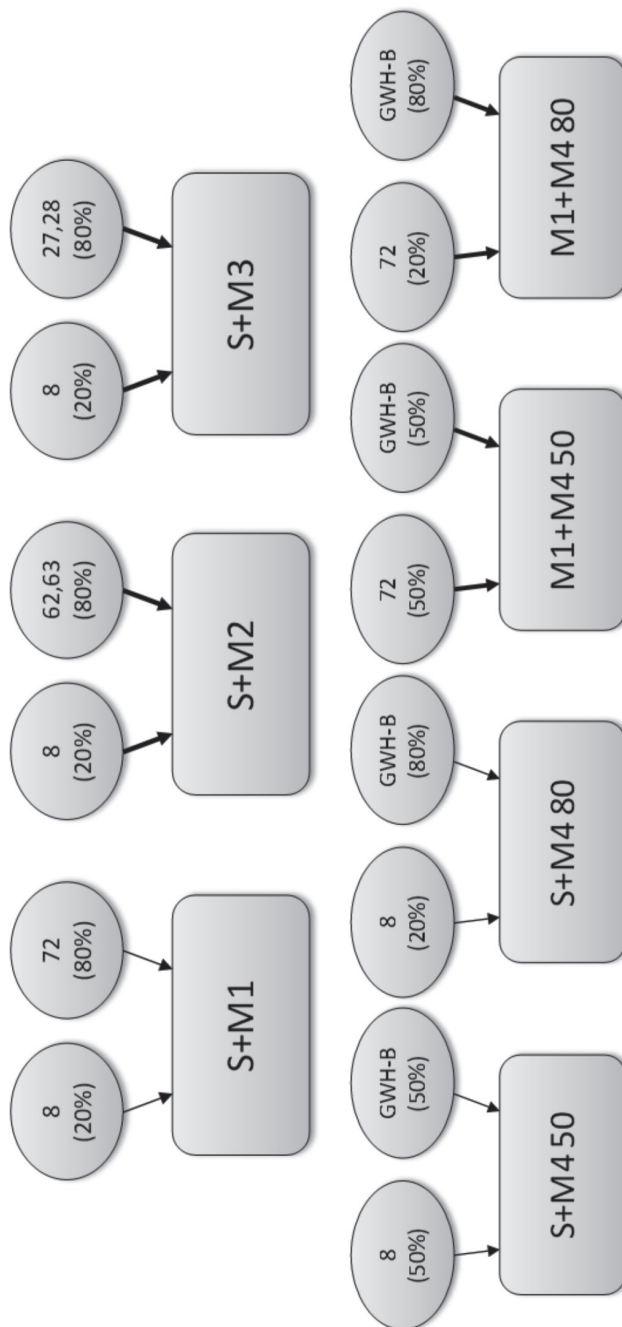


FIGURA 9. Misturas entre o isolado sensível (S = isolado selvagem) e isolados mutados (M1, M2, M3 e M4) no gene do citocromo P450 14 α -esterol desmetilase (CYP51) e no gene do citocromo b (CYTB) de *Phakopsora pachyrhizi* preparadas para ensaios de competição em folhas destacadas de soja (*Glycine max*). As proporções utilizadas nas suspensões de uredosporos foram 50% do isolado sensível + 50% do isolado mutado e/ou 20% do isolado sensível + 80% do isolado mutado.
Legenda: S = sensível (isolado selvagem) = 8; M1 = isolado mutado no gene *CYP51* (F120L+Y131H) = 72; M2 = isolado mutado no gene *CYP51* (Y131F+K142R) = 62 e 63; M3 = isolado mutado no gene *CYP51* (Y131F+I475T) = 27 e 28; M4 = isolado mutado no gene *CYP51*(F120L+Y131H) e no gene *CYTB*(F129L) = GWH-B.

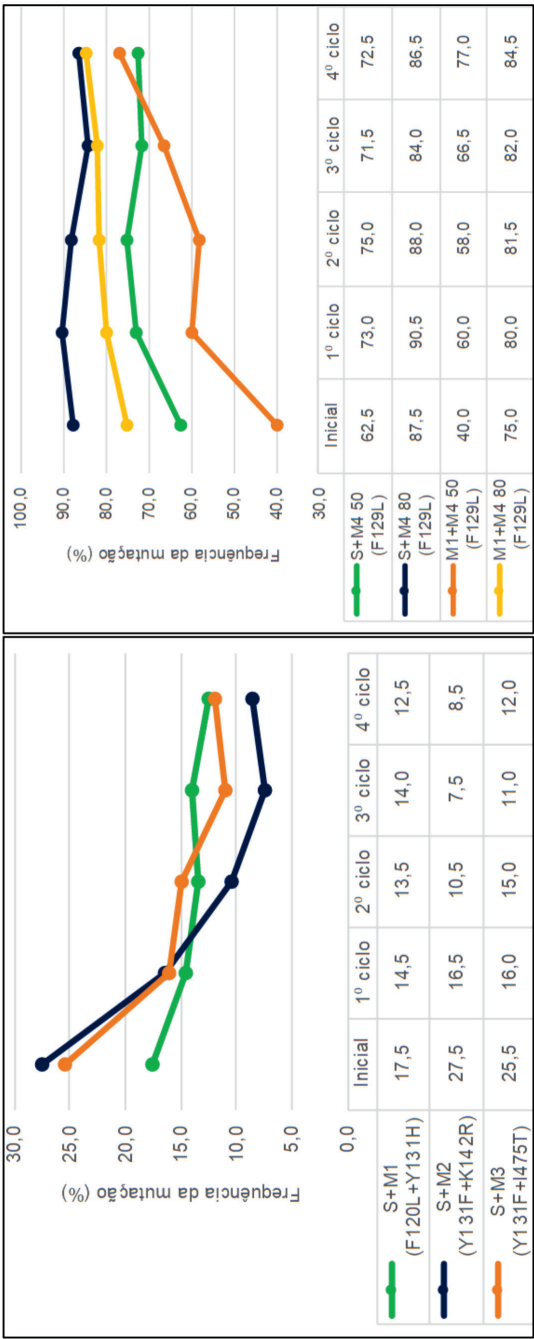


FIGURA 10. Frequência de mutações nos genes do citocromo P450 14 α -esterol desmetilase (*CYP5I*) e do citocromo b (*CYP5b*) em ensaios de competição entre um isolado sensível (S= tipo selvagem) e isolados mutados (M1= F120L+Y131H (*CYP5I*), M2= Y131F+K142R (*CYP5I*), M3= Y131F+I475T (*CYP5I*) e M4= F120L+Y131H (*CYP5I*) e F129L (*CYP5b*) de *Phakopsora pachyrhizi* durante quatro ciclos da doença.

Em resumo aos trabalhos que a equipe da UFPR vem conduzindo com o patossistema soja x *P. pachyrhizi*, relatamos que isolados do patógeno provenientes de áreas de produção de soja convencional se mostraram menos sensíveis ao tebuconazol (IDM) e menos adaptados, com base nos parâmetros monocíclicos, do que isolados provenientes de área de produção de soja orgânica, sem aplicação de fungicidas. Este resultado indica que o uso de fungicidas na área de produção de soja convencional selecionou isolados menos sensíveis e que a perda de sensibilidade pode estar associada a custos adaptativos. Mais de 96% dos isolados analisados apresentaram duas mutações (mais frequente) e três mutações no gene *CYP51*, que estão relacionadas à menor sensibilidade aos IDMs, indicando que estas mutações podem estar ligadas à adaptação evolutiva dos isolados no campo (Klosowski et al., 2018).

Para o caso dos IQes, a mutação F129L no gene *CYTB* foi associada a perda de sensibilidade de isolados observando um aumento na frequência da mutação entre safras avaliadas. O isolado com a mutação F129L no gene *CYTB* competiu igualmente bem com o isolado sensível (sem mutação). Fato ainda mais grave é que muitos isolados apresentam mutações em ambos os genes (*CYP51* e *CYTB*), caracterizando resistência múltipla. Recentemente nosso grupo LEMID, em pesquisa em conjunto com a BASF, detectou isolado com resistência múltipla aos três grupos IDM, IQe e SDHI (Müller et al., 2018). Estudos de adaptabilidade e habilidade competitiva envolvendo maior número de isolados e também isolados detectados recentemente com mutação tripla ainda estão sendo conduzidos.

8. Estratégias de manejo para reduzir alterações em sensibilidade e prolongar eficiência dos fungicidas

O uso e a eficiência dos fungicidas para o controle da FAS têm variado muito desde o início das epidemias relatadas no Brasil. Os resultados do monitoramento de eficiência dos fungicidas em ensaios de campo, instalados em vários estados da federação, vão de encontro ao que se observa e se relata em artigos científicos e congressos sobre o aparecimento de mutações associadas à resistência e/ou reduções de sensibilidade do patógeno aos fungicidas, em testes laboratoriais.

Fatores que favoreceram esta situação foram, por exemplo, o uso frequente de fungicidas do mesmo grupo químico de forma ampla, sequencial e, muitas vezes, curativa (Godoy et al, 2016), acompanhado do período latente curto do patógeno, de 8 a 11 dias (Klosowski et al 2018), levando à rápida multiplicação e disseminação dos uredinísporos, e às extensas áreas de plantios de soja no Brasil. Devido a essas características, qualquer falha no controle químico permite uma resposta muito rápida da epidemia.

Apesar dos esforços para conter esta doença, a alteração na sensibilidade associada à redução de eficiência dos fungicidas sítio-específicos tem levado a cadeia produtiva a incorporar fungicidas multissítios no manejo, na tentativa de manter

a doença sob controle. As recomendações gerais para um controle químico mais eficiente incluem a aplicação preventiva ou no início da epidemia e a alternância de princípios ativos pertencentes a diferentes grupos químicos, seguindo sempre as recomendações da bula dos produtos quanto à dose e intervalos de aplicação.

Diante do cenário atual, ressalta-se a importância de se utilizar, em conjunto, todas as medidas de controle da doença disponíveis, incluindo o uso de cultivares precoces que contenham genes de resistência, o plantio no início da época recomendada, e o cumprimento das medidas legislativas, que são o vazio sanitário e a calendarização da semeadura, que visam diminuir o inóculo primário e o número de aplicação de fungicidas, respectivamente. O vazio sanitário e a calendarização da semeadura não foram instituídos em todos os estados produtores de soja e, portanto, em algumas regiões brasileiras é permitido o cultivo de soja de segunda safra e, inclusive, o cultivo de soja sobre soja (EMBRAPA, 2018), o que pode ser um agravante para o sistema atual de estratégias para um manejo eficiente da doença.

Além das medidas já mencionadas, políticas governamentais direcionadas para a suspensão de uso de produtos ineficientes são importantes, assim como a busca de novas alternativas (por exemplo, cultivares com novos genes de resistência) e registros de novas moléculas.

Referências

- Alves SAM (2007). Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi*-soja. 64 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- Alves SAM, Furtado GQ, Bergamin Filho A (2006). Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: Zambolim L (Ed.) Ferrugem asiática da soja. Viçosa MG. Suprema Gráfica e Editora. 37-59.
- Avenot HF, Sellam A, Karaoglanidis G, Michailides TJ (2008). Characterization of Mutations in the Iron-Sulphur Subunit of Succinate Dehydrogenase Correlating with Boscalid Resistance in *Alternaria alternata* from California Pistachio. doi:10.1094/PHYTO-98-6-0736.
- Avenot HF, Thomas A, Gitaitis R, Langston Jr DB, Stevenson KL (2012). Molecular characterization of boscalid and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. Pest Manag Sci, 68: 645–651.
- Blum MMC, Reis EM (2013). *Phakopsora pachyrhizi* in vitro sensitivity to fungicides. *Summa Phytopathologica* 39, 215-216.
- Brent K, Hollomon D (2007a). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2. ed. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Brent KJ, Hollomon D (2007b). Fungicide resistance: the assessment of risk. 2. ed. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Bromfield KR (1984). Soybean rust. *Monograph*, 11. St. Paul: The American Phytopathological Society.

Chen FP, Fan JR, Zhou T, Liu XL, Liu JL, Schnabel G (2012). Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the IDM fungicide SYP-Z048 and analysis of IDM-resistant mutants. *Plant Disease*, 96: 416-422.

Childs SP, Buck JW, Li Z (2018). Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Plant Breeding*, 137, 250-261.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento(2018). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. *Monit. Agrícola*, 5: 1–178. doi:ISSN 2318-6852

Dalla Lana F, Ziegelmann, PK, Maia AHN, Godoy CV, Del Ponte EM (2015). Meta-Analysis of the relationship between crop yield and soybean rust severity. *Phytopathology*, 105, 3 : 307- 315.

Dekker J (1995). Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: LYR, H (Ed.) *Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action*. 2. ed. New York: VCH, 23-38.

Del Ponte EM, Godoy C V, Li X, Yang X B (2006). Predicting severity of Asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. *Phytopathology*, 96: 797-803.

Délye C, Bousset L, Corio-Costet M F (1998). PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14a-demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Current Genetics*, 34: 399-403.

Délye C, Laigret F, Corio-Costet M F (1997). A mutation in the 14a-demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2966-2970.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento (2018). Vazio sanitário e calendarização da semeadura da soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/ferrugem/vaziosanitariocalendarizacaosemeadura>>. Acesso em: 05/09/2018.

FAO - Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Base de dados Faostat – Agriculture (2017) Roma: FAO, (2018). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#search/soybeans>>. Acesso em: 20/09/2018.

Fernández-Ortuño D, Chen F, Schnabel G (2012). Resistance to Pyraclostrobin and Boscalid in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in the Carolinas. doi:10.1094/PDIS-12-11-1049.

Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A (2008). Mechanism of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 11: 1-9.

Fraaije BA, Bayon C, Atkins S, Cools HJ, Lucas JA, Fraaije MW (2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Mol. Plant Pathol.* 13: 263–275. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x

Frac. Mutations associated with QoI-resistance. Documento online (2006). Disponível em: <<http://www.frac.info/docs/default-source/about-frac/mutations-associated-with-QoI-resistance.pdf>> Acesso em: 18/09/2018.

Freire MCM, Oliveira LO, Almeida AMR, Schuster I, Moreira MA, Liebenberg, M M, Mienie CMS (2008). Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 920-931.

Ghini R, Kimati H (2000). Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 78p.

Gisi U, Chin KM, Knapova G, Küng Färber R, Mohr U, Parisi S, Sierotzki H, Steinfeld U (2000). Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, IDM and strobilurin fungicides. *Crop Protection*, 19: 863-872.

Gisi U, Sierotzki H, Cook A, Mccaffery A (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, 58: 859-867

Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, Marcelino-Guimarães FC, Meyer MC, Costamilan LM (2016b). Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51: 407–421. doi:10.1590/S0100-204X2016000500002

Glättli A, Stammler G, Schlehuber S (2009). Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 α -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity - structural insights from molecular modelling, in: 9 $^{\text{ème}}$ Conférence International Sur Les Maladies Des Plantes. pp. 670–681. doi:10.1002/ps.3797/full

Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos HD, Forcelini CA, Pimenta C, Cassetari Neto D, Jaccoud Filho DS, Borges EP, de Andrade Jr ER, Siqueri F V, Juliatti FC, Feksa HR, Grigolli JFJ, Nunes Junior J, Carneiro LC, Da Silva LHCP, Sato LN, Canteri MG, Madalosso M, Goussain M, Martins MC, Balardin RS, Furlan SH, Montecelli TDN, Carlin VJ, Venancio WS (2015). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Circ. Técnica* 111: 1–6.

Godoy CV, Utiamada CM, Campos HD, Forcelini CA, Pimenta CB, Borges EP, de Andrade Jr ER, Siqueri F V, Juliatti FC, Favero F, Feksa HR, Grigolli JFJ, Nunes Junior J, Carneiro LC, da Silva LHCP, Sato LN, Canteri MG, Debortoli MP, Goussain M, Martins MC, Balardin RS, Furlan SH, Madalosso T, Carlin VJ, Venancio WS (2016a). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Circ. Técnica* 119: 1–6.

Godoy CV, Utiamada CM, Meyer MC, Campos H, Forcelini CA, Pimenta CB, Jaccoud Filho DS, Moreira EN, Borges EP, Andrade ER de, Siqueri FV, Juliatti FC, Favero F, Feksa HR, Araújo Júnior IP, Jurca JF, Nunes Junior J, Belufi LM de R, Carneiro LC, da Silva LHCP, Sato LN, Canteri MG, Volf MR, Goussain M, Debortoli MP, Martins MC, Balardin RS, Furlan SH, Madalosso T, Carlin VJ, Venancio WS (2017). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Circ. técnica* 129: 1-10.

Godoy, C V, Utiamada, CM, Meyer, MC, Campos, HD, Lopes, I de ON, Dias, AR, Deuner, CC, Pimenta, CB, Jaccoud Filho, DS, Moreira, EN, Borges, EP, Andrade Jr, ER, Siqueri, F V, Juliatti, FC, Juliatti, FC, Favero, F, Feksa, HR, Araújo Júnior, IP, Grigolli, JFJ, Nunes Junior, J, Belufi, LM de R, Carneiro, LC, da Silva, LHCP, Sato, LN, Canteri, MG, Volf, MR, Goussain, M, Dias, MD, Debortoli, MP, Martins, MC, Balardin, RS, Furlan, SH, Madalosso, T, Carlin, VJ, Venancio, WS (2018). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018 *Circ Técnica*, 138: 1–8.

Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A, Gisi U(2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest management science* 62, 465-472.

- Hägerhäll, C., 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochem. Biophys. Acta*, 1320 : 107-141.
- Hartman GL, Wang TC, Tschanz AT (1991). Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. *Plant Disease*, 75: 596-600.
- Hartman GL, Haudenschild J S (2009). Movement of *Phakopsora pachyrhizi* (soybean rust) spores by non-conventional means. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 225-228.
- Hirakuri, MH Lazzarotto, J J (2014). O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Documentos 349. Londrina: EMBRAPA Soja.
- Horsefield R, Yankovskaya V, Sexton G, Whittingham W, Shiomi K, Omura S, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2006). Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J. Biol. Chem*, 281: 7309-7316.
- Isard SA, Gage SH, Comtois P, Russo JM (2005). Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *Bioscience*, 55, 10: 851-861.
- Jorge VR, Silva MR, Guillin EA, Freire MCM, Schuster I, Almeida AMR, Oliveira LO (2015). The origin and genetic diversity of the causal agent of Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, in South America. *Plant Pathology*, 64, 729-737.
- Karaoglanidis GS, Ioannidis PM, Thanassouloupoulos CC (2000). Reduced sensitivity of *Cercospora beticola* isolates to sterol-demethylation-inhibiting fungicides. *Plant Pathology*, 49: 567-572.
- Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC, Ioannidis PM (2001). Fitness of *Cercospora beticola* field isolates resistant and sensitive to demethylation inhibitor fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 337-347.
- Karaoglanidis GS, Luo Y, Michailides TJ (2011). Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. *Plant Disease*, 95: 178-182.
- Kim YK, Xiao CL (2011). Stability and fitness of pyraclostrobin- and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101:1385-1391.
- Kitani K, Inoue Y (1960). Studies on soybean rust and its control measure. Part 1. Studies on the soybean rust. *Shikoku Agricultural Experimental Station Bulletin*, 5: 319-342.
- Klosowski AC (2015). Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* aos Fungicidas tebuconazol (inibidor da desmetilação) e azoxistrobina (inibidor da quinona externa). Universidade Federal do Paraná.
- Klosowski AC, Brahm L, Stammler G, May De Mio LL (2016b). Competitive Fitness of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates with Mutations in the CYP51 and CYTB Genes. *Phytopathology*, 106: 1278-1284. doi:10.1094/PHYTO-01-16-0008-R.
- Klosowski AC, Castellar C, Stammler G, May De Mio LL (2018). Fungicide sensitivity and monocyclic parameters related to the *Phakopsora pachyrhizi*-soybean pathosystem from organic and conventional soybean production systems. *Plant Pathol.* 67: 1-9. doi:10.1111/ppa.12883.
- Klosowski AC, May De Mio LL, Miessner S, Rodrigues R, Stammler G (2016a). Detection of the F129L mutation in the *cytochrome b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Manag. Sci.* 72: 1211-1215. doi:10.1002/ps.4099.

- Koga LJ, Lopes ION, Godoy CV (2011). Sensitivity monitoring of *Phakopsora pachyrhizi* populations to triazoles in Brazil. In: MODERN FUNGICIDES AND ANTIFUNGAL COMPOUNDS VI. 16(2010) International Reinhardtsbrunn Symposium. Friedrichroda: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaften V Selbstverlag, 211-216.
- Köller W, Scheinpflug H (1987). Fungal resistance to sterol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease*, 71: 1066–1074.
- Köller W, Wilcox WF, Barnard J, Jones AL, Braun P G (1997). Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology*, 87: 184-190.
- Kuhn, PJ (1984). Mode of action of carboximides. *Symp. Ser. Br. Mycol. Soc*, 9 : 155-183.
- Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M, Chapeland F (2002). Mechanism of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876-888.
- Li X, Esker PD, Pan Z, Dias A P, Xue L, Yang X B (2010). Uniqueness of the SBR Pathosystem and Its Scientific Value. *Plant Disease*, 94: 796-805.
- Magnani EBZ, Alves E, Araújo DV (2007). Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 156-160.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018). AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Sistema Online.
- May De Mio LL, Luo Y, Michailides TJ (2011). Sensitivity of *Monilinia fruticola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant Disease*, 95: 821-827.
- Miles TD, Miles LA, Fairchild KL, Wharton PS (2014). Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*. *Plant Pathol.* 63: 155–164. doi:10.1111/ppa.12077.
- Miyamoto T, Ishii H, Stammler G, Koch A, Ogawara T, Tomita Y, Fountaine JM, Ushio S, Seko T, Kobori S (2010). Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid. *Plant Pathol.* 59 : 873–881. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02321.x.
- Miessner S, Stammler G (2010). *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fruticola*: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117: 162-167.
- Müller MA, Stammler G, May De Mio LL (2018). Adaptação de *Phakopsora pachyrhizi* aos fungicidas dos grupos IDM, IQe e ISDH. Em: VIII Congresso Brasileiro de Soja, - 2018: inovação, tecnologias digitais e sustentabilidade da soja: anais. Goiânia. 523-526.
- Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO (2008). Fundamentos de toxicologia. 3. ed. São Paulo: Atheneu Editora.
- Parnell S, Gilligan CA, Van Den Bosch F (2005). Small-scale fungicide spray heterogeneity and the coexistence of resistant and sensitive pathogen strains. *Phytopathology*, 95 : 632-639.
- Pasche JS, Gudmestad NC (2008). Prevalence, competitive fitness and impact of the F129L mutation in *Alternaria solani* from the United States. *Crop Protection*, 27: 427-435.

- Peever TL, Milgroom MG (1994). Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicide in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology*, 84: 515-519.
- Rehfus A, Strobel D, Bryson R, Stammler G (2018). Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. *Plant Pathol.* 67: 175–180. doi:10.1111/ppa.12715.
- Reis EM, Bresolin ACR, Carmona EM (2006). Doenças da soja I: Ferrugem asiática. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo.
- Reis EM, Forcelini CAE, Reis A C (2007). Manual de fungicidas: guia para o controle de doenças de plantas. 5. ed. rev. e ampl. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo.
- Rocha C M L, Vellicce GR, García M G, Pardo E M, Racedo J, Perera M F, Castagnaro A P (2015). Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakopsora pachyrhizi*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 439–444.
- Russel PE (2004). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Billie J (1998). Amino acid substitutions in the cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (*CYP51A1*) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to anti-fungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 241-253.
- Scalliet G, Bowler J, Luksch T, Kirchhofer-Allan L, Steinhauer D (2012). Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen. *PLoS One* 7, 35429. doi:10.1371/journal.pone.0035429.
- Schmitz, HK, Medeiros, CA, Craig, IR, and Stammler, G (2014). Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Manage. Sci.* 70:378-388.
- Sierotzki H, Scalliet G (2013). A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *Phytopathology*. 103 : 880–887. doi:http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F, Stammler G (2017). First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *J. Plant Dis. Prot.* doi:10.1007/s41348-017-0117-5.
- Sombardier A, Dufour MC, Blancard D, Corio-Costet MF (2010). Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest management science*, 66: 35-43.
- Stammler G (2012). Resistance risk of corn pathogens to QoI fungicides. *Outlooks on Pest Management*, 23: 211-214.
- Stammler G, Kern L, Semar M, Glaetli A, Schoefl U (2008a). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to IDM fungicides related to mutations in the target gene *cyp51* (14 α -demethylase). In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V*. 15., 2007. International Reinhardsbunn Symposium. Friedrichroda: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e V Selbstverlag, 137-142.
- Stammler G, Brix HD, Nave B, Gold R, Schoefl U (2008b). Studies on the Biological Performance of Boscalid and its Mode of Action, In: *Modern Fungicides and Antifungal*

- Compounds V.15., 2007. International Reinhardsbrunn Symposium. Friedrichroda: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft Selbstverlag, 41-45.
- Stammler G, Glaettli A, Koch A (2010). Mutations in the target protein conferring resistance to SDHI fungicides. In: Dehne HW et al (eds) Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th international Reinhardsbrunn Symposium 2010, 195–198.
- Stammler G, Strobel D, Semar M, Klappach K (2006). Diagnostics of fungicide resistance and relevance of laboratory data for the field. *Asp Appl Biol*, 78:29-36.
- Seixas CDS, Godoy CV (2007). Vazio sanitário: panorama nacional e medidas de monitoramento. In: Anais do simpósio brasileiro de ferrugem asiática da soja. Londrina: Embrapa, 23-33.
- Stehmann C, De Waard MA (1996). Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* to triazoles, benomyl and vinclozolin. *European Journal of Plant Pathology*, 102:171-180.
- Tan YJ, Yu ZL, Yang CY (1996). Soybean Rust. Beijing: China Agriculture Press.
- Toffolatti SL, Serrati L, Sierotski H, Gisi U, Vercesi A (2007). Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science*, 63:194-201.
- Tschurtschenthaler NN, Vieira ESN, Dalla Nora T, Schuster I (2012). Variabilidade genética de *Phakopsora pachyrhizi* avaliada por meio de marcadores microsatélites. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 47:181-186.
- Veloukas T, Leroch M, Hahn M (2011). Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. doi:10.1094/PDIS-04-11-0317.
- Zhan J, McDonald BA (2013). Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 131-153.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*. 299:700–704. doi:10.1126/science.1079605
- Yamaguchi J, Fujimura M (2005). Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science*, 30:67-74.
- Yang XB, Tschanz A T, Dowler WM, Wang TC (1991). Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. *Phytopathology*, 81: 1420–1426.
- Yorinori JT, Nunes Júnior J, Lazzarotto JJ (2004). Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Documentos 247. Londrina: Embrapa Soja.
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV, Nunes Jr J (2005). Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, 89:675-677.
- Wong FP, Midland SL (2007). Sensitivity Distributions of California Populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI Fungicides Propiconazole, Myclobutanil, Tebuconazole, and Triadimefon. *Plant Disease*, 91:1547-1555.

Resistência de citros à patógenos, genomas e efetores

**Eduardo Henrique Goulin
Carolina Munari Rodrigues
Mariana Massoco Tarallo
Paulo José Camargo dos Santos
Marcos Antonio Machado**

1. Introdução

O cultivo dos citros teve sua origem ainda na idade antiga no sudeste asiático, tendo sua expansão para outras regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente após as grandes navegações, tornando-se uma das mais importantes árvores frutíferas cultivadas (SINGH; RAJAM, 2009; TALON; GMITTER, 2008).

Dentre os países com condições climáticas favoráveis ao cultivo de citros o Brasil tornou-se um destaque mundial, dentre os quais o maior produtor de laranjas e o maior exportador de suco concentrado (FAO, 2015). Estimativas indicam um aumento na produção para a atual safra (2017/2018) comparado com a média da última década no sudeste brasileiro, resultado devido às condições climáticas favoráveis no período e as boas práticas de manejo aplicadas (FUNDECITRUS, 2017).

Dentre os grandes desafios da citricultura está o controle das constantes ocorrências de doenças e pragas, assim como em outras culturas economicamente importantes. A vulnerabilidade ao ataque de fitopatógenos é aumentada pelo fato de citros ser uma cultura perene, e, assim, permanecer durante maior tempo propenso ao ataque de diversas bactérias, nematoides, vírus, oomicetos e fungos (BERGAMIM-FILHO et al., 1995), se comparado com plantas de ciclo anual.

Juntamente com a detecção de diferentes doenças, esforços estão sendo aplicados para seu manejo, tanto no desenvolvimento de produtos para o controle dessas pragas, quanto na busca por genótipos resistentes. Para isso, métodos baseados

Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas, Rodovia Anhanguera km 158, Cordeirópolis, SP, CEP 13490-970. E-mail: marcos@ccsm.br

em biologia molecular contribuem para a fitossanidade de pomares de citros.

O sequenciamento de genomas e transcriptomas tornaram-se uma valiosa arma para a identificação de regiões genômicas envolvidas na patogenicidade de microrganismos e pragas, e na susceptibilidade, resistência ou tolerância das plantas. Portanto, este capítulo dedica-se a abordar a relação entre as informações obtidas a partir de genomas e transcriptomas de alguns patógenos de citros e a contribuição desses para melhoramento, incluindo transformação genética, na busca de resistência ou tolerância.

2. Diversidade dos citros e suas aplicações no melhoramento genético

A diversidade dos citros contribuiu para a seleção de plantas e dispersão daquelas que tem características interessantes para o consumo. Além de buscar plantas com melhor qualidade do fruto, ou frutos que apresentem sabores específicos, melhoramento genético tem por objetivo obter plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos.

A diversidade biológica é a matéria prima para o melhoramento genético. Essa refere-se a totalidade de genes, espécies e ecossistemas de uma região (NASS et al., 2001). Como mencionado, a biodiversidade se apresenta em três categorias, a diversidade genética, de espécies e de ecossistemas (MCNEELY et al., 1990), já o melhoramento aplicado aos citros tem interesse específico na diversidade genética intra e interespecíficas.

Essa diversidade pode ser avaliada de diferentes formas, tanto pelo levantamento de caracteres morfológicos (fenótipo), quanto moleculares (genótipo). Com o advento das novas tecnologias, o melhoramento genético procura acelerar processos, especialmente quando envolve plantas de ciclo longo. Ainda, o melhoramento genético busca características que são apresentadas em estágios tardios de desenvolvimento da planta, como qualidade de frutos, por exemplo, já que esses demoram anos até que possam ser avaliados.

Melhoramento assistido por marcadores moleculares permitiram uma melhor e prematura avaliação da herança dos caracteres de interesse agrônomo, especialmente para a seleção de plantas perenes. Os marcadores genéticos são caracteres com mecanismos de herança simples que podem ser empregados para comparar indivíduos através de suas diferenças genéticas. Os marcadores moleculares viabilizam a caracterização genotípica de uma grande quantidade de indivíduos de forma mais rápida (BERED et al., 1997)

Diversos marcadores moleculares são utilizados para assistir o melhoramento genético de citros. Sendo esses, desde os clássicos que não necessitam informações do sequenciamento do genoma das espécies avaliadas, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), quanto marcadores que permitem melhor entendimento das características analisadas como a identificação de loci de características quantitativas – QTL (*Quantitative Trait Loci*)

– e DArTseq (*Diversity Arrays Technology Sequenced*), e que tem sua aplicabilidade estendida com a utilização de informações dos genomas e transcriptomas das variedades avaliadas (CRISTOFANI et al., 1999; LIMA et al., 2018; SANSALONI et al., 2011; ZHANG et al., 2015).

A estratégia de transferência de alelos de resistência é utilizada no manejo integrado de pragas e doenças através de programas de melhoramento. Faz-se necessária essa abordagem devido ao fato da co-evolução de fatores relacionados a virulência dos patógenos (como moléculas efectoras) e seus respectivos hospedeiros (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A partir das informações e tecnologias disponíveis, e da diversidade de citros, trabalhos de melhoramento foram desenvolvidos durante anos buscando plantas resistentes à diferentes patógenos que acometem esta cultura. Dentre tantas doenças que causam danos significativos à citricultura, os programas de melhoramento obtiveram sucesso em identificar marcadores relacionados à resistência às doenças virais, como a tristeza dos citros (CRISTOFANI et al., 1999) e a leprose (BASTIANEL et al., 2009), ao fungo *Alternaria alternata* (CUENCA et al., 2016), à gomose (LIMA et al., 2018; SIVIERO et al., 2006) e a doença bacteriana clorose variegada dos citros – CVC (CRISTOFANI et al., 2005).

Juntamente com as técnicas de cruzamento utilizadas no melhoramento clássico, a transformação genética de plantas auxilia o melhoramento na transferência direta, ou deleção, de genes relacionados a resistência à patógenos (DONMEZ et al., 2013). Alguns genes de interesse agrônômico já foram introduzidos em citros com sucesso via transformação genética, conferindo resistência ou tolerância a patógenos de citros. Dentre esses, eventos de transformação foram eficientes contra o cancro cítrico após a transferência dos genes *hrpN* (BARBOSA-MENDES et al., 2009), *Atta* (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010), *MdSPD* (FU et al., 2011) e *pthA-nls* (YANG et al., 2011). Outros trabalhos também destacam a utilização de genes como o da capa protéica (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FEBRES et al., 2008; GUTIERREZ et al., 1997), siRNA (LÓPEZ et al., 2010), single-chain variable fragmente (CERVERA et al., 2010), para a resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV). Além desses, a introdução na variedade porta-enxerto US-802 [*Citrus grandis* x *Poncirus trifoliata*] o gene D4E1, que codifica um peptídeo antimicrobiano, visa a resistência/tolerância ao Huanglongbing dos citros (HLB) (ALBRECHT et al., 2012).

Recentemente a edição de genomas emergiu como uma tecnologia inovadora, na qual regiões do genoma podem ser especificamente alteradas por meio da ação de um complexo composto por uma enzima e RNA simples fita guia Cas9/sgRNA (DUPUIS et al., 2013). Essa tecnologia pode auxiliar os programas de melhoramento genético para resistência de doenças (ANDOLFO et al., 2016; TABASSUM et al., 2017). Em citros já há aplicação da edição de genoma para promoção de resistência a cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (JIA et al., 2017; JIA; WANG, 2014a, 2014b).

Portanto, as informações obtidas a partir do sequenciamento de genomas e transcriptomas tem grande valia para utilização de outras ferramentas que permitem melhor seleção de variedades resistentes a diferentes doenças que acometem os citros. Porém, para que programas de melhoramento genético sejam efetivos é necessário que tenham “matéria-prima” para a busca de alelos de resistência, a diversidade genética. Assim, é evidente que o estudo da interação planta-patógenos em citros utiliza estratégias clássicas e moleculares na busca de plantas resistentes. Portanto, é essencial entender os mecanismos de desenvolvimento de uma doença para melhor propor novas estratégias de manejo.

3. Patógenos de citros e seus efetores

Citros é uma cultura acometida por uma grande diversidade de patógenos, destacando-se bactérias, fungos, oomicetos e vírus, além dos agentes transmissores de algumas dessas doenças. Elucidar os fatores de virulência desses patógenos é muito importante para entender como ocorre a doença, e assim, obter estratégias para seus controles. Muitos desses patógenos secretam inúmeras moléculas efetoras capazes de manipular as defesas da planta hospedeira. O termo efector abrange todas as proteínas e pequenas moléculas que alteram a função ou estrutura da célula hospedeira, podendo desencadear resposta de defesa e/ou susceptibilidade do hospedeiro (HOGENHOUT et al., 2009). Esses efetores são reconhecidos direta ou indiretamente pelas proteínas R (receptoras) das plantas, as quais possuem domínios NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*) (BOLLER & FELIX, 2009).

Dentre as doenças bacterianas, a clorose variegada dos citros (CVC) causada por *Xylella fastidiosa* atinge todas das variedades comerciais de laranja doce (LI et al., 2003; ZAMBOLIM et al., 2012). Os principais sintomas dessa doença são pequenas manchas amarelas e/ou marrons entre as nervuras na porção adaxial e abaxial das folhas, amadurecimento precoce e endurecimento dos frutos, assim como a redução de seu tamanho, o que causa perdas de até 75% do peso (ROSSETTI; DE NEGRI, 2011; ZAMBOLIM et al., 2012). Com a publicação do genoma e baseado nos sintomas da CVC, puderam-se esclarecer algumas hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na patogenicidade da *X. fastidiosa*. A mais aceita e pesquisada é que o bloqueio dos vasos do xilema ocorre através de agregados da bactéria, produção de polissacarídeos e tiloses. Essa hipótese é sustentada devido aos hospedeiros infectados apresentarem sintomas típicos de estresse hídrico (HOPKINS, 1989).

No genoma de *X. fastidiosa* foram detectados 26 genes relacionados à biossíntese e função de filamentos de fimbrias (SIMPSON et al., 2000). Apesar de nenhuma proteína efectora ter sido caracterizada, existem algumas moléculas que são consideradas possíveis efetores dessa bactéria. Dentre elas, a LipA/LesA, cujos genes homólogos estão presentes na estirpe que causa CVC (NASCIMENTO et al., 2016), porém caracterizadas na estirpe da doença de Pierce em videira. O peptídeo EF-Tu também é um possível efector de *X. fastidiosa*, embora mais estudos são necessários

para confirmar essa hipótese (KUNZE G et al., 2004). Além disso, acredita-se que PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) possam ser reconhecidos pela planta desencadeando uma resposta de defesa (RODRIGUES et al., 2013).

Outra doença importante é o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Os sintomas aparecem em folhas, ramos e frutos, sendo caracterizados pela formação de lesões circulares e encharcamento dos tecidos, podendo sofrer erupção, tomando forma semelhante a bolhas. Estas bolhas posteriormente se transformam em pústulas esponjosas, brancas ou amarelas, que escurecem e engrossam com o decorrer do tempo, ficando de cor castanho claro e áspero ao toque. Em árvores infectadas, o cancro cítrico pode levar a desfolha e queda prematura dos frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Um dos efetores mais importantes desse patossistema é o PthA4, o qual é encontrado nos quatro isolados de *Xanthomonas* causadoras do cancro cítrico [*X. citri* 306 (DA SILVA et al., 2002) *X. citri* Aw (JALAN et al., 2013) e *X. fuscans* B e C (MOREIRA et al., 2010)], possui ação no núcleo da célula hospedeira, alterando a expressão gênica e favorecendo o desenvolvimento do patógeno.

Ainda dentre as bactérias fitopatogênicas, destacam-se *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus* como os principais agentes causais do *huanglongbing* (HLB), considerada a mais destrutiva no mundo nas últimas décadas (WANG; TRIVEDI, 2013). A transmissão para as plantas de citros ocorre pelo psíldeo *Diaphorina citri*. Sintomas visuais em plantas com HLB iniciam-se de forma setorizada e sempre ocorrem em ramos com fluxo vegetativo recente. Inicialmente há o aparecimento de brotações amareladas, seguindo-se do mosqueamento assimétrico nas folhas que vão se tornando maduras, evoluindo gradativamente para uma completa clorose da folha. Com relação aos frutos, o sintoma mais característico é a assimetria do eixo central, inversão da coloração que se inicia pelo pedúnculo, aumento da acidez e queda, com reflexos negativos na produção e qualidade (BOVÉ, 2006).

Devido à importância mundial do HLB, vários trabalhos foram realizados para identificar efetores relacionados com a causa dessa doença (CONG et al., 2012; PITINO et al., 2014; PUTTAMUK et al., 2014; ZHOU et al., 2013; ZOU et al., 2012). Alguns possíveis efetores foram identificados e caracterizados através da expressão transiente em folhas de *Nicotiana benthamiana* (PITINO et al., 2016; PITINO et al., 2018). Apenas o candidato Las5315mp foi responsável por induzir clorose e morte celular, típica resposta de hipersensibilidade (HR) resultado do reconhecimento de proteínas efetoras pelo hospedeiro (ETI - *effector-triggered immunity*).

A *Phytophthora parasitica* é o oomiceto responsável pela doença gomose dos citros. O gênero *Phytophthora* até pouco tempo estava classificado dentro do reino Fungi, reino dos fungos verdadeiros. No entanto, *Phytophthora* e outros microrganismos que apresentam características relativamente incomuns em outros tipos de fungos são classificados como oomicetos (ERWIN, DC; RIBEIRO, 1996). Os sintomas dessa doença são lesões no colo da planta e em outras partes do tronco,

exsudação de goma e descoloração do tecido afetado. Sintomas secundários envolvem amarelecimento, murcha e queda de folhas (TEIXEIRA, 2005). O desenvolvimento da doença está relacionado com altas temperaturas, alta umidade relativa do ar e ao grau de umidade do solo, que estimulam a ocorrência do oomiceto no solo em condições favoráveis (LUZ et al., 2001). Dalio e colaboradores (2018) utilizaram nove genomas de isolados diferentes de *P. parasitica* e identificaram em média 177 genes candidatos a efetores que apresentavam o motivo RxLR-ERR. Com análise de RNA-seq, a partir de um experimento *in vitro* foi possível reduzir esse número para cinco candidatos, uma vez que apenas cinco foram induzidos pelo oomiceto na presença do extrato da raiz de citros. Um desses genes, PpRxLR2, possui predição subcelular para o núcleo e foi capaz de suprimir resposta de hipersensibilidade em *Nicotiana benthamiana*, podendo ter ação similar no hospedeiro susceptível *Citrus sunki* (DALIO et al., 2018a). Outros efetores importantes na interação com citros, como NEPI, NPP1 e CBEL, também foram relacionados ao desenvolvimento da doença (FELLBRICH et al., 2002; KHATIB et al., 2004; OBWALD et al., 2014; WU et al., 2008; YAN; LIOU, 2005).

Outro patógeno que afeta a cultura de citros é transmitido pelo ácaro pertencente ao gênero *Brevipalpus*, causando uma doença conhecida como leprose. O *B. yothersi* é o responsável pela transmissão do vírus *Citrus leprosis virus* – CiLV (CHABI-JESUS et al., 2018; RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016), o qual causa danos severos aos frutos, folhas e ramos, afetando drasticamente a produtividade e até mesmo comprometendo a vida útil das plantas (BASTIANEL et al., 2010).

O vírus CiLV age de maneira localizada na planta, sendo considerada uma doença de ação não-sistêmica (RODRIGUES et al., 2003). Os sintomas da leprose são caracterizados pelo aparecimento de lesões cloróticas e/ou necróticas, lisas ou salientes, circulares ou alongadas quando próximas às nervuras foliares (LOCALI et al., 2003). Nas folhas, os sintomas iniciais frequentemente apresentam manchas amareladas com até 2 ou 3 cm de diâmetro. Com o passar do tempo as lesões aumentam de tamanho, tornando-se marrom-avermelhadas, podendo ser lisas ou salientes e com ou sem centro necrótico rodeados por um halo clorótico. Frutos verdes mostram lesões inicialmente amareladas, tornando-se escurecidas ou marrons rodeadas por um halo amarelado. Em estágio avançado de amadurecimento, ocorrem manchas escuras e deprimidas, podendo ser rodeadas por halo esverdeado. Nos ramos as lesões são corticosas e em casos extremos podem secar completamente, levando à morte das plantas (GARITA LC et al., 2013; ROSETTI et al., 1969). A capacidade dos ácaros *B. yothersi* de gerenciar a resposta das plantas favorecendo seu próprio desempenho sugere que eles secretam proteínas efetoras que são transmitidas pela saliva para as células da planta (ARENA et al., 2018).

Os fungos também são importantes patógenos de citros, com destaque para os gêneros *Phyllosticta* spp., *Colletotrichum* spp. e *Alternaria* spp. A espécie *Phyllosticta citricarpa* é responsável pela doença mancha preta do citros (MPC), que se caracteriza por apresentar diferentes lesões, sendo a mancha-dura o sintoma

mais característico, com lesões marrom-escuro na borda, um halo amarelo ao redor e depressão no centro, onde encontram-se os picnídios do fungo. A MPC afeta todas as espécies de *Citrus*, com exceção da laranja azeda (*C. aurantium*) e seus híbridos e limoeiros. O fungo pode estar presente na área do pomar e a doença pode demorar de 5 a 30 anos para se manifestar e se espalhar de forma epidêmica (KOTZE, 1981).

A podridão pós-colheita de frutos de citros é causada pelo fungo *Alternaria citri*. Já os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum abscissum* são considerados responsáveis pela doença podridão floral dos citros (PFC). A doença é caracterizada por lesões alaranjadas nas pétalas de flores, mas também afeta outras estruturas da flor, como pistilo, estigma e estilete (SILVA-JUNIOR et al., 2014; TIMMER et al., 1994). Os frutos recém-formados podem apresentar uma coloração amarelada que antecede a queda do fruto. Dessa forma, a doença também é conhecida como “queda prematura dos frutos” (QPF) (FEICHTENBERGER et al., 1997). Estudos de transcriptoma de *P. citricarpa* e *C. gloeosporioides* estão sendo investigados para a busca por candidatos a efetores envolvidos na patogenicidade desses patógenos (dados não publicados).

Já o gênero *Alternaria* é responsável por duas doenças diferentes em citros. A espécie *Alternaria alternata* é responsável pela mancha marrom de alternaria (MMA), afetando algumas espécies de tangerinas e seus híbridos. Este fungo também é responsável também pela mancha foliar do limão, afetando o limão “Rugoso”. Os principais sintomas são lesões necróticas causadas por uma toxina específica (toxina ACT, afetando tangerinas e toxina ACR, afetando limões) que é liberada pelo fungo nos primeiros estágios de infecção, afetando tanto folhas, quanto frutos e ramos (TIMMER et al., 1976). Essas toxinas são os principais efetores conhecidos desse patógeno, sendo considerados essenciais para o desenvolvimento da MMA (TSUGE et al., 2013). Outros dois efetores de *A. alternata* já foram relatados envolvidos no desenvolvimento da doença, sendo eles a enzima endogalacturonase (endoPG), provavelmente envolvida no início da colonização degradando a parede da planta (ISSHIKI et al., 1997), e a enzima lacase também é sugerida como estando envolvida na patogenicidade desse fungo em citros (DÍAZ et al., 2015).

4. Transcriptomas da interação citros/patógenos

A seleção natural age no fenótipo de forma que indivíduos com fenótipos favoráveis têm mais chances de sobreviver e se reproduzir do que aqueles com fenótipos menos favoráveis. Contudo, essa seleção pode ser feita com interferência do homem (seleção artificial), quando o cruzamento entre espécies com características interessantes é realizado por métodos tradicionais ou em laboratório. Entretanto, para se fazer o melhoramento em laboratório é necessário conhecer qual ou quais genes são responsáveis por essa característica desejada.

A utilização das técnicas de biologia molecular proporcionou uma revolução nos estudos sobre plantas, patógenos e suas interações, com muitos projetos

dedicados ao sequenciamento de genomas completos destes organismos, além de seus transcriptomas. O conhecimento do genoma das plantas e o seu transcriptoma quando são desafiadas por diferentes patógenos nos permite o entendimento dos mecanismos que levam à resistência contra o ataque de fitopatógenos, além da identificação dos genes envolvidos no processo. Em contrapartida, esse tipo de estudo também gera muitas informações gênicas em relação aos patógenos, o qual permite a identificação de genes relacionados à patogenicidade desses microrganismos. Essas informações podem auxiliar no entendimento de como a doença é causada e assim contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle, como por exemplo a utilização da tecnologia de RNA de interferência (RNAi) visando como alvo esses genes relacionados a patogenicidade.

Em citros já existem diversos trabalhos de genoma e transcriptoma que geraram muita informação a respeito dessa cultura e de diversos patógenos. Muitos dos genes identificados relacionados à resistência já estão sendo utilizados no programa de melhoramento genético de citros. Além disso, muitos patógenos dessa cultura também estão sendo estudados através dessas tecnologias. As principais doenças abordadas nesse tipo de estudo são a CVC, cancro cítrico, HLB, gomose, leprose dos citros.

O patossistema Citros/ *X. fastidiosa* já foi avaliado em diferentes condições para se entender a interação entre o hospedeiro e patógeno. No trabalho realizado dentro do CitEST (Citrus ESTs Sequencing Project), *Citrus reticulata* Blanco, tolerante à *X. fastidiosa*, foi desafiada com o patógeno e a expressão diferencial da planta hospedeira avaliada. Foram identificados diferentes genes relacionados à defesa da planta, significativamente induzidos após 30 dias da inoculação com a bactéria. Entre esses genes estão, um receptor NBS-LRR, P450, e alguns genes precursores das vias hormonais de ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) (SOUZA et al., 2007).

Na avaliação da expressão global de *C. reticulata* Blanco desafiada com *X. fastidiosa*, novamente foi encontrado um gene NBS-LRR sendo induzido após infecção (RODRIGUES et al., 2013). Adicionalmente, outros receptores do tipo LRR-RLK também foram induzidos, além de genes envolvidos no fortalecimento da parede vegetal através da via da auxina e genes que atuam nas vias hormonais de JA e ácido abscísico (ABA) (RODRIGUES et al., 2013). O gene LRR-RLK de *C. reticulata* foi introduzido através de transformação gênica em laranja doce (*C. sinensis*) que é extremamente suscetível à *X. fastidiosa*, visando conferir a essa variedade resistência a essa bactéria, porém mantendo as características desejáveis da laranja doce (dados não publicados).

O cancro cítrico é uma doença muito importante por existirem pouquíssimas variedades resistentes, sendo essas a calamondina, um híbrido (*Citrus microcarpa*, × *Citrofortunella microcarpa* ou × *Citrofortunella mitis*) cultivado predominantemente nas Filipinas e a Kumquat, espécie de origem asiática com tamanho pequeno de árvore. Contudo, essas espécies não são cultivadas no Brasil em larga escala. Já as laranjas

doces são consideradas moderadamente suscetível, as tangerinas são consideradas resistentes e alguns híbridos entre essas variedades apresentam tolerância a essa bactéria (VARGAS et al., 2013).

A nível transcricional, foi avaliada a modulação gênica de laranja doce e Kumquat após o desafio com *X. citri* subsp. *citri* através do *GeneChip* do *Citrus Affymetrix*, o qual tem informações do genoma de *Citrus*. A espécie tolerante apresentou a indução de genes envolvidos na resposta ao estímulo biótico, resposta de defesa e ligação catiônica, em comparação a variedade suscetível (FU et al., 2012). Neste estudo também foram encontrados diversos genes induzidos em Kumquat, como citocromo P450, endotransglicosilase de xiloglucano, fenilalanina-amônia liase, expansina, peroxidase, quitinase e receptores quinases indicando que a planta reconhece a bactéria e ativa o sistema de defesa (FU et al., 2012). Esses genes também foram encontrados induzidos em laranja doce como resposta a infecção por *Xanthomonas*, contudo a estirpe utilizada nesse trabalho foi a *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* pathotype C (Xaa), que curiosamente desencadeia respostas de defesa nessa variedade, porém é responsável pelo cancro cítrico em lima ácida (*Citrus aurantifolia*) (CERNADAS et al., 2008). Esses trabalhos poderão contribuir para a seleção de genes para utilizar na transformação genética visando à resistência a cancro cítrico.

Em contrapartida, já existem plantas de citros modificadas geneticamente resistentes a *X. citri* subsp. *citri*. A superexpressão do gene *npr1*, que é um regulador positivo chave na resistência adquirida sistêmica (SAR) em diferentes variedades de laranjas doces, apresentou aumento na resistência ao cancro cítrico (ZHANG; ZHOU, 2010). Outro grupo de pesquisadores também obteve laranja doce (Hamlin) superexpressando *npr1* e verificam em ensaios de avaliação de resistência a cancro cítrico uma redução no número de lesões quando comparado ao controle (BOSCARIOL-CAMARGO et al., 2016). Além disso, transformações visando resistência a *X. citri* subsp. *citri* também foram realizadas com o peptídeo antimicrobiano atacina A (BOSCARIOL et al., 2006; CARDOSO et al., 2010), com o gene *Xa21* do arroz (MENDES et al., 2010), o gene *RpfF* da *Xylella fastidiosa* (CASERTA et al., 2014), com a espermedina sistase (MdSPDS) de maçã, a qual funciona como inibidora da síntese de RNA (FU et al., 2011) e CsMAF1, qual reprime tRNA (SOPRANO et al., 2013).

Atualmente o HLB é a doença dos citros mais pesquisada mundialmente. Contudo, é um patossistema complexo por diversos motivos. Primeiramente, não existe um método eficiente para isolar e cultivar a bactéria *Candidatus Liberibacter* spp. (FLEITES et al., 2014). É um patossistema com muitas variáveis, ou seja, planta, bactéria, vetor e ambiente. E, principalmente, ainda não foi descrita resistência a essa doença, ou seja, todas as variedades de copa e porta-enxerto são suscetíveis ao HLB (BOVÉ, 2006).

Os sintomas de HLB são facilmente confundidos com características de deficiência nutricional, o que realmente ocorre como consequência da colonização

da bactéria nos vasos do floema (BOVÉ, 2006). Não há nenhuma conclusão sobre o mecanismo de patogenicidade de *C. Liberibacter* spp. (DA GRAÇA et al., 2016), porém a disfunção do floema parece ser a primeira alteração e tem como principal característica a deposição de calose nos poros da placa crivada impedindo o transporte de fotoassimilados para órgãos-drenos como folhas, flores, frutos e raízes (KOH et al., 2012). Contudo, com a evolução da doença, outros sintomas ocorrem como floradas fora de época e intensa desfolha dos ramos afetados, seca e morte de ponteiros, frutos dos ramos afetados ficam menores e com amadurecimento incompleto, além do desenvolvimento assimétrico em relação ao eixo central e sementes abortadas (BOVÉ; GARNIER, 2002; BOVÉ, 2006).

Para entender essas alterações fisiológicas em plantas com HLB, vários trabalhos de transcriptoma comparando citros sadio *versus* doente começaram a ser realizados. Esses trabalhos demonstraram diversas alterações na expressão de genes envolvidos em transporte de fotoassimilados, modificação e degradação de proteínas, metabolismo de carboidratos, respostas ao estresse biótico e abiótico, sinalização e fatores de transcrição e regulação hormonal (ALBRECHT; FIEHN, 2016; ALBRECHT; BOWMAN, 2009; MAFRA et al., 2013; ZHENG; ZHAO, 2013).

Existem ainda relatos da indução de vários genes envolvidos nas vias hormonais de SA e JA em frutos de *C. sinensis* com sintomas de HLB (MARTINELLI et al., 2012). A indução de genes relacionados às vias hormonais em citros com HLB se apresentaram proeminente nesse trabalho.

Com essas informações das respostas das plantas com HLB a nível transcricional, estudos funcionais começaram a ser realizados. Um transgênico de laranja doce superexpressando NPR1 um regulador chave na transdução de sinal associado à via do SA que culmina em SAR (resistência sistêmica adquirida) (KUC, 1982; VLOT, 2009) resultou em árvores com fenótipos normais que exibiram maior resistência ao HLB (DUTT et al., 2015). Plantas de citros com sintomas de HLB apresentaram redução na população bacteriana após tratamento com brassinosteróides (CANALES et al., 2016). Este trabalho revelou que as plantas tratadas com esse hormônio apresentaram a indução de genes de defesa a bactéria das vias hormonais SA e JA, sugerindo que essas defesas podem ser reguladas por brassinosteróides.

As pesquisas para o controle do HLB também têm avançado para o controle do vetor, *Diaphorina citri*. Uma das estratégias mais estudadas é o silenciamento gênico por RNAi (EL-SHESHENY et al., 2013; GALDEANO et al., 2017; HAJERI et al., 2014; KILLINY et al., 2014). A estratégia utilizada foi o silenciamento de genes importantes para a sobrevivência do vetor, o que se demonstrou eficiente para o controle da doença. Resultados obtidos indicam que o controle de insetos com RNAi pode ser obtido por dsRNA fornecidos através da planta (ANDRADE; HUNTER, 2016; HUNTER et al., 2012). Para a seleção desses genes alvos para RNAi, trabalhos de transcriptoma de *D. citri* foram essenciais demonstrando a importância dessa linha de pesquisa (FERRARA et al., 2015; FISHER et al., 2014; TIWARI et al., 2011).

A gomose e podridão de raízes, doenças causadas pela *P. parasítica*, podem afetar mais de 255 gêneros pertencentes a 90 famílias diferentes (COOKE et al., 2000; PANABIERES et al., 2016). Em citros, essa doença afeta principalmente variedades utilizadas como porta-enxerto e a disponibilidade de citros resistente é muito limitada, apesar de ser o método mais eficiente na prevenção dessa doença. *Poncirus trifoliata* e citrumelo Swingle são consideradas resistentes e tolerantes a *P. parasítica*, sendo boas opções para uso como porta-enxerto (SANDLER et al., 1989). Diante desses fatos, e na busca para entender os mecanismos de resistência a essa doença, além de compreender como esse patógeno ataca a planta hospedeira, trabalhos de transcriptoma começaram a ser realizados.

Utilizando um patossistema modelo, *Arabidopsis thaliana* / *P. parasítica*, foi verificada a modulação gênica da planta nos estágios iniciais da infecção pelo patógeno. Apesar de ser uma interação compatível, a planta ativou seu mecanismo de defesa no início da colonização do oomiceto. Vias do SA, JA e etileno (ET) foram ativadas em diferentes momentos do estabelecimento da interação. Outro fato importante desse trabalho foi que, mutantes de *A. thaliana* com deficiência na expressão das vias do SA, JA e ET foram mais suscetíveis em relação ao tipo selvagem à infecção (ATTARD et al., 2010).

Dalio et al. 2018 avaliaram a alteração transcricional de duas espécies de citros frente ao ataque de *P. parasítica*. Foram analisadas as repostas de *Citrus sunki*, altamente suscetível, e *P. trifoliata*, resistente. A espécie suscetível ativou vários genes relacionados às vias de sinalização de defesa SA, JA e ET, e genes relacionados à reação de hipersensibilidade (HR) que provavelmente culminam em necrose do tecido. Como o patógeno é hemibiotrófico, essa defesa acaba por não ser eficiente. Por outro lado, *P. trifoliata* não apresentou alteração na modulação da expressão gênica e desenvolvimento da doença, mesmo o patógeno expressando fortemente fatores de virulência (efetores) no momento da interação. Sugere-se que *P. trifoliata* apresente um tipo de resistência não hospedeira, no qual a planta depende de barreiras bioquímicas e anatômicas pré-formadas (DALIO et al., 2018b).

As principais variedades de laranjas doces também são acometidas pela leprose dos citros, sendo altamente suscetíveis ao vírus. Contudo, existem algumas fontes de resistência dentro do gênero *Citrus* como as limas ácidas, limões, algumas tangerinas e seus híbridos como o tangor ‘Murcott’ que apresentam elevado grau de resistência (BASTIANEL et al., 2006, 2018; RODRIGUES et al., 2003). Utilizando *A. thaliana* e *C. sinensis* foi verificado o perfil de expressão de alguns genes de defesa frente à infestação com ácaros virulíferos e não virulíferos. Nessa interação compatível, foi verificada a repressão de genes da via JA após a infecção por CiLV-C mediada por ácaros virulíferos. Entretanto, ocorreu a ativação da cascata de sinalização de defesa contra patógenos biotróficos (via de SA) e intensificação da produção de ROS, o que provavelmente está relacionado à morte celular ao redor do tecido infectado (ARENA et al., 2016).

Estudos de transcriptoma das interações MPC/Citros, MMA/Citros e Podridão floral/Citros também estão sendo investigadas (dados não publicados). É de extrema importância entender esses patossistemas devido à importância dessas doenças. O conhecimento de genes envolvidos na resistência ou suscetibilidade frente a esses fungos, dos diferentes genótipos de citros, poderão revelar alvos com potencial para o controle dessas doenças.

5. Conclusões

A grande diversidade de citros e seus patógenos expostos neste capítulo demonstram a dimensão do desafio pela busca por plantas resistentes a essas doenças. O melhoramento genético é, e continuará sendo, o principal mecanismo para obtenção de plantas comercialmente produtivas e resistentes a pragas e doenças. As novas tecnologias baseadas em sequenciamento em larga escala (de nova geração?) contribuem para a acuidade e aceleração do processo de seleção e/ou criação de genótipos resistentes. Porém, alguns genes que conferem essa resistência ou tolerância à patógenos não são encontrados em citros ou não podem ser transferidos via cruzamentos e seleção. Fato esse que pode ser contornado através da transformação genética de citros, que permite a transferência de determinada característica e pode ser útil como complementação dos programas de melhoramento (DONMEZ et al., 2013).

Portanto, nota-se a importância de estudos e obtenção de dados de genoma e transcriptoma tanto de variedades de citros quanto dos diferentes patógenos que os acometem. A partir de informações genômicas são possíveis estudos sobre as regiões que tem relevância tanto para a produção quanto para a resistência ou susceptibilidade dessa cultura a doenças. E, com isso, posteriormente, utilizar-se das estratégias de melhoramento genético e transformação genética a fim de se obter plantas com qualidade superior de produção e resistentes a maior quantidade de patógenos e estresses abióticos.

Referências

- Albrecht U, Fiehn O (2016). Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 107, p. 33–44.
- Albrecht U, Bowman KD (2009). Candidatus *Liberibacter asiaticus* and Huanglongbing effects on citrus seeds and seedlings. *HortScience*, v. 33, n. 7, p. 1967–1973.
- Albrecht U, Mccollum G, Bowman KD (2012). Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. *Scientia Horticulturae*, v. 138, p. 210–220.
- Alzate-Marin AL, Cervigni GDL, Moreira MA, Barros EG (2005). Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com

Ênfase em Feijoeiro e Soja. Fitopatologia Brasileira, v. 30, n. 4, 2005.

Andolfo G, Lovieno P, Frusciante L, Ercolano MR (2016). Genome-Editing Technologies for Enhancing Plant Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. December, p. 1–8, 2016.

Andrade EC, Hunter WB (2016). RNA interference–natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). *InTech*, p. 391– 409, 2016.

Arena GD, Bergamini MP, Tassi AD, Kitajima EW, Kubo KS, Freitas-Astúa J (2013). *Citrus leprosis virus C* infects *Arabidopsis thaliana*, the model for plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Pathology*, 95 : 448.

Arena GD, Ramos-González PL, Rogério LA, Ribeiro-Alves M, Casteel CL, Freitas-Astua J, Machado MA (2018). Making a Better Home: Modulation of Plant Defensive Response by *Brevipalpus* Mites. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1147. doi:10.3389/fpls.2018.01147.

Attard A, Gourques M, Callemeyn-Torres N, Keller H (2010). The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytologist*, 187: 449–460.

Barbosa-Mendes JM, Mourão Filho FAA, Filho AB, Harakava R, Beer SV, Mendes BMJ (2009). Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to *citrus canker*. *Scientia Horticulturae*, 122: 109–115.

Bastianel M, Oliveira AC, Cristofani M, Filho OG, Freitas-Astúa J, Rodrigues V, Astúa-Monge G, Machado MA (2006). Inheritance and Heritability of Resistance to Citrus Leprosis. *Phytopathology*, 96: 1092–1096.

Bastianel M, Cristofani-Yaly M, Oliveira AC, Freitas-Astúa J, Garcia AAF, Resende MDV, Rodrigues V, Machado MA (2009). Quantitative trait loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck) × *C. sinensis* L. Osb. *Euphytica*, 169: 101–111.

Bastianel M, Freitas-Astúa J, Kitajima EW, Machado MA (2010). The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica*, 32 : 211–220.

Bastianel M, Pereira-Martin JA, Novelli VM, Freitas-Astúa J, Nunes MA (2018). Citrus leprosis resistance within the citrus group. **VirusDisease**, 9 : 1-8.

Bergamin-Filho A, Kimati H, Amorim L (1995). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. In: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. [s.l.] Agronomica Ceres, p. 919.

Bered F, Barbosa Neto JF, Carvalho FIF (1997). DNA markers and their application in plant breeding. *Ciência Rural*, 27 : 513.

Boller T, Felix G (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406.

Boscariol-Camargo RL, Takita MA, Machado MA (2016). Bacterial resistance in AtNPR1 transgenic sweet orange is mediated by priming and involves EDS1 and PR2. *Tropical Plant Pathology*, 41: 341–349, dez.

Boscariol RC, Monteiro M, Takahashi EK, Chabregas SM, Vieira ML, Vieira L, Pereira L, Mourão Filho FDAA, Cardoso SC, Christiano R, Bergamin A, Barbosa JM, Azevedo F, Mendes

- BMJ (2006). Attacin A Gene from *Tricloplusia ni* Reduces Susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Transgenic *Citrus sinensis* 'Hamlin'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 530–536.
- Bové J, Garnier M (2002). Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, v. 163, n. 6, p. 1083–1098, 2002.
- Bové J (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*, 88 : 7–37.
- Brunings A M, Gabriel DW (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4 : 141–157.
- Canales E, Coll Y, Hernández I, Portieles R, García MR, López Y, Aranguren M, Alonso E, Delgado R, Luis M, Batista L, Paredes C, Rodríguez M, Pujol M, Ochagavia ME, Falcón V, Terauchi R, Matsumura H, Ayra-Pardo C, Llauger R, Pérez MC, Núñez M, Borrusch MS, Walton JD, Silva Y, Pimentel E, Borroto C, Borrás-Hidalg O (2016), '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids. *PLOS ONE*, 11. Published online. doi: 10.1371/journal.pone.0146223.
- Cardoso SC, Barbosa-Mendes JM, Boscariol-Camargo R, Christiano R, Bergamin A, Vieira ML, Mendes BMJ, Mourão Filho F (2010). Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28 : 185–192.
- Caserta R, Picchi SC, Takita MA, Tomaz JP, Pereira WL, Machado MA, Ionescu M, Lindow SE, Souza AA (2014). Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in Citrus Disrupts Signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and Thereby Its Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27 : 1241–1252.
- Cernadas RA, Camillo LR, Benetti CE (2008). Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, 9 : 609–631.
- Cervera M, Esteban O, Gil M, Gorris MT, Martínez MC, Peña L, Cambra M (2010). Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance. *Transgenic Research*, 19 : 1001–1015.
- Chabi-Jesus C, Ramos-González PL, Tassi AD, Guerra-Peraza O, Kitajima EW, Harakava R, Beserra Jr JEA, Salaroli RB, Freitas-Astúa J (2018). Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. *Plant Disease*, 102 : 1588–1598.
- Cong Q, Kinch LN, Kim BH, Grishin NV (2012). Predictive sequence analysis of the *Candidatus liberibacter asiaticus* proteome. *PLoS ONE*, 7. doi.org/10.1371/journal.pone.0041071.
- Cooke D, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Elsevier*, 30 : 17–32.
- Cristofani M, Machado MA, Grattapaglia D (1999). Genetic linkage maps of Citrus sunki Hort. ex. Tan. and Poncirus trifoliata (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. *Euphytica*, 109 : 25–32.
- Cristofani M, Novelli VM, Perin MSIA (2005). Programa de melhoramento de citros por hibridação controlada no centro apta citros "SYLVIO MOREIRA"/IAC Em 1997–2005. *LARANJA*, 26 : 121–134.

- Cuenca J, Aleza P, Garcia-Lor A, Ollitrault P, Navarro L (2016). Fine Mapping for Identification of Citrus Alternaria Brown Spot Candidate Resistance Genes and Development of New SNP Markers for Marker-Assisted Selection. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. December, p. 1–13, 2016.
- Da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G, Zhao H (2016). Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 58, n. 4, p. 373–387, abr. 2016.
- Da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, Do Amaral AM, Bertoloni MC, Camargo LE, Camarotte G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RM, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJ, Ferreira RC, Ferro MI, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EG, Lemos MV, Locali EC, Machado MA, Madeira AM, Martinez-Rossi NM, Martins EC, Meidanis J, Menck CF, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MT, Okura VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JA, Silva C, De Souza RF, Spinola LA, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RI, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setubal JC, Kitajima JP (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417 : 459–463.
- Dalio RJD, Maximo HJ, Oliveira TS, Dias RO, Breton MC, Felizatti H, Machado M (2018a). Phytophthora parasitica effector PpRxLR2 suppresses Nicotiana benthamiana immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018a.
- Dalio RJD Máximo HJ, Oliveira TS, Azevedo TM, Felizatti HL, Campos MA, Machado MA (2018b). et al. Molecular Basis of *Citrus sunki* Susceptibility and *Poncirus trifoliata* Resistance Upon *Phytophthora parasitica* Attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31 : 386–398.
- Díaz L, Del Río JA, Pérez-Gilabert M, Ortuño A (2015). Involvement of an extracellular fungus laccase in the flavonoid metabolism in Citrus fruits inoculated with *Alternaria alternata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89 : 11–17.
- Domínguez A, Mendoza AH, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002). Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding*, v. 10, n. 1/2, p. 1–10, 2002.
- Donmez D, Simsek O, Izgu T, Kacar YA, Mendi YY (2013). Genetic transformation in citrus. *The Scientific World Journal*, publicação online v. 2013.
- Dupuis M-È, Villion M, Magadán AH, Moineau S (2013). CRISPR-Cas and restriction–modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communication*, 4 : 1–7.
- Dutt M, Barthe G, Irey M, Grosser J (2015). Transgenic Citrus Expressing an Arabidopsis NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLOS ONE*, 10.
- El-Shesheny I, Hajeri S, El-Hawary I, Gowda S, Killiny N (2013). Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diuraphis citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. *Plos One*, 8 : 2–9.
- Erwin DC, Ribeiro O (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, MN: APS Press, American Phytopathological Society, 1996.

FAO (2015). Citrus Fruits Statistics 2015. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [s.l: s.n.].

Febres VJ, Lee RF, Moore GA (2008). Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. *Plant Cell Reports*, 27 : 93–104.

Feichtenberger E, Muller GW, Guirado N (1997). Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres.

Fellbrich G, Romanski A, Varet A, Blume B, Brunner F, Engelhardt S, Felix G, Kemmerling B, Krzymowska M, Nurnberger T (2002). NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *Plant Journal*, 32 : 375–390.

Ferrara TFS, Schneider VK, Kishi LT, Carmona AK, Alves MFM, Belasque-Júnior J, Rosa JC, Hunter WB, Henrique-Silva F, Soares-Costa A (2015). Characterization of a Recombinant Cathepsin B-Like Cysteine Peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): A Putative Target for Control of Citrus Huanglongbing. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, p. e0145132.

Fisher TW, Vyas M, He R, Nelson W, Cícero JM, Willer M, Kim R, Kramer R, May GA, Crow JA, Soderlund CA, Gang DR, Brown JK (2014). Comparison of Potato and Asian Citrus Psyllid Adult and Nymph Transcriptomes Identified Vector Transcripts with Potential Involvement in Circulative, Propagative Liberibacter Transmission. *Pathogens*, 3 : 875–907.

Fleites LA, Jain M, Zhang S, Gabriek DW (2014). “Candidatus Liberibacter asiaticus” prophage late genes may limit host range and culturability. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. AEM.01958-14, jul. 2014.

Fu X-Z, Chen C-W, Wang Y, Liu J-H, Moriguchi T (2011). Ectopic expression of MdSPDS1 in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) reduces canker susceptibility: involvement of H₂O₂ production and transcriptional alteration. *BMC Plant Biology*, v. 11, n. 1, p. 55, 28 mar. 2011.

Fu X-Z, Gong X-Q, Zhag Y-X, Wang Y, Liu J-H (2012). Different Transcriptional Response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* between Kumquat and Sweet Orange with Contrasting Canker Tolerance. *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, p. e41790.

FUNDECITRUS. Inventário de árvores e estimativa de safra de laranja 2017/18 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Araraquara: [s.n.].

Galdeano DM, Breton MC, Lopes JRS, Falk BW, Machado MA (2017). Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid , *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, p. 1–15, 2017.

Garita LC, Tassi AD, Calegario RF, Kitajima EW, Carbonell SAM, Freitas-Astúa J (2013). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Experimental local lesion host for *Citrus leprosis virus* C (CiLV-C) and some other cytoplasmic-type *Brevipalpus*-transmitted viruses. *Plant Disease*, 97:1346–1351.

Gutierrez AME, Luth D, Moore GA (1997). Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 16 : 745–753.

Hajeri S, Killiny N, El-Mohtar C, Dawson WO, Gowda S (2014). Citrus tristeza virus-based RNAi in citrus plants induces gene silencing in *Diaphorina citri*, a phloem-sap sucking insect vector of citrus greening disease. *Journal of biotechnology*, 176 : 42–49.

Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S (2009). Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,

22 : 115–122.

Hopkins DL (1989). *Xylella Fastidiosa*: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. Annual Review of Phytopathology, 27 : 271–290.

Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR (2012). Advances in RNA interference: dsRNA Treatment in Trees and Grapevines for Insect Pest Suppression. Southwestern Entomologist, 37 : 85–87.

Isshiki T, Takeichi M, Nose A (1997). The role of the msh homeobox gene during *Drosophila* neurogenesis: implication for the dorsoventral specification of the neuroectoderm. Development, 124 : 3099–109.

Jalan N, Kumar D, Andrade MO, Yu F, Jones JB, Graham JH, White FF, Setubal JC, Wang N (2013). Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. BMC Genomics, 14 : 551.

Jia H, Zhang Y, Orbovic V, Xu J, White FF, Jones JB, Wang N (2017). Genome editing of these disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. Plant Biotechnology Journal, 15 : 817–823.

Jia H, Wang N (2014a). Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. Plant Cell Reports, 33 : 1993–2001.

Jia H, Wang N (2014b). Targeted genome editing of sweet orange using *Cas9*/sgRNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4.

Khatib M, Lafitte C, Esquerré-Tugayé M-T, Bottin A, Rickauer M (2004). The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. New Phytologist, 162 : 501–510.

Killiny N, Hajeri S, Tiwari S, Gowda S, Stelinski LL (2014). Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. **PLoS ONE**, 9 : 1–8.

Koh EJ, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP, Kang BH (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. Protoplasma, 249 : 687–697.

Kotze JM (1981). Epidemiology and Control of Citrus Black Spot in South Africa. Plant Disease. 65 : 945–950. DOI: 10.1094/PD-65-945.

Kuč J (1982). Induced Immunity to Plant Disease. **BioScience**, 32 : 854–860.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. The Plant cell, 16 : 3496–507.

Li WB, Pria WD, Lacava PM, Qin X, Hartung JS (2003). Presence of *Xylella fastidiosa* in Sweet Orange Fruit and Seeds and Its Transmission to Seedlings. Phytopathology, 93 : 953–958.

Lima RPM, Curtolo M, Merfa MV, Cristofani-Yaly M, Machado MA (2018). QTLs and eQTLs mapping related to citrandarins' resistance to citrus gummosis disease. BMC Genomics, 19 : 1–17.

Locali EC, Freitas-Astúa J, Souza AA, Takita MA, Astúa-Monge G, Antonioli R, Kitajima EW,

Machado MA (2003). Development of a Molecular Tool for the Diagnosis of Leprosis, a Major Threat to Citrus Production in the Americas. *Plant Disease*, 87 : 1317–1321.

López C, Cervera M, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2010). Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime. *Molecular Plant Pathology*, 11 : 33–41.

Luz EDMN, Santos AF, Matsuoka K, Bezerra JL (2001). Doenças causadas por Phytophthora no Brasil. Campinas: [s.n.], p. 1-22.

Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J, Machado MA (2013). *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC genomics*, 14 : 247.

Martinelli F, Aratsu SL, Albrecht U, Reagan RL, Phu ML, Britton M, Buffalo V, Fass J, Leicht E, Zhao W, Lin D, D’Souza R, Davis CE, Bowman KD, Dandekar AM (2012). Transcriptome Profiling of Citrus Fruit Response to Huanglongbing Disease. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, p. e38039.

McNeely JA, Miller K, Mittermeier RA, Reid WV, Werner TB (1990). Conserving the world’s biological diversity. *Conserving the world’s biological diversity.*, 193p.

Memdes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourão Filho FAA, Bergamin Filho A (2010). Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathology*, 59 : 68–75.

Moreira LM, Almeida Jr NF, Potnis N, Digiampietri LA, Adi SS, Bortolossi JC, Silva AC, Silva AM, Moraes FE, Oliveira JC, Souza RF, Facincani AP, Ferraz AL, Ferro MI, Furlan LR, Gimenez DF, Jones JB, Kitajima EW, Laia ML, Leite Jr RP, Nishiyama MY, Rodrigues Neto J, Nociti LA, Norman DJ, Ostroski EH, Pereira Jr HA, Staskawicz BJ, Tezza RI, Ferro JÁ, Vinatzer BA, Setubal JC (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics*, 11 : 238.

Nascimento R, Gouran H, Chakraborty S, Gillespie HW, Almeida-Souza HO, Tu A, Rao BJ, Feldstein PA, Bruening G, Goulart LR, Dandekar AM (2016). The Type II Secreted Lipase/ Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. *Scientific Reports*, 6 : 1–17.

Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-Inglis MC (2001). Recursos Genéticos e Melhoramento - Plantas. Rondonópolis: Fundação MT.

Oßwald W, Fleischmann F, Rigling D, Coelho AC, Cravador A, Diez J, Dalio RJ, Horta Jung M, Pfanz H, Robin C, Sipos G, Solla A, Cech T, Chambery A, Diamandis S, Hansen E, Jung T, Orlikowski LB, Parke J, Prospero S, Werres S (2014). Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*, 44 : 169–190.

Panabieres F, Ali GS, Allagui MB, Dalio RJD, Gudmestad NC, Kuhn ML, Guha Roy S, Schena L, Zampounis A (2016). *Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen. *Phytopathologia Mediterranea*, 55 : 20–40.

Pitino M, Hoffman MT, Zhou L, Hall DG, Stocks IC, Duan Y (2014). The phloem-sap feeding mealybug (*Ferrisia virgata*) carries “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations that do not cause disease in host plants. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1.

Pitino M, Armstrong CM, Cano LM, Duan Y (2016). Transient Expression of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* Effector Induces Cell Death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in*

Plant Science, 7 : 982.

Pitino M, Allen V, Duan Y (2018). LasΔ5315 Effector Induces Extreme Starch Accumulation and Chlorosis as Ca. Liberibacter asiaticus Infection in Nicotiana benthamiana. Frontiers in Plant Science, 9 : 1–11.

Puttamak T, Zhou L, Thaveechai N, Zhang S, Armstrong CM, Duan Y (2014). Genetic diversity of Candidatus liberibacter asiaticus based on two hypervariable effector genes in Thailand. PLoS ONE, 9 : 1–20.

Ramos-González PL, Chabi-Jesus C, Guerra-Peraza O, Breton MC, Arena GD, Nunes MA, Kitajima EW, Machado MA, Freitas-Astúa J (2016). Phylogenetic and molecular variability studies reveal a new genetic clade of *Citrus leprosis virus C*. Viruses, 8: 1–25.

Rodrigues CM, Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA (2013). RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. BMC Genomics, 14 : 676.

Rodrigues JCV, Kitajima EW, Childers CC, Chagas CM (2003). Citrus Leprosis Virus Vected by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on Citrus in Brazil. Experimental and Applied Acarology, 30 : 161–179.

Rossetti V, Lasca C, Negretti S (1969). New developments regarding leprosis and zonatechlorosis in citrus. Proc. Int. Soc. Citricult, 3 : 1453–1456.

Rossetti V, De Negri JD (2011). Clorose variegada dos citros – revisão. Citrus Research and Technology, 32 : 61–66.

Sandler H, Timmer LW, Graham JH, Zitko SE (1989). Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica* and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. Plant Disease, 73 : 902–906.

Sansaloni C, Petroli C, Jaccoud D, Carling J, Detering F, Grattapaglia D, Kilian A (2011). Diversity Arrays Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. BMC Proceedings, 5 : P54.

Silva-Junior GJ, Sposito MB, Marin DR, Amorim L (2014). Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop. Crop Protection, 59 : 51–56.

Simpson AJG, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, Alvarenga R, Alves LMC, Araya JE, Baia GS, Baptista CS, Barros MH, Bonaccorsi ED, Bordim S, Bové JM, Briones MRS, Bueno MRP, Camargo AA, Camargo LEA, Carraro DM, Carrer H, Colauto NB, Colombo C, Costa FF, Costa MCR, Costa-Neto CM, Coutinho LL, Cristofani M, Dias-Neto E, Docena C, El-Dorri, Facincani AP, Ferreira AJS, Ferreira VCA, Ferro JA, Fraga JS, França SC, Franco MC, Frohme M, Furlan LR, Garnier M, Goldman GH, Goldman MHS, Gomes SL, Gruber A, Ho PL, Hoheisel JD, Junqueira ML, Kemper EL, Kitajima JP, Krieger JE, Kuramae EE, Laigret F, Lambais MR, Leite LCC, Lemos EGM, Lemos MVF, Lopes SA, Lopes CR, Machado JA, Machado MA, Madeira AMBN, Madeira HMF, Marino CL, Marques MV, Martins EAI, Martins EMF, Matsukuma AY, Menck CFM, Miracca EC, Miyaki CY, Monteiro-Vitorello CB, Moon DH, Nagai MA, Nascimento ALTO, Netto LES, Nhani A, Nobrega FG, Nunes LR, Oliveira MA, de Oliveira MC, de Oliveira RC, Palmeri DA, Paris A, Peixoto BR, Peixoto BR, Pereira GAG, Pereira HA, Pesquero JB, Quaggio RB, Roberto PG, Rodrigues V, Rosa AJM, de Rosa VE, de Sá RG, Santelli RV, Sawasaki HE, da Silva ACR, da Silva Am, da Silva FR, da Silveira JF, Silvestri MLZ, Siqueira WJ, de Souza AA, de Souza AP, Terenzi MF, Truffi D, Tsai

SM, Tsuchako MH, Vallada H, Van Sluys MA, Verjovski-Almeida S, Vettore AL, Zago MA, Zatz M, Meidanis J, Setubal JC (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* consortium of the organization for nucleotide sequencing and analysis, São Paulo, Brazil. *nature.com*, 406 : 151-157.

Singh S, Rajam MV (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15 : 3–22.

Siviero A, Cristofani M, Furtado EL, Garcia AA, Coelho AS, Machado MA (2006). Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. *Journal of Applied Genetics*, 47 : 23–28.

Soprano AS, Abe VY, Smetana JHC, Benedetti CE (2013). Citrus MAF1, a repressor of RNA Pol III, binds the *Xanthomonas citri* canker elicitor PthA4 and suppresses citrus canker development. *Plant Physiology*, 163 : 232-242.

Souza AA, Takita MA, Coletta Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA (2007). Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetics and Molecular Biology*, 30 : 965–971.

Tabassum AS, Ellur V (2017). Applications of CRISPR-Cas system in Plant Pathology: A Review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5 : 916–919.

Talon M, Gmitter FG (2008). Citrus genomics. *International journal of Plant Genomics*, v. 2008. Doi: [dx.doi.org/10.1155/2008/528361](https://doi.org/10.1155/2008/528361)

Teixeira JEC (2005). Genes de defesa de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*: expressão constitutiva e induzida por *Phytophthora parasitica*. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS.

Timmer LW, Agostini JP, Zitko SE, Zulficar M (1994). Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease*, 78 : 329–334.

Timmer LW, Solel Z, Orozco-Santos M (2000). *Alternaria* brown spot of mandarins. *Compendium of Citrus Diseases*, 2 : 19.

Tiwari S, Gondhalekar AD, Mann RS, Scharf ME, Stelinski LL (2011). Characterization of five CYP4 genes from Asian citrus psyllid and their expression levels in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected and uninfected psyllids. *Insect Molecular Biology*, 20 : 733–744.

Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, Ohtani K, Kodama M, Akagi Y, Egusa M, Yamamoto M, Otani H (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37 : 44–66.

Vargas RG, Gonçalves-Zuliani AMO, Croce Filho J, Carvalho SA, Nocchi PTR, Nunes WMC (2013). Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. *Summa Phytopathologica*, 39 : 235–241.

Vlot A (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol*, 47 : 177–206.

Wang N, Trivedi P (2013). Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. *Phytopathology*, 103 : 652–665.

Whiteside JO (1976). Newly recorded *Alternaria* induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Disease Reporter*, 92 : 34–37.

- Wu CH, Yan HZ, Liu LF, Liou RF (2008). Functional characterization of a gene family encoding polygalacturonases in *Phytophthora parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 : 480–489.
- Yan HZ, LIOU RF (2005). Cloning and analysis of pppg1, an inducible endopolygalacturonase gene from the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genetics and Biology*, 42 : 339–350.
- Yang L, Hu C, Li N, Zhang J, Yan J, Deng Z (2011). Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease. *Plant Molecular Biology*, 75 : 11–23.
- Zambolim L, Júnior WCDeJ, Pereira OL (2012). O Essencial da Fitopatologia - Volume 1. Volume 1 ed. Viçosa: [s.n.].
- Zhang G, Ren Y, Sun H, Guo S, Zhang F, Zhang J, Zhang H, Jia Z, Fei Z, Xu Y, Li H (2015). A high-density genetic map for anchoring genome sequences and identifying QTLs associated with dwarf vine in pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *BMC Genomics*, 16 : 1101.
- Zhang J, Zhou JM (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular plant*, 3 : 783–793.
- Zheng ZL, Zhao Y (2013). Transcriptome comparison and gene coexpression network analysis provide a systems view of citrus response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection. *BMC Genomics*, 14 : 27.
- Zhou L, Powell CA, Li W, Irey M, Duan Y (2013). Prophage-mediated dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations, the destructive bacterial pathogens of citrus huanglongbing. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12.
- Zou H, Gowda S, Zhou L, Hajeri S, Chen G, Duan Y (2012). The Destructive Citrus Pathogen, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Encodes a Functional Flagellin Characteristic of a Pathogen-Associated Molecular Pattern. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9.

RNAi based transgenic common bean resistant to *Bean golden mosaic virus*

Josias Correa de Faria¹
Francisco José Lima Aragão²

Abstract

Bean golden mosaic virus (BGMV) belongs to the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*). The majority of the *Begomovirus* genome comprises two single-stranded DNA molecules, designated as DNA-A and DNA-B, both of which are essential for plant infectivity. Genes from DNA-A encode proteins responsible for viral replication (*AC1* and *AC3*), regulation of gene expression (*AC2*), and particle encapsidation (*AV1*), whereas the two genes from DNA-B encode proteins involved in cell-to-cell and long-distance movement within plant tissues and host range and symptom modulation. *AC1* encodes a complex, multifunctional protein (Rep) that acts as a rolling-circle replication initiation factor, which is the only protein strictly essential for viral genome replication and is capable of regulating its own expression, whereas *AC3* encodes a replication enhancer protein (REn). Several strategies have been employed for genetically engineering resistance to viruses in transgenic plants. For begomoviruses, most of them have involved the expression of truncated defective genes. RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing mechanism that mediates resistance to both endogenous parasitic and exogenous pathogenic nucleic acids, as well as regulates the expression of protein-coding genes. Silencing the expression of the *AC1* viral gene, by sequence-specific degradation of target mRNA interfering with viral replication, was expected to reduce or prevent viral DNA accumulation and, consequently, the appearance of symptoms. Two of 22 transgenic lines (namely 2.3 and 5.1) showed high resistance (~93% of the plants were BGMV symptom-free) upon inoculation at high pressure (>300 viruliferous whiteflies per plant during the plant's entire life cycle) and at a very early stage of plant development. Biosafety evaluations were carried out in order to demonstrate the safety of transgenic line Embrapa 5.1 to the environment and human and animal health. The *Phaseolus* resistance obtained to BGMV, the stability of the trait across generations and its usefulness in the management of a disease through immunity will be discussed.

¹Embrapa Rice and Beans; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

1. Introduction

2. Common bean and its importance for the Brazilian population

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a member of the family Fabaceae, and constitutes a significant source of dietary protein for human being nutrition, besides its fiber and minerals content (Reyes-Moreno and Paredes-López, 1993; Broughton et al. 2003; FAO, 2018). It is a staple food especially for developing countries such as those in most Latin America and Africa where consumption ranges from about 20 kg up to 66 kg per capita/year, respectively (Petry et al. 2015). In Brazil, the area cultivated with beans reached 3.180 thousand hectares (3280 estimated for 2018); with total production of 3.400 thousand of tons (3370 estimated for 2018) for 2016/2017. Between the years of 2002 and 2015 the total production in Brazil varied from 2.9 to 3.7 million tons yearly. These totals still may not supply the demand, with yearly imports typically ranging from nearly 100,000 tons to more than 300,000 tons and an export of roughly 125.000 tons. Brazil is the largest producer and consumer, according to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). The mean productivity was 1.389 kg ha⁻¹ in 2017 (Embrapa, 2017).

The most important yield constraints for tropical regions are diseases, insect pest, drought and low soil fertility, which may prevent the expression of the full genetic capacity of the cultivars. Since the late sixties and early seventies the incidence and the prevalence of *Bean golden mosaic virus* (BGMV) has made it to become the most single devastating viral disease of common beans except for the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The effect of this disease, alone, may account for the importation needs of the country.

Brazil has typically three bean growing seasons (Embrapa, 2017). About 44.5% of the production comes from the “rainy season” which expands from August through November. About 34.4% comes from the “dry season” which usually goes from mid- February until mid-March. The third growing season also is known as “winter crop” or “irrigated crop” usually sown between April and July and represented about 21.1% of the total production in the 2016/2017 crop year (CONAB, 2018). The first two seasons are responsible for 79% of the whole bean production in the country and are essentially carried out by small farmers using mostly family labor and characterized by low level of technology input; the average grain yield is 1297 kg/ha (data from crop 2016/2017). The third season crop is essentially carried out under center pivot sprinkler irrigation by entrepreneurs dedicated to bean production that uses modern technology; as a result, the grain yield is 2462 to over 3000 kg/ha.

Golden mosaic of common beans (*Bean golden mosaic virus* - BGMV)

Morales and Andersen (2001) credit the science of “geminivirology” back to Baur in 1905, while the discovery of what would be named “geminivirus” is attributed

to a group of plant virologists from Brazil (Costa, 1965). Costa (1937) investigated the mosaic disease of the cultivated malvaceous plant – cotton. Silberschmidt (1943) published the “Studies on the Experimental Transmission of the Infectious Chlorosis of the Malvaceae”, indicating his interest in the studies conducted by Baur on the etiology of malvaceous chlorosis. Orlando and Silberschmidt (1946), first observed that the causal agent of the “infectious chlorosis of Malvaceae” was transmitted by *B. tabaci*.

First report BGMV was in the decade of 1960 (Costa, 1965). this initial observation was that the disease was of minor importance and restricted. By the 1970's several epiphytotics were registered in dry season crops in the South, Southwest, and West Central Brazil, with severe yield reduction (Costa, 1975). The epiphytotics were attributed to the tremendously high population of whitefly, into the ever-expanding soybean crop, and at the end of this latter crop would migrate to the common beans just planted (Costa, 1975).

The characteristic disease symptoms are the yellow-green mosaic of leaves, stunted growth, and distorted pods (Figure 1). The disease is considered a major constraint on bean production in Latin America and causes significant yield losses (Morales, 2006; Morales and Anderson, 2001; Rodrigues-Pardina et al. 2011).

Since 1972, Brazilian bean production has been severely reduced by golden mosaic. There is no accurate data for the losses occurred, but it is believed that this disease causes annual reductions in yields in the range of 90.000–280.000 tons and that approximately 180.000 ha became unsuitable for common bean crops in the dry season in Brazil. Extensive screening of common bean germplasm for resistance to BGMV has not yielded genotypes with high resistance to the virus. Indeed, of more than 30.000 accessions of *Phaseolus vulgaris* and some accessions of *P. lunatus*, *P. acutifolius* and *P. coccineus* evaluated under field and greenhouse conditions, not a single accession has proven immune (Blair and Morales, 2008). Resistance is often unsatisfactory and commercial cultivars are susceptible to early, moderate, or severe infection (Garrido-Ramirez et al. 2000; Morales and Anderson, 2001; Seo et al. 2004). There are reports of bean lines with moderate disease resistance in Brazil (Bianchini, 1999) but they will not withstand early infection. Attempts to find germplasm with a high level of resistance has failed. The low level of reduction in the observed symptomatology is difficult to transfer due to low heritability (Pessoni et al. 1997; Bianchini, 1999). Breeding for disease resistance when heritability is very low has been difficult to achieve, and therefore the disease management has focused on controlling the insect vector – the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. The great ability of the insects to move from neighbor soybean crops associated with their high efficiency in transmitting BGMV lead to the chemical control not being sufficient under high vector population. Soybeans are the single most important host for BGMV considering the extent of its cultivation. Nevertheless, apparently, BGMV does not cause damage to the crop, otherwise, BGMV has a narrow host range (Nagata et al. 2016).

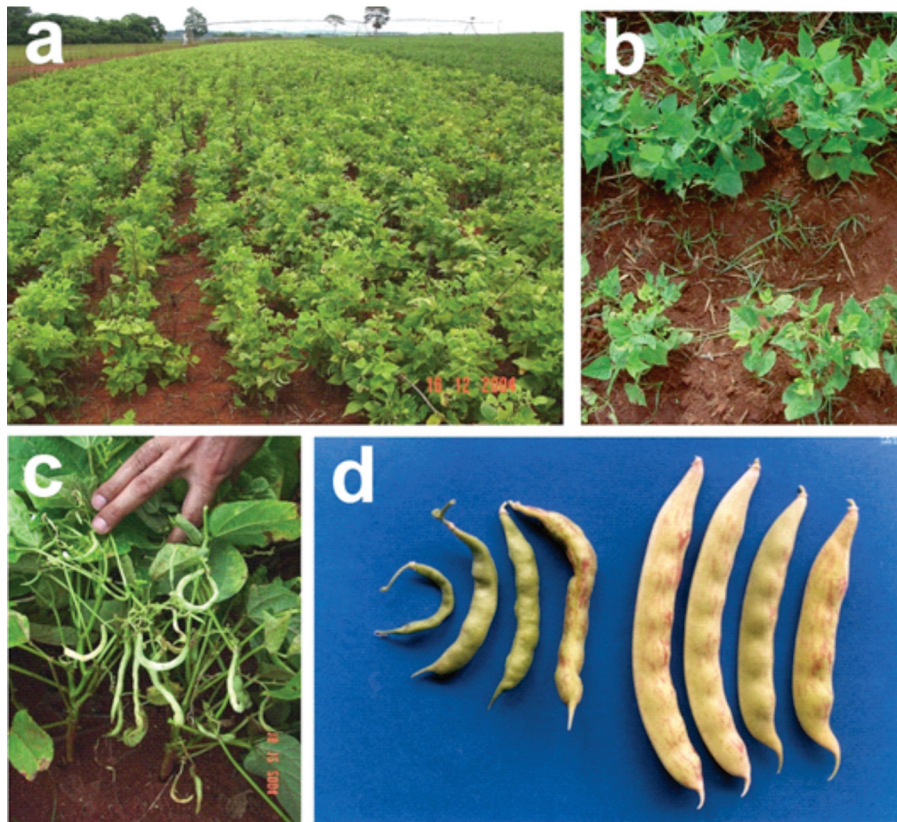


FIGURE 1. Disease symptoms caused by *Bean golden mosaic virus*. a) Field with nearly all plants diseased; b) Plants with mosaic and dwarfing symptoms (lower part) and healthy plants on upper part; c) Dwarfed plant showing pod deformations. (d) Pods from infected plants on left and from healthy plants on the right.

The geminiviruses belong to the family Geminiviridae, comprising nine genera, with more than 441 species (Zerbini et al. 2017; Rojas et al. 2018), one of the largest plant virus family. As a group it infects a wide range of economically important crop species such as common bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*), (family Fabaceae), tomato (*Solanum lycopersicum*) (family Solanaceae), cassava (*Manihot esculenta*) and cotton (*Gossypium hirsutum*) (family Malvaceae), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) (family Poaceae), and squash (*Cucurbita* spp., (family Cucurbitaceae). Together, the geminiviruses have been recognized as a

major threat to agriculture causing significant worldwide crop losses. *Bean golden mosaic virus* belongs to the genus *Begomovirus*, whose genome has two components named A and B. The first isolate sequenced from Brazil, has an A component with 2617 nucleotides (GenBank: M88686.1) and the B component with 2580 nucleotides (GenBank: M88687.1). The common region has 190 nucleotides and shares 91% identity between the A and B components. (Figure 2). DNA A encodes proteins associated with viral DNA replication, encapsidation, vector transmission as well as the viral suppressor of RNA silencing. DNA B encodes proteins involved in the movement of virus particles (Hanley-Bowdoin et al. 2000; Ramesh et al. 2017).

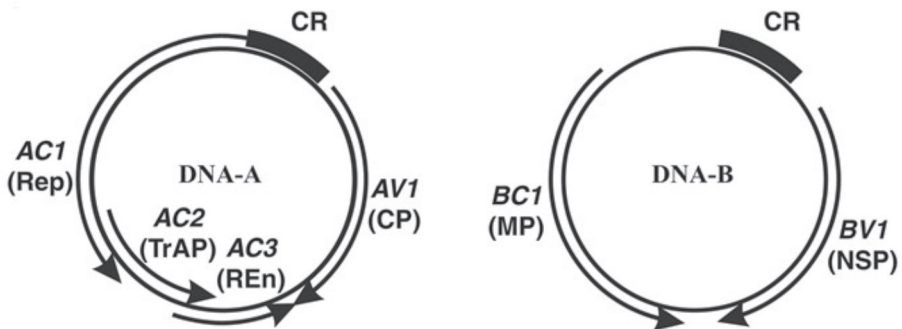


FIGURE 2. Illustration of the genome of BGMV. Common region and open reading frames are depicted.

3. Genetic Engineering of resistance to BGMV

The cloning of BGMV from Brazil and the complete DNA sequence was finished by 1999, and thus paved the way to attempt strategies involving genetic engineering for disease resistance. The concept of pathogen-derived resistance has also been established for some viruses (Sanford and Johnson, 1985), but not for geminiviruses. The imperative need to handle consumers objection to transgenic crops was already a reality, but on the other hand, we needed to face the challenge to find an efficient disease control solution. BGMV has been a challenge for plant breeders and plant pathologists as well as plant entomologists, because no natural immunity or high level of disease resistance has been identified in genotypes of *Phaseolus* which could be otherwise transferred to other common beans by traditional breeding (Faria et al. 2006; Morales and Anderson, 2001; Blair and Morales, 2008).

4. Antisense of ORFs AC1, AC2, AC3 and BC1

Our research group transformed beans, cv Olathe pinto, with a construct with the antisense of the block AC1, AC2, AC3 e the ORF BC1. Two of the transformed progeny lines (26-16-27 and 26-16-36) had a significant delay in symptoms development (Figure 3). Usually, these plants showed a darker green leaf color before showing golden mosaic. Even 40 days after inoculation, plants within both lines showed no symptoms or milder symptoms that consisted of limited chlorosis, or only blotches on the top leaves, with no significant growth reduction and pod malformation. The chlorosis symptoms were confined to the plant part from which the symptoms started, as usual. A few plants never showed any symptoms. On the other hand, the progeny of the transgenic lines 44-22 and 26-2, which also has the antisense genes, showed no delay on the disease onset or any reduction in symptoms development and severity (Figure 3).

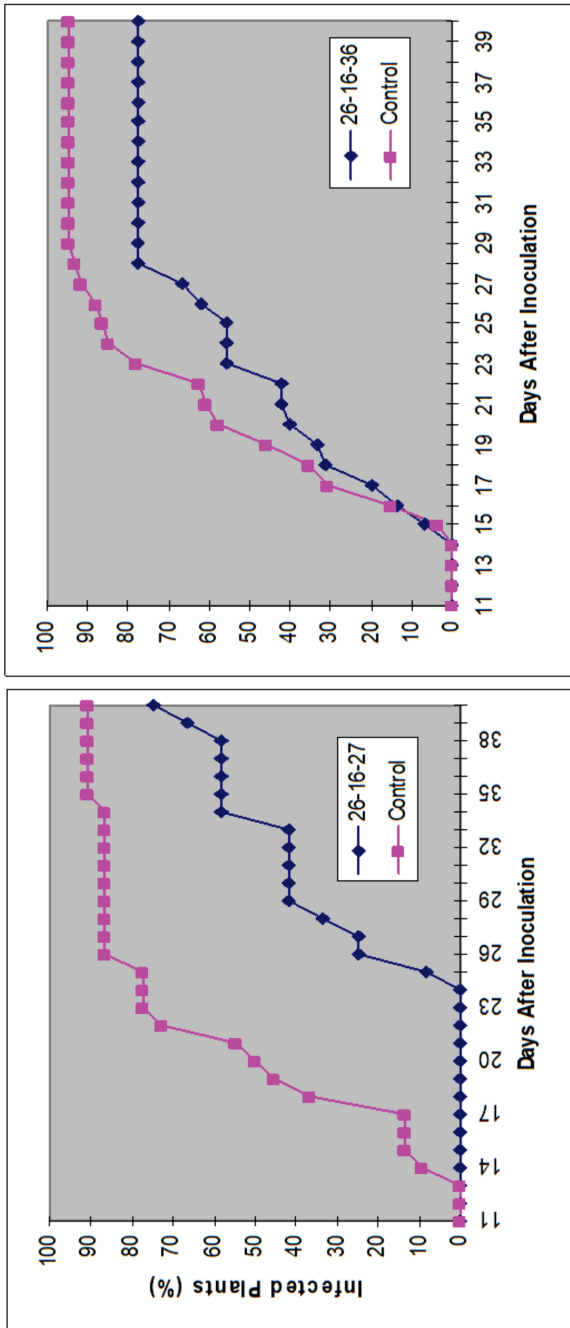


FIGURE 3. Delayed symptom expression expressed as the percentage of infected plants.

5. Transdominant lethal construct

The REP protein is the only necessary and sufficient protein for the virus replication (Hanley-Bowdoin, et al. 2013). The replication of geminivirus occurs via a mechanism known as rolling-circle, which is similar to what is known for bacteriophages such as Φ X174. It is well established that the rep gene encodes a multifunctional protein complex to initiate the viral replication (Fontes et al. 1994). Rep is the only geminiviral gene necessary for replication, while *ren* increases the efficiency of the rep protein-directed replication. The viral process of infection starts when a whitefly has fed in an infected host and therefore is carrying the virus; then, it feeds on the phloem of a healthy leaf and transmits virions to these phloem-associated cells. At this point, the ssDNA is released from the virion. According to Bowdoin et al (2013), this ssDNA becomes dsDNA when host DNA polymerases use RNA oligonucleotides to prime the syntheses of the complementary strand. By its turn, this dsDNA is transcribed by host RNA polymerase II, thus producing the REP protein. Then, the REP protein initiates viral replication by a combination of rolling circle replication and recombination-dependent replication (Jeske et al. 2001). The REP protein putative nicking motif as well, as NTP binding motifs of BGYMV, were confirmed in studies by Hanson et al (1995) and Hoogstraten et al (1996). Mutation of these motifs, isolated or together, inhibited native REP ability to replicate the A component or the B component. Altogether, these as well as other studies indicated that the rep gene is an extremely attractive target to engineer resistance to geminiviruses.

Our studies, using tobacco NT-1 cells indicated that the mutation in the amino acid 262 (D-Aspartic to R arginin) was able to knock down the complete replication of the A component of BGMV (Figure 4). We transformed beans with this construct to test if we could use this strategy to control the disease. All proportions evaluated of the mutant rep to the A component of BGMV was able to inhibit the A replication in the protoplast cells. It should be noticed that the A component replicates itself in protoplasts (but not in plants).

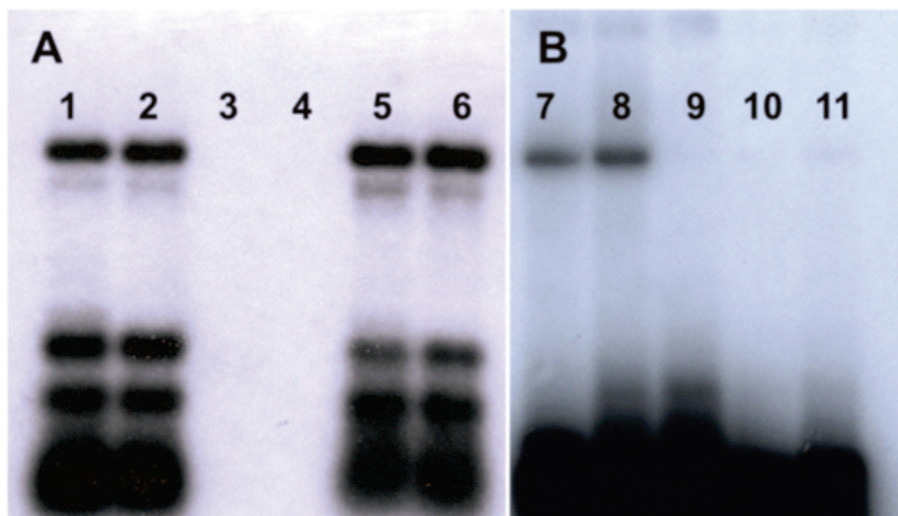


FIGURE 4. Replication of BGMV in protoplasts of *N. tabacum*. Part A. well 1- Component A; 2- A and B; 3- B; 4- non-inoculated; 5- A + WT-rep gene; 6- B + WT rep gene; Part B. Wells 7- A; 8- A and B; 9, 10, 11- A + Rep M (D262R), in the proportions of 1:25, 1:50 and 1:100.

The transgenic bean line Olathe M1/4 expressed the mutant Rep protein in all plant parts, except the seeds (Faria et al. 2006; Figure 5).



FIGURE 5. Western blot of proteins extracted from a transgenic plant expressing the mutated rep protein. Wells: 1- Leaf non-transgenic-NT (8-days after inoculation with BGMV); 2- Leaf NT – non-inoculated; 3- Leaf T non -inoculated; 4- Stem NT; 5- Stem T; 6- Seed NT; 7- Seed T; 8- Flower NT; 9- Flower T. antiserum prepared against Rep protein of BGYMv was kindly supplied by Prof Linda Hanley-Bowdoin.

Resistance to the cognate virus was observed to be dependent on the amount of virus, based on the population of viruliferous whiteflies used for inoculation (Figure 6). We, therefore, concluded that to get highly resistant plants it would be necessary

to overexpress the mutated rep gene by many folds of that which was obtained. Also, interesting, the resistance was active against BGYMV, under mechanical inoculation.

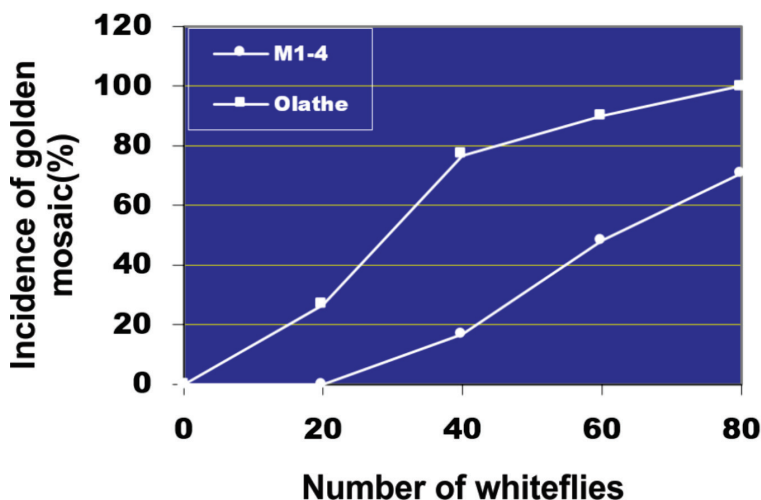


FIGURE 6. Observed disease resistance based on disease incidence according to the number of whiteflies used for inoculation.

6. The RNAi technology

The phenomenon of gene silencing was observed during the 1990's, and named as post-transcriptional gene silencing (PTGS) in different organisms, including plants (Baulcombe, 2000). RNA interference (RNAi) involves sequence-specific gene regulation induced by dsRNA, leading to inhibition of translation or transcription. Accordingly, it mediates resistance to both endogenous parasitic and exogenous pathogenic nucleic acids, as well as regulates the expression of protein-coding genes (Herr 2005). Wesley et al (2001) were able to demonstrate the silencing of genes in plants using constructs designed to encode self-complementary hairpin RNA (hpRNA). The self-complementary RNA transcripts from a dsRNA that triggers a sequence-specific mRNA degradation in a process known as RNAi. dsRNA is processed by an RNase III, called Dicer, into small interfering RNA (siRNAs). The strand of the interfering RNA which is complementary to the target RNA is incorporated into a multiprotein complex (RISC) leading to mRNA degradation and gene silencing. Fuentes et al (2006) observed that DNA viruses such as geminiviruses

can induce gene silencing even though this phenomenon does not hamper the virus completely.

The construct used for bean transformation is depicted in Figure 7. Besides the fragment derived from BGMV it has the gene Ahas from *Arabidopsis thaliana*, to allow for *in vitro* selection of putatively transformed explants by conferring tolerance to imidazolinone compounds, such as Imazapyr.

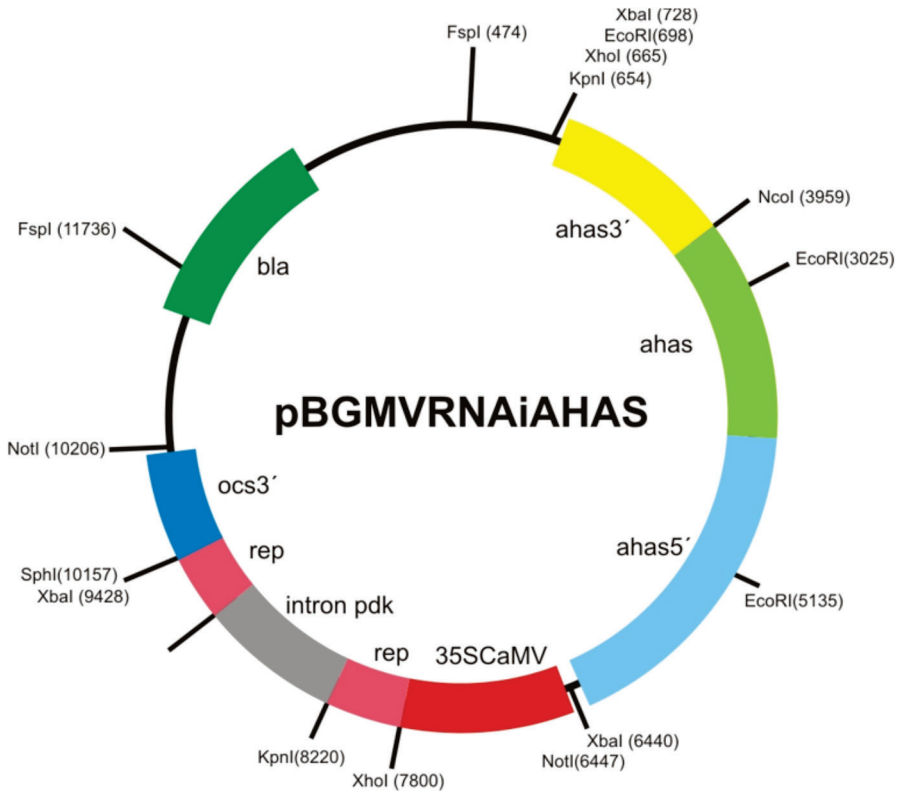


FIGURE 7. Map of the vector pBGMVRNAiAHAS. Ahas 5': promoter of the gene acetolactate synthase from *A. thaliana*; ahas: coding region for acetolactate synthase from *A. thaliana*; ahash3': terminator for acetolactate synthase *Arabidopsis thaliana*; 35SCaMV: promoter of RNA 35S from *Cauliflower mosaic virus*; rep: fragment of 411 pb of gene *rep* (*ACI*) from *Bean golden mosaic virus*; intron pdk: intron of the gene pyruvate orthophosphate dikinase from *Flaveria trinervia*; ocs3': terminator of gene of octopine synthase from *Agrobacterium tumefaciens*; bla: gene of beta-lactamase de *Escherichia coli*. For transformation using biobalistic, the vector was digested with the enzyme *FspI*

We succeeded to obtain two independent ben transformants resistant to BGMV. Embrapa 5.1 was the first to be obtained and therefore was used for the studies on its effectiveness to control BGMV as well as for the biosafety studies. The siRNAs observed in the transgenic plants correspond to the vector construct *ΔAC1hpRNA* (Bonfim et al. 2007). It was also shown that the siRNA is not the result from a possible polycistronic mRNA processing, as there was no hybridization to a probe from either AC2 or AC3 region. In addition, no siRNA was observed in the non-transgenic plants. Field studies with this line fully demonstrated its resistance to BGMV under planned environmental release (LPMA) authorized by CTNBio.

Studies on the biosafety of the Embrapa 5.1 event was undertaken according to the legislation. Three field locations were chosen to be one in Central Brazil (Santo Antonio de Goiás, GO, one in the southeast (Sete Lagoas, MG) and one in the south of Brazil (Londrina, PR) to carry out field plots. These plots were designed along with researchers of diverse scientific areas to gather data on agronomic performance, environmental biosafety, and have grains for the studies related to food biosafety. For the determination of composition, we also grew non-transgenic beans in different parts of the country in order to generate as much variability as possible for each data to be gathered (Carvalho et al. 2015). Molecular characterization was done in Embrapa Laboratories as well as at the UNESP Botucatu (SP), and the Federal Universities at Brasília (UnB), and Fortaleza (CE). The complete molecular characterization indicated that the transgene insertion was on chromosome Pv08, in a region that does not contain known genes or regulatory regions (Aragão et al. 2013). The transgene is present in a single locus, but there are two copies of the RNAi cassette in opposite orientation and intact copies of the gene *Atahas*. The stability of the transgene was shown by southern blot after eight generations of selfing and also after being crossed and backcrossed four times to a conventional carioca type of common beans. It is also of interest to note that the level of the RNAi observed did not change within the three locations evaluated. SiRNA, though present in seed, besides being in lower levels, it could not be detected after cooking for 10 minutes. Thus, the GM beans is free of siRNA in the way it is used for human consumption.

Inheritance of both transgene and resistance to BGMV were evaluated under greenhouse conditions. Both traits displayed simple Mendelian inheritance (Faria et al. 2014). The co-inheritance is very important for deployment of the event. The F1 generation, however, displayed a dosage effect phenomenon regarding the expression of disease resistance (quantitative differential action of the alleles of a gene on the phenotypic expression of the corresponding character). The transgenic lines were completely resistant in the field and greenhouse conditions under high disease pressure when the homozygous near-isogenic lines were evaluated.

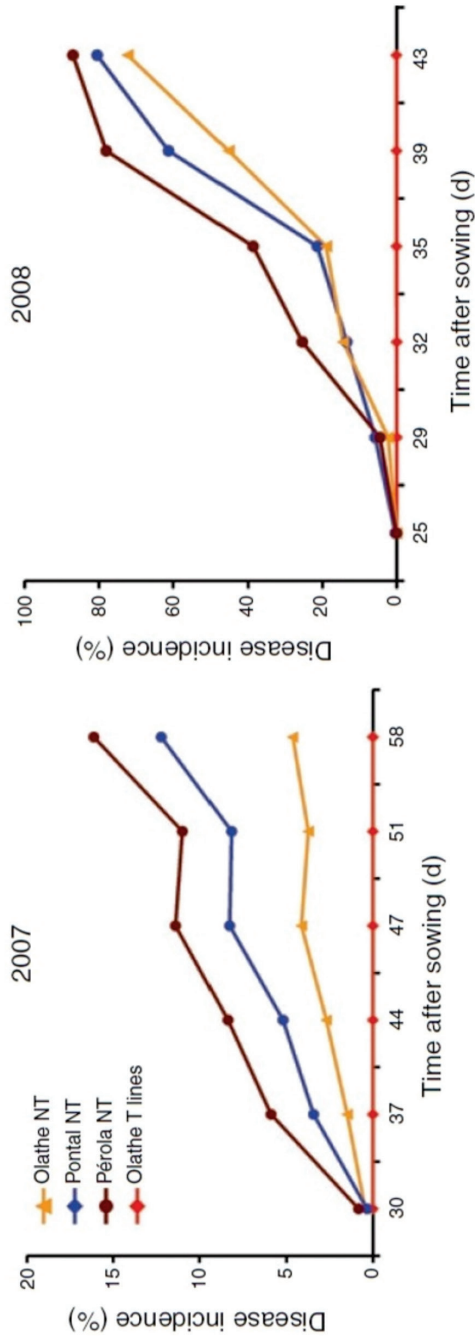


FIGURE 8. Development of golden mosaic disease in the transgenic (T) common bean lines engineered for resistance to BGMV-mediated RNAi compared with nontransgenic varieties (NT). Two transgenic lines showed similar resistance curves. Plants were cultivated in the field in 2007 and 2008. Disease evaluation was done visually by recording the first date of vein clearing. Source: Aragão and Faria. Nature biotechnology 27(12): 1086-1088, 2009

References

- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cotransformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93:142-150.
- Aragão FJL, Ribeiro SG, Barros L M G, Brasileiro A C M., Maxwell D P, Rech E L, Faria J C (1998). Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Mol. Breed.* 4:491-499.
- Aragão F J L, Faria J C (2009). First transgenic geminivirus resistant plant in the field *Nature Biotechnology.* 27,12:1086-1088.
- Aragão FJL, Nogueira EOPL, Tinoco MLP, Farias JC (2013). Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *J. Biotechnol.* 166:42–50. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.009
- Baulcombe D (2000). Unwinding RNA silencing. *Science* 290, 1108–1109. doi: 10.1126/science.290.5494.1108.
- Bianchini A (1999). Resistance to bean golden mosaic virus in bean genotypes. *Plant Disease*, St. Paul, 83,7:615-620.
- Blair MW, Morales FJ (2008). Geminivirus resistance breeding in common bean. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 3, 089 : 1-14..
- Bonfim K., Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes E A, Aragão FJL (2007): RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe In.* 20: 717-726.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant Soil.* 252: 55-128
- Carvalho JLV, Santos JO, Conte C, Pacheco S, Nogueira EOPL, Souza TLPO, Faria JC, Aragão FJL (2015). Comparative analysis of nutritional compositions of transgenic RNAi-mediated virus-resistant bean (event EMB-PV051-1) with its non-transgenic counterpart. *Transgenic Res.* 24:813–819. doi:10.1007/s11248-015-9877-5 .
- Costa AS (1937). Nota sobre o mosaico do algodoeiro. *Rev Agric Piracicaba Bras* 12: 453–470.
- Costa AS (1965). Three whitefly-transmitted diseases of beans in the State of São Paulo, Brazil. *FAO Plant Prot Bull* 13: 121–130
- Costa A.S (1975). Increase in the population density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: BIRD,J.; MARAMOROSH,K. Eds. Tropical disease of legumes. New York, Academic Press, 27-49.
- Costa AS (1971). Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1., 1971, Campinas. Anais. Viçosa: UFV, 2:303-384.
- Costa AS (1955). Studies on Abutilon mosaic in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, 24: 97-112, 1955.
- Costa AS (1965). Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in São Paulo, Brazil. *FAO*

Plant Protection Bulletin, Lanham, 13: 21-130.

Costa AS (1976). Whitefly-transmitted plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 16:429-447.

Embrapa (2017). Dados conjunturais do feijão (área, produção e rendimento) (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil—1985 a 2016. Embrapa Arroz e Feijão. <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm> (accessed 05 Oct 2018).

Faria JC, Albino MMC, Dias BBA, Cançado LJ, Cunha NB, Silva LM, Viana GR, Aragão FJL (2006). Partial resistance to bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line expressing a mutant rep gene. *Plant Sci.* 171: 565-571.

Faria JC, Valdisser PAMR, Nogueira EOPL, Aragão FJL (2014). RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. *Plant Breed.* 133:649-653.

Faria JC, Valdisser PAMR, Nogueira OPL, Aragão FJL (2014). RNAi-based *Bean golden mosaic virus*-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. *Plant Breed.* 133: 649–653. doi:10.1111/pbr.12189

Fontes EPB, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty ITD, Hanley-Bowdoin L. (1994). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, 6:405-416.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). Faostat. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 05 Oct 2018)

Fuentes A, Ramos P, Fiallo E, Callard D., Sa'nchez, Y, Peral R, Rodríguez, R, Pujol M (2006). Intron–hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to *Tomato yellow leaf curl virus* infection in transgenic tomato plants. *Transgenic. Res.* 15:291–304

Garrido-Ramirez ER, Sudashana MR, Gilbertson RL (2000). Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, México: Characterization, pseudorecombination with other bean infecting geminiviruses and germplasm screening. *Phytopathology*, 90: 1224-1232.

Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews – Microbiology*, 11: 777-788.

Hanley-Bowdoin L; Settlege SB, Robertson D (2004). Reprogramming plant gene expression: A prerequisite to geminivirus DNA replication. *Molecular-Plant-Pathology*,5: 149-156.

Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (2000). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. in Plant Science*, 35: 105–140.

Hanson SF, Maxwell DP (1999). *trans*-Dominant inhibition of geminiviral DNA replication by bean golden mosaic geminivirus *rep* gene mutants. *Phytopathology*, 89:480-486.

Hanson S F, Hoogstraten RA, Ahlquist P, Gilbertson RL, Russell D R, Maxwell DP (1995). Mutational analysis of a putative NTPbinding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology*, 211:1-9.

Herr AJ (2005). Pathways through the small RNA world of plants. *FEBS Lett.*, 579:5879–5888.

Hoogstraten RA, Hanson SF, Maxwell DP (1996). Mutational analysis of the putative nicking motif in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Mol.*

Plant-Microbe Interact., 9:594-599..

Inoue-Nagata AK, Lima MF, Gilbertson RL (2016). A review of geminivirus (begomovirus) diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, 34: 008-018. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>

Jeske H, Lutgemeier M, Preiss W (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of *Abutilon mosaic virus*. *EMBO J.*, 20: 6158-6167.

Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 6:208. doi: 10.3389/fpls.2015.00208

Lapidot M, Friedmann M (2002). Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. 2002. *Annals-of-Applied-Biology.*, 140(2): 109-127.

Morales FJ (2006). History and current distribution of begomoviruses in Latin America. *Advances in Virus Research*, 67:127–61.

Morales FJ, Anderson PK (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol*, 146: 415–441

Orlando A, Silberschmidt K (1946). Estudos sobre a disseminação natural do vírus da clorose infecciosa das malvaceas (*Abutilon virus* 1 Baur) e a sua relação com o insetovetor *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Arq Inst Biol São Paulo*, 17: 1–36

Pessoni LA, Zimmermann MJD, Faria JC (1997). Genetic control of characters associated with bean golden mosaic geminivirus resistance in *Phaseolus vulgaris* L. *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 51-58.

Petry N, Boy E, Wirth JP, Hurrell RF (2015). Review: The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, 7:1144-1173.

Ramesh SV, Sahu PP, Prasad M, Praveen S, Pappu HR. (2017). Geminiviruses and plant hosts: a closer examination of the molecular arms race. *Viruses* 9:256-276.

Reyes-Moreno C., Paredes-López O. (1993) Hard-to-cook phenomenon in common beans-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 33: 227-286

Rodríguez-Pardina, P.E, Zerbini FM, Daniel A, Ducasse D A (2006). Genetic diversity of begomoviruses infecting soybean, bean and associated weeds in Northwestern Argentina. *Fitopatologia Brasileira*, 31,4:342-348.

Rojas MR, Macedo MA, Maliano MR, Soto-Aguilar M, Souza JO, Briddon RW, Kenyon L, Bustamante RFR, Zerbini FM, Adkins S, Legg JP, Kvarnheden A, Wintermantel WM, Sudarshana MR, Peterschmitt M, Lapidot M, Martin DP, Moriones E, Inoue-Nagata AK, Gilbertson R L(2018). World Management of Geminiviruses *Annu. Rev. Phytopathol.* 2018. 56:637–77.

Sanford JC, Johnston SA. (1985). The concept of parasite-derived resistance-Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.*, 113, 395-405.

Seo YS, Rojas MR, Lee JY, Lee SW, Jeon JS, Ronald P, Lucas WJ, Gilbertson RL (2006). A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *PNAS*, 103, 32: 11856–11861.

Silberschmidt K (1943). Estudos sobre a transmissão experimental da “clorose infecciosa” das

malvaceas. *Arq Inst Biol São Paulo* 14: 105–156

Wesley S, Helliwell C, Smith N, Wang M, Rouse D, Liu Q, Gooding P, Singh S, Abbott D, Stoutjesdijk P, Robinson S, Gleave A, Green A, Waterhouse P (2001). Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. *Plant J.*, 27:581-590.

Wilson TM (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *PNAS USA*, 90:3134-3141.

Zerbini FM, Briddon RW, Idris A, Martin DP, Moriones E, Navas-Castillo J, Bustamante RR, Roumagnac P, Varsani A, ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98:131–133.

Os impactos da Lei de Biodiversidade na Pesquisa - O Cadastro no SISGEN – Patrimônio Genético

Ricardo Gomes Figueiroa¹

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo²

Raissa De Luca Guimarães³

Resumo

No ano de 2015 foi aprovada a Lei nº 13.123 / 2015 que dispõe sobre o patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional, bem como sobre a repartição de benefícios para a conservação e uso sustentável da biodiversidade. A Lei nº 13.123 / 2015 revogou a Medida Provisória nº 2.186-16 de 23 de agosto de 2001 que, durante quinze anos, foi o marco legal da matéria. A lei surge como uma tentativa de simplificar os procedimentos para a realização das atividades de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias que utilizam a biodiversidade do país. Nesse sentido, o presente artigo tem por escopo uma análise da

¹Graduado em direito pela Pontificia Universidade Católica de Minas Gerais (2004). Pós-graduado em Direito Público pela Newton Paiva (2007). Aluno do Mestrado em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual. Procurador do Município de Ribeirão das Neves. Advogado.

²Professor titular e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (1986), mestrado (1989) e doutorado (1993) em Genética de Microrganismos pelo Institut National Agronomique Paris Grignon. Pós-doutorado pelo Departamento de Microbiologia da Escola de Medicina da Universidade da Pensilvânia (EUA, 1994). Livre-Docente pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (2004). Foi Presidente do comitê assessor da área de Ciências Biológicas e agrárias da Pró-reitoria de Pesquisa da UFMG, membro titular do Comitê de Internacionalização da UFMG de 2007-2010 e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG de outubro de 2006 até abril de 2010

³Autora em correspondência raissadelucag@gmail.com. Graduada em Direito pela Faculdade Milton Campos (2006) e graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (2003). Coordena o Setor de Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Minas Gerais, onde trabalha desde 2007. Mestre em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica pela UFMG. Atualmente é doutoranda do Doutorado em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica.

“primeira obrigação” determinada pela nova lei, que é o cadastramento das atividades de acesso ao patrimônio genético. O cadastro deve ser realizado pelo SisGen, que é o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e o do Conhecimento Tradicional Associado disponível desde novembro de 2017. Entretanto, apesar do intuito da nova lei de facilitar o cadastramento, verificam-se na prática diversos impactos negativos nas atividades de pesquisa. Algumas alternativas para se mitigar os impactos causados à ciência e ao desenvolvimento tecnológico pela nova legislação estão sendo discutidas no âmbito político, empresarial e acadêmico, sendo certo que as discussões nas câmaras temáticas e setoriais, indubitavelmente, constituem a forma mais eficiente de interpretação dos conceitos, bem como se mostra como verdadeiro órgão de aproximação e conciliação das propostas dos setores envolvidos. A metodologia a ser utilizada neste artigo é a pesquisa descritiva e exploratória, baseada em estudos de casos, análise histórica, entrevistas com os pesquisadores e demais usuários do Sistema que detenham conhecimento sobre o tema. A construção equilibrada e paritária da interpretação referente à Lei nº 13.123/2015, devidamente articulada para uma maior efetividade à proteção do patrimônio genético e para uma maior segurança jurídica dos usuários deve ser o foco principal dos atores envolvidos na efetivação deste marco legal da biodiversidade.

Palavras-chave: Biodiversidade. Lei 13.123/2015. Acesso. Patrimônio genético.

Abstract

Law no. 13123/2015 was approved in 2015, which provides for genetic heritage, protection and access to traditional knowledge, as well as the sharing of benefits for the conservation and sustainable use of biodiversity. Law 13123/2015 repealed Provisional Measure No. 2186-16 of August 23, 2001, which for fifteen years was the legal framework of the matter. The law appears as an attempt to simplify procedures for conducting research and development of technologies that use the country's biodiversity. In this sense, this article has as its scope an analysis of the “first obligation” determined by the new law, which is the registration of the activities of access to the genetic patrimony. The registration must be carried out by SisGen, which is the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge available since November 2017. However, despite the intention of the new law to facilitate registration, there are various impacts research activities. Some alternatives to mitigate the impacts caused to science and technological development by the new legislation are being discussed in the political, business and academic spheres, being that the discussions in the thematic and sectoral chambers undoubtedly constitute the most efficient way of interpreting the concepts, as well as showing itself as a true organ of approximation and conciliation of the proposals of the sectors involved. The methodology to be used in this article is descriptive and exploratory research, based on case studies, historical analysis, interviews with researchers and other users of the System who have knowledge about the subject. The balanced and equal construction of the interpretation of Law No. 13123/2015, duly articulated for a greater effectiveness in the protection of the genetic patrimony and for greater legal security of the users, should be the main focus of the actors involved in the implementation of this legal framework of biodiversity.

Keywords: Biodiversity. Law 13123/2015. Access. Genetic patrimony..

1. Introdução

A biodiversidade brasileira, em razão da imensidão de riquezas naturais exploradas e inexploradas, é destaque no cenário nacional e internacional e tem chamando a atenção de pesquisadores, empresas e da classe política que pretendem permear a exploração destes recursos visando o crescimento econômico e social do país.

O Brasil ao se tornar signatário da Convenção Sobre Diversidade Biológica, Eco-92, que é um tratado internacional multilateral que trata da proteção e do uso da diversidade biológica em cada país signatário, publicou o decreto legislativo nº 2 de 1994 que regulamentou a matéria(1).

A convenção consignou três objetivos principais, quais sejam: a conservação da diversidade biológica (ou biodiversidade), o seu uso sustentável e a distribuição justa e equitativa dos benefícios advindos do uso econômico dos recursos genéticos, respeitada a soberania de cada nação sobre o patrimônio existente em seu território(1).

Após um famoso caso de biopirataria (BioAmazônia x Novartis Pharma) foi promulgada a medida provisória 2052/2000 e depois seguida da medida provisória 2186/2001 que se tornou o marco legal sobre a matéria até a publicação da lei 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade(2).

Na data de 12 de maio de 2016 foi publicado o Decreto nº 8.772/2016, regulamentando Lei nº 13.123/2015 que, dentre outras disposições, institui em seu artigo 20, o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) para cadastramento eletrônico e on-line, de natureza declaratória, das atividades de acesso e remessa do patrimônio genético e de acesso ao conhecimento tradicional associado(3).

Intensa discussão prepondera no meio acadêmico no que tange aos entraves burocráticos criados pela lei 13.123/2015 e seu respectivo decreto nº 8.772/2016, em seus vários aspectos, sendo que, da forma como inserida na legislação, as instituições de pesquisas podem experimentar um retrocesso na pesquisa brasileira.(3)

Nos termos do Art.3º da Lei nº 13.123/2015, o acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico e a exploração econômica proveniente serão realizados mediante cadastro, autorização ou notificação e serão submetidos à fiscalização, restrições e repartição de benefícios nos termos e nas condições estabelecidos nesta Lei e no seu regulamento.(4)

Nesta temática, o SisGen criado para auxiliar o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGen – no cadastramento do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado, atualmente, constitui um dos pontos mais polêmicos e discutidos no meio acadêmico, empresarial e político.(4)

A relevância do tema é pública e notória, sendo certo que a construção de um sistema integrado, funcional e menos burocrático é imprescindível ao

desenvolvimento do país.

A metodologia utilizada no presente artigo é a pesquisa descritiva e exploratória, baseados em estudos de casos, análise histórica, fática, dados e entrevistas com os pesquisadores e demais atores detenham conhecimento sobre o tema, com foco no acesso ao patrimônio genético.

2. Da obrigatoriedade de cadastro das atividades de acesso ao patrimônio genético junto ao SISGEN

Nos termos do artigo 12 da lei 13.123/2015 estão sujeitas ao cadastramento as seguintes atividades, senão vejamos:

Art. 12. Deverão ser cadastradas as seguintes atividades:

I - acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado dentro do País realizado por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

II - acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado por pessoa jurídica sediada no exterior associada a instituição nacional de pesquisa científica e tecnológica, pública ou privada;

III - acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado realizado no exterior por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

IV - remessa de amostra de patrimônio genético para o exterior com a finalidade de acesso, nas hipóteses dos incisos II e III deste **caput**; e

V - envio de amostra que contenha patrimônio genético por pessoa jurídica nacional, pública ou privada, para prestação de serviços no exterior como parte de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico.

§ 1º O cadastro de que trata este artigo terá seu funcionamento definido em regulamento.

§ 2º O cadastramento deverá ser realizado previamente à remessa, ou ao requerimento de qualquer direito de propriedade intelectual, ou à comercialização do produto intermediário, ou à divulgação dos resultados, finais ou parciais, em meios científicos ou de comunicação, ou à notificação de produto acabado ou material reprodutivo desenvolvido em decorrência do acesso.

§ 3º São públicas as informações constantes do banco de dados de que trata o inciso IX do § 1º do art. 6º, ressalvadas aquelas que possam prejudicar as atividades de pesquisa ou desenvolvimento científico ou tecnológico ou as atividades comerciais de terceiros, podendo ser estas informações disponibilizadas mediante autorização do usuário.

A lei 13.123/2015, em seus artigos 35 a 38, trás em seu arcabouço os procedimentos para adequação e regularização das atividades em desacordo com a MP 2186-16/2001. (site planalto lei 13.123/2015), quais sejam:

Art. 35. O pedido de autorização ou regularização de acesso e de remessa de patrimônio genético ou de conhecimento tradicional associado ainda em tramitação na data de entrada em vigor desta Lei deverá ser reformulado pelo usuário como pedido de cadastro ou de autorização de acesso ou remessa, conforme o caso.

Art. 36. O prazo para o usuário reformular o pedido de autorização ou regularização de que trata o art. 35 será de 1 (um) ano, contado da data da disponibilização do cadastro pelo CGen.

Art. 37. Deverá adequar-se aos termos desta Lei, no prazo de 1 (um) ano, contado da data da disponibilização do cadastro pelo CGen, o usuário que realizou, a partir de 30 de junho de 2000, as seguintes atividades de acordo com a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001:

I - acesso a patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado;

II - exploração econômica de produto acabado ou de material reprodutivo oriundo de acesso a patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado.

Parágrafo único. Para fins do disposto no **caput**, o usuário, observado o art. 44, deverá adotar uma ou mais das seguintes providências, conforme o caso:

I - cadastrar o acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado;

II - notificar o produto acabado ou o material reprodutivo objeto da exploração econômica, nos termos desta Lei; e

III - repartir os benefícios referentes à exploração econômica realizada a partir da data de entrada em vigor desta Lei, nos termos do Capítulo V, exceto quando o tenha feito na forma da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001.

Art. 38. Deverá regularizar-se nos termos desta Lei, no prazo de 1 (um) ano, contado da data da disponibilização do Cadastro pelo CGen, o usuário que, entre 30 de junho de 2000 e a data de entrada em vigor desta Lei, realizou as seguintes atividades em desacordo com a legislação em vigor à época:

I - acesso a patrimônio genético ou a conhecimento tradicional associado;

II - acesso e exploração econômica de produto ou processo oriundo do acesso a patrimônio genético ou a conhecimento tradicional associado, de que trata a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001;

III - remessa ao exterior de amostra de patrimônio genético; ou

IV - divulgação, transmissão ou retransmissão de dados ou informações que integram ou constituem conhecimento tradicional associado.

§ 1º A regularização de que trata o **caput** está condicionada a assinatura de Termo de Compromisso.

§ 2º Na hipótese de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado unicamente para fins de pesquisa científica, o usuário estará dispensado de firmar o Termo de Compromisso, regularizando-se por meio de cadastro ou autorização da atividade, conforme o caso.

§ 3º O cadastro e a autorização de que trata o § 2º extinguem a exigibilidade das sanções administrativas previstas na Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, e especificadas nos arts. 15 e 20 do Decreto nº 5.459, de 7 de junho de 2005, desde que a infração tenha sido cometida até o dia anterior à data de entrada em vigor desta Lei.

§ 4º Para fins de regularização no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI dos pedidos de patentes depositados durante a vigência da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, o requerente deverá apresentar o comprovante de cadastro ou de autorização de que trata este artigo.

Conforme Portaria SECEX/CGEN nº 1, de 3 de outubro de 2017, o SisGen (9) foi implementado e disponibilizado passando a operar a partir do dia 6 de novembro de 2017 permitindo aos usuários a realização:

- a) do cadastro de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado, como também do cadastro de envio de amostra que contenha patrimônio genético para prestação de serviços no exterior;
- b) do cadastro de remessa de amostra de patrimônio genético e juntamente como Termo de Transferência de Material;
- c) das autorizações de acesso ao patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado e de remessa ao exterior, para os casos de que trata o art. 13 da Lei nº 13.123, de 2015;
- d) do credenciamento das instituições mantenedoras das coleções *ex situ* que contenham amostras de patrimônio genético;
- e) das notificações de produto acabado ou material reprodutivo e dos acordos de repartição de benefícios; e
- f) dos atestados de regularidade de acesso.

O aludido cadastramento prevê ainda a obrigatoriedade de prévia informação ao sistema, SisGen, para remessa de patrimônio genético, do requerimento de qualquer direito de propriedade intelectual, da comercialização do produto intermediário, da divulgação dos resultados, finais ou parciais, em meios científicos ou de comunicação

ou a notificação de produto acabado ou material reprodutivo desenvolvido em decorrência do acesso. (3)

3. Das formas de mitigar os impactos da Lei 13.123/2015, das câmaras setoriais e da legislação do Cgen

Em uma hipótese concreta se torna imprescindível definir os riscos e consequências que a lei 13123/2015 poderá ocasionar à produção científica e às instituições públicas de pesquisa no Brasil e ao desenvolvimento tecnológico do país em geral (2,5).

A academia, as empresas e os gestores públicos brasileiros vêm debatendo sobre os diversos pontos de vista, jurídico, ambiental, político e econômico, acerca da preservação do patrimônio genético do país e a forma sustentável de melhor desenvolvê-lo e criar um ambiente favorável ao seu crescimento.(6–9).

Ao avaliar os impactos negativos e positivos da lei 13.123/2015 nas instituições de pesquisas brasileiras, cumpre, primeiramente, às câmaras setoriais da academia que são o elo com os respectivos representantes da academia com o CGen, e posteriormente ao próprio CGen, identificar os principais entraves jurídicos à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico, bem como propor interpretações factíveis para os conceitos trazidos na legislação. Isso porque o principal desafio enfrentado pela legislação da biodiversidade na evolução da ciência brasileira tem sido a carência de uma interpretação clara dos conceitos apresentados na norma.

Nesse sentido, destacamos as principais dúvidas, divergências e contrapontos apresentados pelos pesquisadores para o efetivo cumprimento da lei e cadastro junto ao SisGen, senão vejamos:

- 1) Dificuldades de interpretação e compreensão inequívoca dos diversos conceitos apresentados na lei, sendo que somente no art. 2º da Lei 13.123/2015 são apresentados 33 conceitos.
- 2) Insegurança jurídica no sentido de identificar de forma clara e evidente tudo que está englobado no conceito de “patrimônio genético” do País por não haver uma lista exaustiva das espécies que integram o “patrimônio genético” nacional para o correto enquadramento da lei aos casos concretos.
- 3) Necessidade de identificação da espécie da qual se obteve aquele patrimônio genético e obrigação de realizar uma pesquisa adicional para a identificação:
 - 3.1 - da espécie da qual se originou o(s) patrimônio(s) genético(s) utilizado(s) na pesquisa;
 - 3.2 - do habitat natural dessa(s) espécie(s) para averiguar se a espécie é nativa ou exótica; do local do substrato do qual se isolou o microrganismo;
 - 3.3 - de aspectos evolutivos sobre a espécie no território nacional, incluindo intervenções antropológicas (se é uma variedade tradicional local ou crioula ou raça localmente adaptada ou crioula, se forma populações espontâneas, se adquiriu no

Brasil características distintivas próprias, se é uma espécie domesticada ou cultivada); 3.4 - da procedência da amostra, se foi obtida em condições *in situ*, *ex situ*, *in silico* ou produto intermediário (dados detalhados sobre o local de coleta ou obtenção e a data, sobre a fonte, banco de dados ou empresa da qual se obteve, na maioria dos casos incluindo as coordenadas geográficas).

- 4) Dúvidas sobre o enquadramento ou não da atividade praticada no conceito de “acesso ao patrimônio genético” nacional.
- 5) Possíveis problemas decorrentes da obrigatoriedade do cadastro prévio em conflito com o requisito da originalidade e novidade das publicações e dos direitos de propriedade intelectual, uma vez que o sigilo das informações cadastradas é parcial.
- 6) A questão da obrigatoriedade imposta pela nova lei de regularizar as atividades praticadas em desacordo com a Medida Provisória 2.186/2001, criando a obrigação de interpretar também os conceitos contidos na MP para enquadramento das atividades praticadas no período.
- 7) Imensas dificuldades conceituais e práticas para realizar o cadastramento das pesquisas realizadas na vigência da Medida Provisória 2.186/2001.

Como se pode verificar, apesar de o cadastro apresentar uma interface amigável e aparentemente de simples preenchimento, é exigido um estudo aprofundado sobre cada uma das espécies utilizadas na tentativa de se fazer a interpretação correta da vontade da lei. Assim, torna-se óbvio que a pesquisa adicional requerida ao pesquisador incorrerá em atrasos na pesquisa principal e, conseqüentemente, no desenvolvimento científico do país, levando inclusive à perda da competitividade.

Diante deste cenário, a Câmara Setorial da Academia deve continuar atuante a fim de propor ao plenário do CGen a publicação de orientações técnicas e Resoluções que visam a desburocratização da lei e/ou dar interpretação conforme para a lei, constituindo-se, portanto, como órgão de extrema importância para a continuidade do desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil.

Em conclusão, assevera-se que será imprescindível que a discussão com todos os setores envolvidos avance para a construção de uma legislação infralegal que torne a nova lei da biodiversidade mais efetiva e factível de ser cumprida pela comunidade acadêmica, e que, assim, consiga primar pela real proteção à biodiversidade, à segurança nas relações jurídicas, bem como ao avanço tecnológico do país.

Por fim, considera-se ainda que, diante do curto prazo para a aprovação e publicação de novas normas antes do fim do prazo para regularização das atividades praticadas antes da disponibilização do SisGen, a prorrogação deste prazo torna-se a medida mais urgente e necessária no cenário atual. Tal medida possibilitaria uma melhor definição dos conceitos trazidos no bojo da lei, bem como outras propostas que tenham o objetivo de, senão dirimir, ao menos mitigar os efeitos deletérios para que a ciência brasileira possa continuar avançando.

Referências Bibliográficas

- Convenção Sobre Diversidade Biológica - CDB [Internet]. [citado 23 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/informma/item/7513-convenção-sobre-diversidade-biológica-cdb>
- L13123 [Internet]. [citado 23 de junho de 2018]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2015/lei/l13123.htm
- Decreto nº 8772 [Internet]. [citado 21 de setembro de 2018]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/decreto/D8772.htm
- SisGen [Internet]. [citado 18 de agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico/sis-gen>
- Jorge FLT, Costa FNM, Luiz PKK, Gomes B, Pinheiro SVM, Melo FBD. Comentários à Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015: Novo Marco Regulatório do Uso da Biodiversidade. :153.
- A Lei da Biodiversidade e seus impactos sobre a ciência [Internet]. [citado 23 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.abc.org.br/SPIP.RIC/spip.php?article29519>
- Conselho de Gestão do Patrimônio Genético [Internet]. [citado 21 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico>
- Patrimônio Genético [Internet]. [citado 23 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/>
- SisGen [Internet]. [citado 23 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico/sis-gen>

Phytochemistry, organic synthesis and computational chemistry: development of new products to control phytopathogens

Denilson Ferreira de Oliveira

On average, Brazilian agricultural production has grown steadily since 1961 (Figure 1). In 2013 Brazil reached the position of the largest soybean supplier in the world, surpassing the USA, and in that year 36% of total Brazilian exports were related to agribusiness. In 2015 Brazil was the second largest agricultural exporter

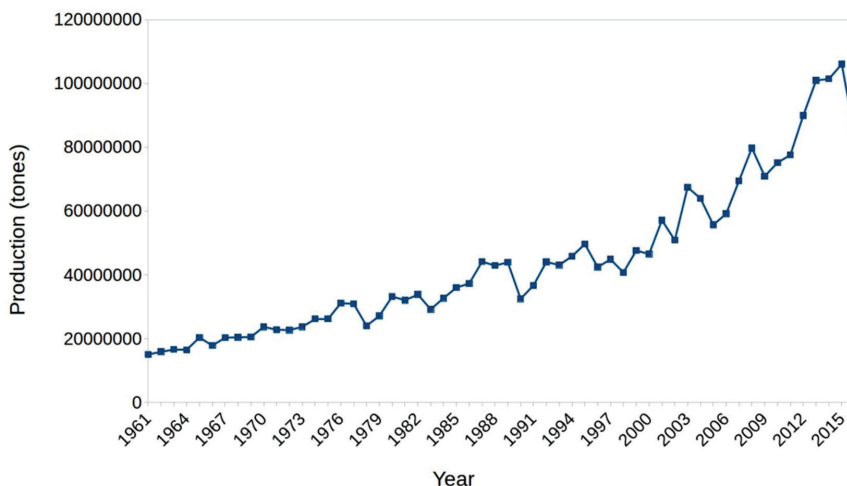


FIGURE 1. Brazilian agricultural production from 1961 to 2016 (FAO, 2018).

Laboratório de Produtos Naturais; Departamento de Química. Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, Brasil. denilson@dqf.ufla.br

and the largest supplier of sugar, orange juice and coffee in the world. In 2016 Brazil was the major producer of coffee, sugar-cane and orange; the second of soybeans; and the third of maize and cassava (FAO, 2018).

Consequently, for Brazil, the actions aimed at increasing the quality and quantity of its agricultural production are of great social and economic importance. This is the case, for example, of the development of new methods and products for the control of nematodes and fungi, which cause great losses for Brazilian farmers. According to Decraemer and Hunt (2006) approximately 4,100 nematode species are able to parasitize plants. The Brazilian Nematology Society estimates annual losses caused by these phytopathogens to Brazilian agribusiness reach R\$ 35 billion (Agrolink, 2018). Regarding fungi, it is believed that the agricultural losses caused by such organisms are around US\$ 60 billion per year worldwide (O Globo, 2018).

One of the potential ways of developing new products for the efficient control of these phytopathogens is the use of natural products, as there are several reports in the literature on the activities of organic substances of natural origin, active against nematodes and fungi (Cantrell, et al., 2017; Sparks, et al., 2017). Among the most common sources of organic bioactive substances are plants (Cseke, et al., 2006). As there are several known species, one of the first issues to be resolved concerns deciding which species will be subjected to the phytochemical study aimed at isolating and identifying the substance(s) active against the phytopathogenic fungi and/or nematodes. In order to do so, in principle it is possible to make use of previously performed works, during which one or more plant species have been selected. If such information is not available, the selection will probably be made by using simple biological tests to determine the most promising plant species for the production of active substances against fungi and/or nematodes. Of course, in some cases, the authors of the work opt to fractionate the plant species without knowing its potential for the production of active substances against fungi and nematodes. In these cases, they only investigate this possibility after isolation of the substances.

Whatever approach is adopted, it is important to keep in mind the existence of various strategies that can be applied to the purification and identification of organic compounds from natural sources (Sarker, et al., 2006; Colegate, et al., 2008). For example, when it is believed that the bioactive compound produced by a plant species is non-polar and has about 20 carbon atoms in its structure, it is possible to perform hydrodistillation in a modified Clevenger apparatus (Figure 2).

In hydrodistillation, also known as steam distillation, plant material (leaves, seeds, roots, flowers etc.) and water are placed into the round-bottomed glass flask (blue in Figure 2), which is heated with a heating blanket to boiling. Vapors condense when coming in contact with the condenser. Condensed water (green in Figure 2) and oil (red in Figure 2) fall into the thinner tube, just below, and because the oil in the upper phase has a lower density than water, it can be easily separated from the water by decanting. This is the essential oil of plants, which can be composed of several apolar substances, with up to approximately 20 carbon atoms. To identify its

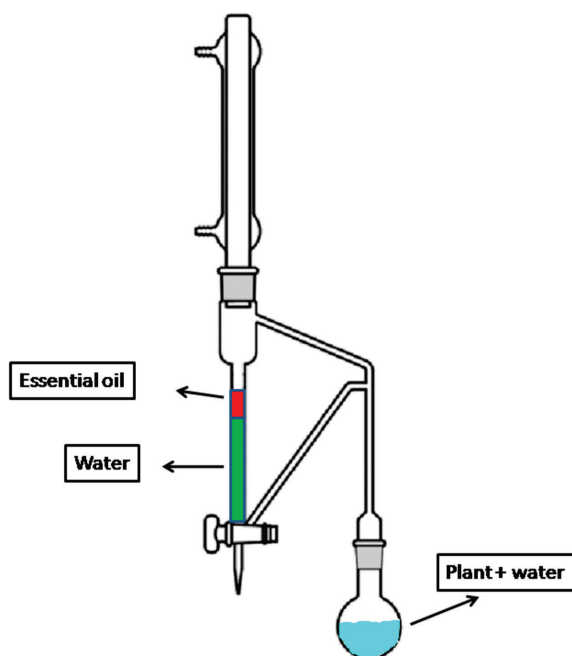


FIGURE 2. The illustrative drawing of a modified Clevenger apparatus for obtaining essential oils from plants.

components, the use of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) is very common. The separated substances in the chromatographic column are inserted into the mass spectrometer, which obtains mass spectra for all substances in the oil (McMaster, 2008). Retention times and mass spectra of the substances are then used for comparison with those obtained from standards for the identifications of the components of the essential oils.

This methodology can be exemplified through the work by Jardim et al., (2017), who used the essential oil of *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl. in the control of the nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood in Soybean plants [*Glycine max* (L.) Merr.]. According to analysis through GC-MS, the main component was (*E*)-cinnamaldehyde (Figure 3), which accounted to approximately 83 % of the essential oil. Therefore, such aldehyde was used in assays carried out *in vitro* and *in vivo*, affording results comparable to those obtained with the commercial nematicides Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-1-benzofuran-7-yl N-methylcarbamate) and Basamid (3,5-dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thion).

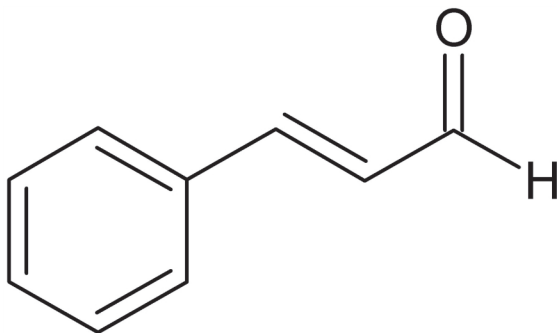


FIGURE 3. Chemical structure of (*E*)-cinnamaldehyde.

Although quite useful, hydrodistillation cannot be applied to most of the compounds produced by plants. In these cases, other approaches need to be adopted. Among the most common methods is the extraction with solvents (Sarker et al., 2006, Colegate and Molyneux, 2008), which may vary according to the characteristics of the sample and the structures of the compounds of interest. In addition, it is possible to vary other parameters such as temperature during extraction (Harborne 1998). When no information is available on the structures of the bioactive compounds, a widely employed procedure is to use methanol (MeOH) or ethanol (EtOH) containing 30% water (EtOH 70%) in the first extraction, which is usually done at room temperature. When 70% EtOH is used, it is common to concentrate the resulting alcoholic solution under reduced pressure, until an aqueous suspension is obtained, which can be subjected to a liquid-liquid partition with water immiscible solvents. When MeOH is employed, it is common to concentrate the alcoholic solutions to dryness under reduced pressure so that the residue obtained can be subjected to subsequent extractions with solvents of different polarities (Figure 4) (Harborne, 1998).

Whatever the initial procedure for processing the plant material, it will hardly result in pure bioactive compounds. Therefore, the fractions obtained are generally subjected to other more efficient fractionation processes like the chromatographic techniques. In a glass column, containing a filter at one of its ends, a solid is placed to be used as the stationary phase. Among the most used for this purpose are silica gel, alumina, cellulose, silica coated with chains of 18 carbon atoms (silica-C18) etc. The sample to be fractionated is applied to the top of the column and then, solvent or combinations of solvents corresponding to the mobile phases are applied to the top as well. Every chromatographic process always has a stationary phase and a mobile phase. When passing through the column, the mobile phase carries the sample components with different linear velocities to the other end of the column. Therefore, in order to separate the components of the sample, it is sufficient to collect fractions of the mobile phase at the other end of the column using, for example, test tubes (Dhanarasu, 2012). This is a system that can be easily assembled in the laboratory with a glass column (Figure 5).

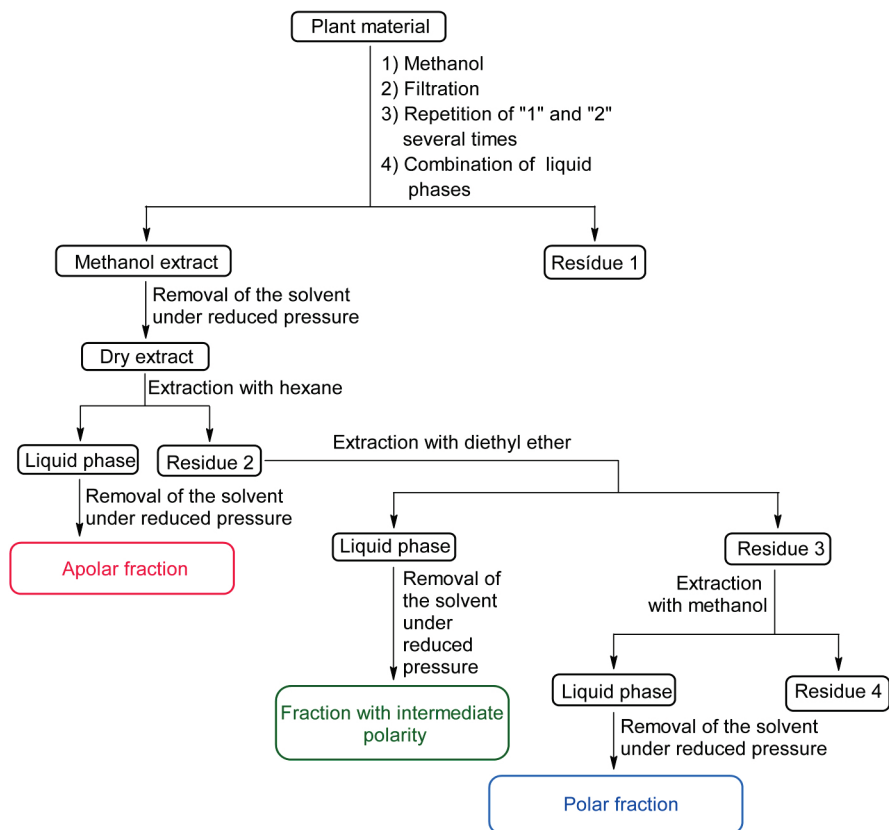


FIGURE 4. Basic scheme to illustrate the extraction of substances from a plant material with methanol and subsequent fractionation of the extract with solvents of different polarities.

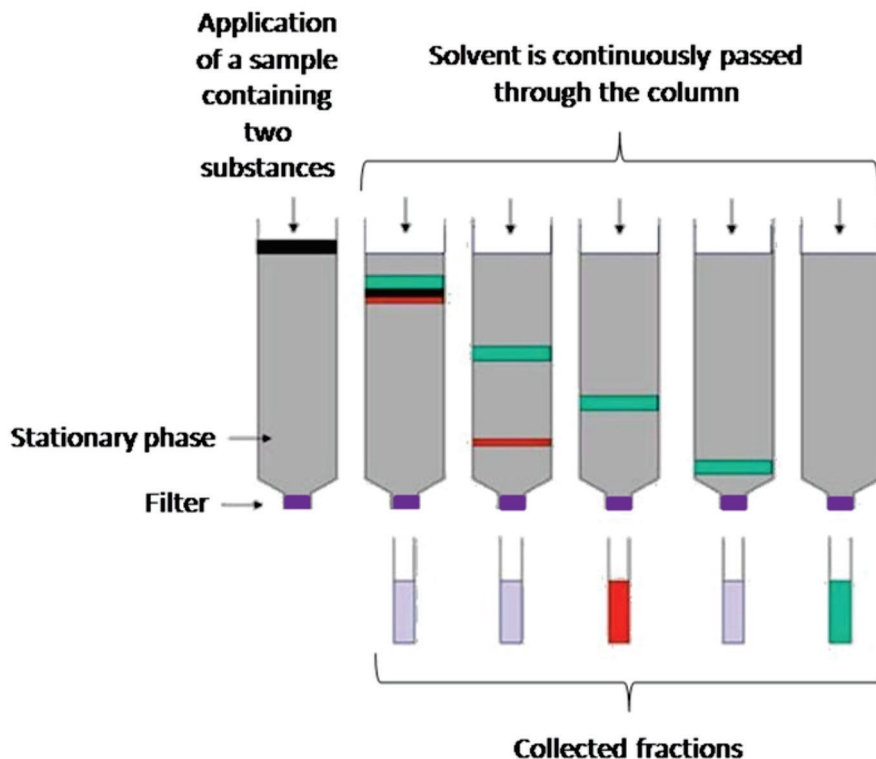


FIGURE 5. Simplified scheme of fractionation by column chromatography.

This methodology can be exemplified by the work of Campos et al., (2016) ((Campos, et al., 2016), who prepared the methanol extract from *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae Juss.) to undergo fractionation by extractions with solvents of different polarities. The active fraction was then fractionated through flash chromatography (Still, et al., 1978) to afford two substances active against *M. incognita* and *Meloidogyne exigua* Goeldi.

In spite of providing satisfactory results in several processes of purification of organic compounds, the fractionation in glass columns filled manually with the stationary phase has limitations. In such cases, it may be necessary to resort to more efficient chromatographic techniques. One possibility concerns the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) (Wellings, et al., 2006). In this case, a metal column, filled with a stationary phase with much smaller and more uniform particle sizes, is used. In addition, the HPLC system itself already has a detector, which makes it easy to perceive the compounds eluting out of the chromatographic

column during the process. Although such a system is very efficient, it presents a great disadvantage in relation to the glass column: the high cost of acquisition, use and maintenance.

Whatever the method used to purify the bioactive compound, it is necessary to identify it. To that end, the spectrometric methods are of great value (Silverstein, et al., 2005). Among the group of such methods, the most limited of all is ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy, which has to do with the electronic transitions of the molecules (Dibbern et al., 2002). In general, it provides little information on the structure of the compound under analysis, but is still a technique mainly used by research groups that have HPLC devices, since most of them have UV-VIS detectors. Therefore, it is quite simple to obtain the UV-VIS spectrum during the analysis of the compound by HPLC.

Another very common spectrometric technique is infrared (IR) spectroscopy, which has to do with the vibrational modes of the molecules (STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2004). In this case, generally 1 mg of sample is required for obtaining relatively simple and non-destructive spectrum of the sample. Therefore, the compound can be easily recovered after the analysis. In addition, the acquisition and maintenance costs of IR spectrometers are much lower than those observed for mass and nuclear magnetic resonance spectrometers. Consequently, obtaining infrared spectra for the identification of bioactive compounds is very common. However, although this technique provides more information than UV-VIS spectroscopy, it has many limitations and it is practically impossible to identify the isolated compound without the use of other spectrometric techniques.

It is unlikely to think of the identification of bioactive compounds from natural sources without considering the use of mass spectrometry (MS). In addition to being able to provide important information on the structure of the compound under analysis, this technique allows obtaining its molecular mass, which is a very important information (Watson and Sparkman 2007). It consumes minute amounts of the compound under analysis, which can be introduced directly into the mass spectrometer or through a gas chromatograph, high-efficiency liquid chromatograph, supercritical fluid chromatograph or capillary electrophoresis apparatus. These possibilities greatly expanded the range of possibilities of this spectrometric method, which is now used in practically all the processes of identification of bioactive substances from natural sources.

There is also nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, which mostly focuses on hydrogen atoms (^1H) and carbon thirteen (^{13}C) atoms. It is an extremely powerful technique which allows the obtaining of a large amount of information on the structure of the compound under analysis (Richards and Hollerton 2011). It is simply unthinkable for a research group in the area of identifying bioactive substances from natural sources, to work without access to an NMR apparatus. Although this method is indispensable in this area, it presents a big problem: the high cost of acquisition, use and maintenance.

To exemplify most of the aspects mentioned so far on the purification and identification of bioactive compounds, it is possible to mention a work whose focus was the fungus *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. In order to contribute to the development of products for the control of this fungus, methanol extracts of 43 plant species were prepared and submitted to *in vitro* assays with *A. ochraceus*. The most active, coming from the plant *Heteropterys byrsonimifolia* adr. Juss, was subjected to fractionation through solvent washes and chromatographic methods, for the isolation of the bioactive compounds (Santos et al., 2014). It was vitally important to use HPLC and spectrometric methods to isolate and identify the active compounds, which were glycosylated flavonoids. The most active of these, called rutin (Figure 6), had a minimal inhibitory concentration (MIC) close to that observed for the commercial fungicide benzalkonium chloride.

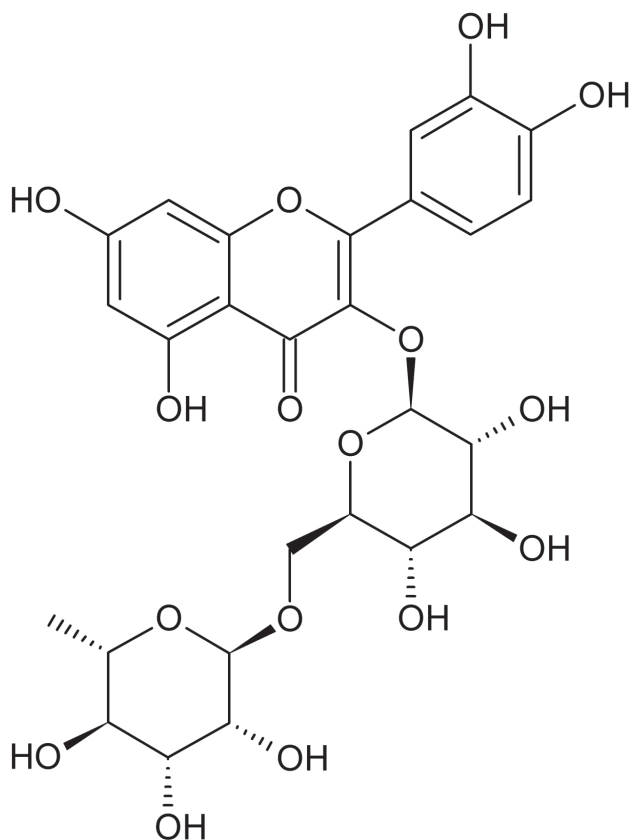


FIGURE 6. Chemical structure of rutin.

It is important to point out that the process of purification and identification of bioactive compounds produced by plants is part of a whole, whose main objective, in this case, is to contribute to the development of new products for the control of phytopathogenic fungi and nematodes. Therefore, in many cases, it is not enough to purify and identify. It may be necessary, for example, to modify the structure of the identified bioactive compound so that its efficiency in disease control is increased. Furthermore, in most cases, the commercial production of the active substance, employing purification processes from the plant material, is economically unviable. The classic example in the pesticide area is that of insecticides classified as pyrethroids, which are synthetic analogues of pyrethrins, which are compounds of plant origin with insecticidal activity (Henrich, 1994.). In order to achieve success in structural modifications of bioactive compounds, various techniques may be useful. For example, it may be of great utility to know the enzyme affected by the bioactive compound in its biological target.

Computational techniques are particularly interesting for the identifications of the enzymatic targets of organic substances. For example, it is possible to mention the work carried out with substances active against the fungus *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, produced by *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Campos, et al., 2014.). The dry methanol extracts from fruits of this plant species underwent subsequent extractions with hexane, ethyl acetate and methanol. As the hexane fraction was active against *A. alternaria*, such fraction was subjected to fractionation through column chromatography employing silica gel as the stationary phase. This procedure allowed the purification of β -sitosteryl linoleate (Figure 7) that was identified through NMR spectroscopy.

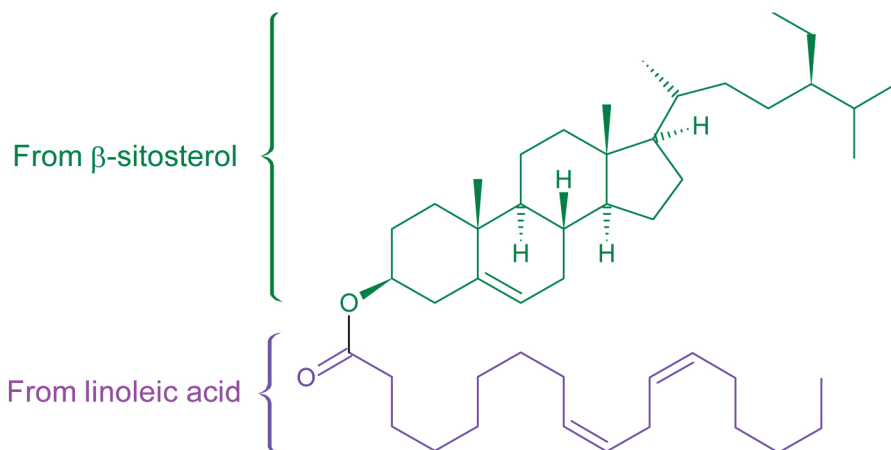


FIGURE 7. Chemical structure of the β -sitosteryl linoleate, showing the parts originating from β -sitosterol and linoleic acid.

β -sitosterol is very similar to ergosterol, which is extremely important to most fungi (Im et al., 2005; Saint-Jean et al., 2011). Therefore, a computational search was carried out for three-dimensional structures of proteins that could bind to ergosterol and that could be related to fungi. The best results were obtained for the oxysterol-binding proteins that transport ergosterol inside fungi. According to docking processes carried out with two different software, β -sitosteryl linoleate binds to this enzyme through a cavity used to transport ergosterol (Figure 8). Consequently, the transport of ergosterol is prevented, which causes the death of the fungus.

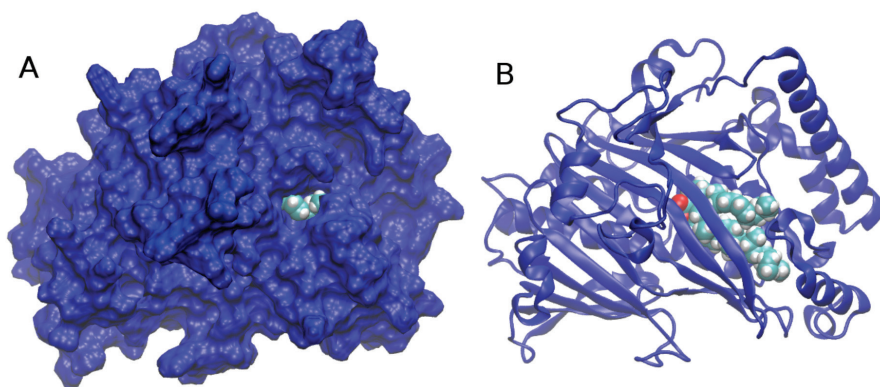


FIGURE 8. Three-dimensional structure of the oxysterol-binding protein 1ZHZ (Im et al., 2005), to which was docked the structure of β -sitosteryl linoleate using the software Autodock Vina 1.1.2 (Trott and Olson 2010). A: MSMS representation of the protein; B: new cartoon representation of the protein. Representations were prepared with the software VMD 1.9.2 (Humphrey et al., 1996).

The use of organic substances isolated from plants as leads to the development of products with increased activity against plant pathogens can be exemplified through the synthesis of 1,2,3-triazolyl-chalcones active against the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner (Pessôa et al., 2018). This work was based on the fact that chalcones are abundantly produced by plants and also on the fungicidal activity observed for some of these substances (Wei et al., 2016; Boeck, et al., 2005). Furthermore, triazoles are also potentially useful for the development of new fungicides (Wang, et al., 2017). Therefore, this work aimed at synthesizing chalcones containing 1,2,3-triazolyl groups to obtain fungicides with increased activity against *C. lindemuthianum*. The Claisen-Schmidt condensation (Bakó, et

al., 2003) of commercially available acetophenones and aldehyde produced the (E)-1-aryl-3-(2-phenyl-2H-1,2,3-triazol-4-yl)prop-2-en-1-ones in moderate to good yields. When submitted to assays with the fungus, three substances (Figure 9) afforded MIC values and reduction of anthracnose severity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L. 'Pérola') that were similar to those observed for the commercial fungicide methyl thiophanate. According to the computational study, these substances are able to inhibit two enzymes in the fungus: serine/phreonine-protein kinase and fatty acid synthase.

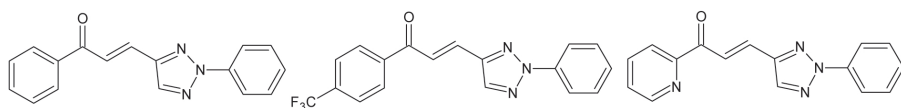


FIGURE 9. Chemical structures of synthetic 1,2,3-triazolyl-chalcones with *in vitro* and *in vivo* activities against *Colletotrichum lindemuthianum* that were comparable to the commercial fungicide methyl thiophanate.

Chalcones have also presented activity against plant-parasitic nematodes like *Globodera pallida* (Stone) Behrens and *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (Gonzalez and Estevez-Braun, 1997; González and Estévez-Braun 1998;), and *M. exigua* (Nunes, et al., 2013). Therefore, chalcone analogues with carbon-carbon double bonds between both aromatic rings and the carbonyl group were synthesized through aldol condensations. Then, the synthesized compounds were submitted to *in vitro* and *in vivo* assays with *M. incognita*. One of the compounds was as active against the nematode as the commercial nematicide carbofuran (paper submitted for publication). According to calculations carried out by the authors of the work with chalcone analogues, the most active substance act against *M. incognita* by inhibiting its cytochrome P450. Apparently, the interaction of this substance with the iron ion in the protoporphyrin IX-containing an iron (Fe) ion (HEME), seems to be very important to bind the cytochrome P450.

To conclude, this text is by no means an exhaustive approach to the aspects involved in the purification, identification and synthesis of bioactive compounds. Analogously, it is far from being a review of possibilities in the area of computational chemistry. It was only a simple introduction to these subjects, during which it was tried to mention some of the techniques/methods most used, to guide the one that intends to deepen in this area, which is very promising for the development of new products for the control of phytopathogenic fungi and nematodes.

References

- Bakó T, Bakó P, Keglevich G, Báthori N, Czugler M, Tatai J, Novák T, Parlagh G, Töke L (2003). *Tetrahedron: Asymmetry*, 14:1917-1923.
- Boeck P, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, López S, Sortino M, Escalante A, Furlán RLE, Zacchino S (2005). Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylone-derived chalcones. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 338:87-95.
- Campos VAC, Machado ART, Silva WJR, Lopes KC, Terra WC, Campos VP, Oliveira DF (2016) Estiril-lactonas de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.) com atividade contra *Meloidogyne* spp. e interação in silico com provável fumarase de *Meloidogyne* hapla. *Química Nova*, 39 : 130-136.
- Campos VAC, Perina FJ, Alves E, Sartorelli J, Moura AM, Oliveira DF (2014). Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. *Pest Management Science*, 70 : 1815 -1822.
- Cantrell CL, Dayan FR, Duke SO (2012). Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*. 75: 1231-1242. doi: 10.1021/np300024u.
- Colegate SM, Molyneux RJ (2008). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, Second Edition, CRC Press, 624 p.
- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, Briellmann HL (2006). *Natural Products from Plants*. Second Edition, CRC Press, 569 p.
- Decraemer W, Hunt DJ (2006). Structure and classification. In: Perry RN, Moens M (eds) *Plant Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, p. 3–32.
- Dhanarasu S (2012). *Chromatography and its Applications*, Intech.
- Dibbern HW, Muller RM, Wirbitzki E (2002). UV and IR spectra of some important drugs. *Publ. Editio Cantor VERLAG (ECV)*, Berlin.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). Available: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>; accessed October 11, 2018.
- Gonzalez JA, Estevez-Braun A (1997). Phytonematicidal activity of aromatic compounds related to shikimate pathway. *Pestic.Biochem. Physiol.*, 58 : 193-197.
- González JA, Estévez-Braun A (1998). Effects of (E)-chalcone on potato-cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*). *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1163–1165.
- Harborne JB (1998). *Phytochemical Methods*, Third Edition, Chapman & Hall, Londres.
- Henrick CA (1994). Pyrethroids. In: *Agrochemicals from Natural Products*, C.R.A. Godfrey (Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, 63-145.
- <https://oglobo.globo.com/sociedade/ciencia/prejuizo-com-fungos-de-us-60-bi-4624188>; accessed October 15, 2018.
- https://www.agrolink.com.br/noticias/por-ano-nematoides-causam-prejuizos-de-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-nacional_343212.html; accessed October 15, 2018.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, 14 : 33-38. doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5.
- Im YJ, Raychaudhuri S, Prinz WA, Hurley JH (2005). Structural mechanism for sterol sensing

and transport by OSBP-related proteins. *Nature*, 437:154-158.

Jardim IN, Oliveira DF, Silva GH, Campos VP, Souza PE (2017). (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *Journal of Pest Science*. DOI 10.1007 / s10340-017-0850-3.

Loiseleur, O (2017). Natural Products in the Discovery of Agrochemicals. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 71:810-822. DOI: 10.2533/chimia.2017.810.

McMaster MC (2008). GC / MS: A Practical Users Guide, Second edition. <https://doi.org/10.1002/9780470228357.ch7>.

Nunes AS, Campos VP, Mascarello A, Stumpf TR, Chiaradia-Delatorre LD, Machado ART, Santos Jr HM, Yunes RA, Nunes RJ, Oliveira DF (2013). Activity of chalcones derived from 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde against *Meloidogyne exigua* and in silico interaction of one chalcone with a putative caffeic acid 3-O-methyltransferase from *Meloidogyne incognita*. *Exp. Parasitol.*, 135:661–668. DOI:10.1016/j.exppara.2013.10.003.

Pessôa JC, Azevedo RF, Mota SF, Pinheiro S, Muri EMF, Souza EA, Oliveira DF (2018). Synthesis and Activity of 1,2,3-Triazolyl-chalcones Against the Fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Letters in Organic Chemistry*, 15 : 787-796.

Richards SA, Hollerton JC (2011). *Essential Practical NMR for Organic Chemistry*, John Wiley & Sons. DOI:10.1002/9780470976401.

Saint-Jean M, Delfosse V, Douguet D, Chicanne G, Payrastré B, Bourguet W, Antonny B, Drin G (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *J Cell Biol.*, 195:965-978.

Santos HM, Campos VAC, Alves DS, Cavalheiro AJ, Souza LP, Botelho DMS, Chalfoun SM, Oliveira DF (2014). Antifungal activity of flavonoids from *Heteropterys byrsonimifolia* and a commercial source against *Aspergillus ochraceus*: In silico interactions of these compounds with a protein kinase. *Crop Protection*, 62: 107-114. Available: <<http://hdl.handle.net/11449/111455>>.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI (2006). *Natural Products Isolation*, Second Edition, Humana Press, 515 p.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Seventh Edition, John Wiley & Sons, 550 p.

Sparks TC, Hahn DR, Garizi NV (2017). Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest Manag Sci.*, 73: 700–715.

Still WC, Kahn M, Mitra A (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate. *Journal of Organic Chemistry*, 43: 2923-2925. DOI: 10.1021/jo00408a041.

Stuart B (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, DOI:10.1002/0470011149.

Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem*, 31:455–461.

Wang X, Dai ZC, Chen YF, Cao LL, Yan W, Li SK, Wang JX, Zhang ZG, Ye YH (2017). Synthesis of 1,2,3-triazole hydrazide derivatives exhibiting anti-phytopathogenic activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 126:171-182.

Watson JT, Sparkman OD (2007). Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, Fourth Edition, John Wiley & Sons. 862 p.

Wei ZY, Chi KQ, Yu ZK, Liu HY, Sun LP, Zheng CJ, Piao HR (2016). Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives containing aminoguanidine or acylhydrazone moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26:5920-5925.

Wellings DA (2006). A Practical Handbook of Preparative HPLC, Elsevier, 176 p.

Filogenia molecular para o reconhecimento de espécies de *Fusarium*

Sarah da Silva Costa¹
Gláucia Mara Moreira²

1. Introdução

Várias espécies do gênero *Fusarium* são importantes patógenos de plantas cultivadas. Algumas espécies são conhecidas como produtoras de micotoxinas que representam uma ameaça à biossegurança agrícola e à segurança alimentar humana e animal. Na natureza ocorrem como saprófitas no solo e em restos vegetais ou como endófitos, colonizando o interior de plantas sem causar sintomas de doença. Além de espécies patogênicas a animais e humanos (Aoki et al. 2014; O'Donnell et al. 2015). A identificação precisa de um fitopatógeno, na maioria dos casos, nos fornece um nome de espécie. O nome científico é importante para a comunicação de informações relativas à espécie reconhecida, que pode incluir sua história evolutiva, ciclo de vida, distribuição, gama de hospedeiro, resistência a fungicidas, importância econômica e de biossegurança, bem como medidas de controle (Crous et al. 2015). Os conceitos utilizados para delimitar e identificar espécies fúngicas mudaram ao longo do tempo e um número crescente de espécies crípticas tem sido descobertas no gênero *Fusarium*. A filogenia molecular vem sendo aplicada para uma confiável identificação de espécies fitopatogênicas de *Fusarium* e, em consequência, para a obtenção de dados consistentes sobre a ocorrência e distribuição geográfica das espécies, para dar suporte a políticas de vigilância fitossanitária, e o desenvolvimento de protocolos de diagnose e identificação por técnicas moleculares.

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras MG, sarahscosta80@gmail.com; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36270-000, Viçosa MG, moreira.glaucia@gmail.com

2. Conceitos de espécies utilizados para a identificação de fungos

Três conceitos são comumente utilizados para o reconhecimento de espécies em fungos. O conceito de espécie morfológica enfatiza o critério de divergência morfológica e agrupa indivíduos que compartilham as mesmas características. O conceito de espécie biológica determina que indivíduos de uma mesma espécie sejam capazes de cruzar entre si e sua progênie seja viável e fértil. O conceito de espécie filogenética define espécies como o menor agrupamento de táxons que possuem um ancestral recente comum e que partilham de diferentes características (fenotípicas e genotípicas) derivadas de tal ancestral, formando grupos chamados monofiléticos (Taylor et al. 2000).

O conceito de espécie morfológica é o mais utilizado principalmente para uma classificação inicial, uma vez que, geralmente, pode ser aplicado a qualquer táxon (Leslie & Summerell 2006). Pode ser utilizado na comparação entre taxa existentes e novos. Entretanto, o principal problema deste conceito é que o número de caracteres facilmente detectáveis é muito menor que o número de espécies que precisam ser distinguidas. Por exemplo, a forma do macroconídio frequentemente é a que tem maior ponderação ao definir espécies de *Fusarium*, mas diferenças na forma e o tamanho podem ser confusas, subjetivas e dependentes do ambiente em que eles são produzidos (Leslie et al. 2001).

O conceito de espécie biológica é importante para auxiliar nas limitações que surgem na identificação, quando distintas entidades biológicas são morfológicamente muito similares. Este conceito implica em um grupo de indivíduos que podem cruzar e gerar descendentes férteis, ou seja, uma população delimitada por barreira reprodutiva. Assim, pode-se definir uma espécie biológica ou *mating population* através do cruzamento entre indivíduos de *mating types* opostos. O mecanismo básico de *mating type* é de um *locus MAT* e dois idiomorfos, *MAT1-1* e *MAT1-2*, que são sequências não relacionadas presentes na mesma posição do cromossomo. Em espécies heterotáticas só é possível o cruzamento entre dois isolados geneticamente diferentes, ou seja, entre *mating types* opostos, *MAT1-1* e *MAT1-2*. Portanto, isolados de uma espécie biológica não cruzam com isolados de uma outra espécie biológica, pois são incompatíveis sexualmente. Como exemplo tem-se *F. subglutinans*, que representa uma morfoespécie, ou seja, várias espécies apresentam as mesmas características morfológicas de *F. subglutinans*, mas que, ao se aplicar o conceito de espécie biológica, podem ser distinguidas em quatro espécies diferentes: *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. circinatum* e *F. konzum* (Leslie & Summerell 2006). Entretanto, existem dificuldades práticas na aplicação do conceito de espécie biológica para fungos que são assexuados, homotáticos (não necessita cruzar com outro isolado para reproduzir-se sexuadamente), somente cruzam na natureza e que não são cultiváveis, sendo, portanto, restrito a alguns grupos (Taylor et al. 2000).

O conceito de espécie filogenética se tornou o paradigma para o reconhecimento de espécies de fungos, pois se fundamenta em uma identificação baseada na história evolutiva contada por sequências de DNA. Para isto, as espécies filogenéticas são reconhecidas por filogenia molecular expressada em árvores filogenéticas. Isso tem sido responsável por um aumento no número de espécies crípticas reconhecidas nos últimos anos (O'Donnell et al. 2015). Assim, a filogenia molecular tem permitido acessar a diversidade de espécies de fungos, inclusive do gênero *Fusarium*, e a identificá-las corretamente, fornecendo subsídios para descrição de nova espécie e para segregação de espécies morfológicas em diferentes espécies filogenéticas. Além de gerar conhecimento para o desenvolvimento de *primers* específicos.

3. Reconhecimento de espécies filogenéticas com base em concordância genealógica de genes

Ao se identificar uma espécie filogenética algumas questões devem ser levadas em consideração. Uma delas discute sobre onde seria o limite das espécies. Isto porque, se determinado gene analisado contiver diferentes alelos entre indivíduos de uma espécie, na análise filogenética pode haver a separação desses indivíduos em diferentes ramos, porém, não indicando espécies distintas, mas apenas variações intraespecíficas (Taylor et al. 2000). Neste caso, a topologia de ramificação da árvore estaria de acordo com os alelos de genes de cada espécie, representando, assim, uma árvore de genes e não uma árvore de espécies, que reflete os caminhos evolutivos (Maddison 1997; Pamilo & Nei 1988).

Outra questão sobre o reconhecimento de espécies filogenéticas seria a utilização de regiões ribossomais para a identificação de espécies, como a LSU rDNA. Embora utilizada para a identificação de alguns taxa, esta região é comumente empregada para investigações das relações filogenéticas entre certos grupos de fungos em nível de gênero ou um maior nível taxonômico, pois trata-se de uma região muito conservada e pode não separar táxons muito próximos (Zhao et al. 2011). O uso de ITS rDNA para identificação de espécies em *Fusarium* é ainda mais complicado pela presença de divergentes parálogos ou xenólogos, como observado entre isolados de seis complexos de espécies de *Fusarium*: *concolor*, *babinda*, *redolens*, *oxysporum* e *fujikuroi* (O'Donnell et al. 1998a; O'Donnell et al. 1998b; O'Donnell et al. 2009a; O'Donnell et al. 2015). Para evitar a subjetividade da determinação do limite das espécies, devem-se utilizar diferentes *loci* polimórficos nas análises filogenéticas comparando as diferentes genealogias de genes. Quando há uma concordância entre as diferentes árvores geradas a partir de diferentes genes, elas apresentam a mesma topologia (Taylor et al. 2000; Rosenberg & Nordborg 2002). Esse método para reconhecimento de espécies é denominado concordância genealógica, que utiliza do conceito em inglês *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR),

introduzido por Taylor et al (2000). A concordância genealógica permite a identificação de diversas espécies distintas que compreendem uma única espécie morfológica (Salgado-Salazar et al. 2015). Esses são os chamados complexos de espécies e existem vários exemplos para o gênero *Fusarium* (O'Donnell et al. 2009b; Laurence et al. 2014; Herron et al. 2015). Análises baseadas em GCPSR para *Fusarium* nos últimos anos resultaram na identificação de 300 espécies filogenéticas distintas e 20 complexos de espécies (O'Donnell et al. 2015).

O primeiro gene codificador de proteínas na filogenia molecular em *Fusarium* foi β -tubulina (O'Donnell & Cigelnik 1997; O'Donnell et al. 1998a). No entanto, a sua utilidade é limitada devido à presença de divergentes parálogos dentro dos complexos de espécies *F. solani*, *F. incarnatum-equiseti* e *F. chlamydosporum* (O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2009b). Após anos de pesquisa, hoje já se sabe que as regiões gênicas que permitem delimitar as espécies de *Fusarium* são fator de elongação 1- α (*TEF-1 α*), maior e segunda maior subunidade da RNA polimerase (*RPB1* e *RPB2*) (Geiser et al. 2004; O'Donnell et al. 2013; O'Donnell et al. 2015). Embora a filogenia molecular e a sistemática de *Fusarium* tenham sido empregadas como um modelo que delimita espécies e relações evolutivas dentro de várias das mais importantes linhagens de fitopatógenos, ainda algumas linhagens não são totalmente resolvidas, especialmente dentro dos mais recentes clados, como por exemplo as linhagens 3 e 4 do complexo de espécies *F. solani* que foram consideradas como uma única linhagem denominada FSSC 3+4 (O'Donnell et al. 2008). Esta falta de resolução entre as linhagens também pode ser observada nos complexos *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* e *F. sambucinum* (O'Donnell et al. 1998a; O'Donnell et al. 1998b; O'Donnell et al. 2013). Dessa forma, para o reconhecimento de espécies filogenéticas, deve-se utilizar mais que um isolado por espécie e diferentes *loci* polimórficos para defini-las.

Uma busca por sequências confiáveis de *Fusarium* pode ser realizada nos bancos de dados FUSARIUM-ID (<http://isolate.fusariumdb.org/>; Geiser et al. 2004; Park et al. 2010), *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/>; O'Donnell et al. 2010), pois as sequências foram autenticadas a partir de estudos baseados em GCPSR. Um fluxograma delineando 10 passos para uma correta identificação de *Fusarium* foi elaborado por O'Donnell et al (2015) e é mostrado na quadrol.

QUADRO 1. Fluxograma delineando 10 passos para uma correta identificação de *Fusarium* segundo O'Donnell et al (2015).

Identificação de *Fusarium* baseado em sequências em 10 simples passos

- 1) Corrija cromatogramas de sequências completamente e cuidadosamente;
- 2) Utilize *TEF-1 α* , *RPB1* e/ou *RPB2* e evite ITS+LSU rDNA;
- 3) Consulte *Fusarium* MLST ou FUSARIUM-ID antes do GenBank;
- 4) Verifique novamente os cromatogramas nas posições onde os gaps estão nos alinhamentos do BLASTn;
- 5) Verifique cuidadosamente os nomes das espécies associadas aos principais hits do BLASTn;
- 6) Colete dados de sequência de DNA de dois *loci* independentes quando possível
- 7) Estudos de GCPSR publicados podem ajudar a avaliar quando a porcentagem de similaridade indica a conspecificidade;
- 8) Familiarize-se com a nomenclatura ad hoc de espécies-haplótipos utilizada em alguns clados;
- 9) Contate coleções de cultura (CBS-KNAW, FRC e NRRL) para obter informações sobre isolados;
- 10) É mais provável que erros de identificação sejam detectados e corrigidos em revistas melhores.

4. Estudos de caso

4.1 *Fusarium solani* species complex (FSSC)

Fusarium solani é um nome que tem sido aplicado para o que hoje se conhece como *Fusarium solani* species complex. FSSC compreende várias espécies importantes como patógenos de plantas cultivadas, principalmente nas regiões tropical e sub-tropical. Existem ainda espécies conhecidas como produtoras de toxinas e outras que causam doenças em humanos e em animais. Na natureza ocorrem como saprófitas no solo e em restos vegetais e como endófitas (Booth 1971, Gerlach & Nirenberg 1982; Zhang et al. 2006; Nalim et al. 2011).

Muitas espécies e populações do FSSC foram identificadas primeiramente com o nome *F. solani* e, posteriormente, classificadas em *formae speciales*, com base na patogenicidade específica à determinada planta. No entanto, o conceito de espécie baseado somente em caracteres morfológicos não reflete a real diversidade de espécies e populações nesse complexo (Baayen et al. 2000; O'Donnell 2000).

Estudos baseados em sequências de multilocus revelaram que o FSSC é composto por, pelo menos, 60 espécies filogenéticas, algumas delas definidas também como espécies biológicas ou *mating populations* (MP), que antes eram desconhecidas por causa da semelhança morfológica. Espécies deste complexo foram distribuídas em três clados. No clado 1 estão *F. illudens*, encontrado em associação com a planta *Beilschmiedia tawa*, e *F. plagianthi*, associado à planta *Hoheria glabrata*. O clado 2 é composto por isolados associados à podridão vermelha de raiz da soja e à podridão radicular seca de feijoeiro. O clado 3, mais diverso, é composto por patógenos de várias plantas cultivadas e espécies de ambiente hospitalar (O'Donnell 2000; O'Donnell et al. 2008; O'Donnell et al. 2015; Sandoval-Denis & Crous 2018). O conceito biológico permitiu uma definição mais acurada no sistema de classificação de espécies que causam doenças em plantas cultivadas (Nirenberg & O'Donnell 1998; Leslie & Summerell 2006). Dentro do complexo *Fusarium solani* já foram descritas nove espécies biológicas que foram definidas também como linhagens filogenéticas: *F. petrophilum* (MP-V) e *F. solani* f. sp. *cucurbitae* (MP-I) causam podridão de frutos em *Cucurbita* spp.; *F. solani* f. sp. *batatas* (MP-II), patógeno de batata; *F. solani* f. sp. *mori* (MP-III), patógeno de *Morus alba*; *F. solani* f. sp. *xanthoxyli* (MP-IV), patógeno de *Xanthoxylum piperitum*; *F. solani* f. sp. *pisi* (MP-VI), causador da fusariose em ervilha; *F. solani* f. sp. *robiniae* (MP-VII), patógeno de *Robinea* sp. (Matuo & Snyder 1973); *F. tucumaniae* e *F. paranaense*, agentes etiológicos da podridão vermelha da raiz da soja (Matuo & Snyder 1973; Covert et al. 2007; Costa et al. 2016).

4.1.1 Diversidade de espécies do FSSC envolvidos na etiologia da podridão vermelha da raiz da soja

A podridão vermelha da raiz da soja (PVR) ou síndrome da morte súbita da soja (*sudden death syndrome of soybean* – SDS) foi relatada, pela primeira vez, nos Estados Unidos em 1973, e no Brasil na década de 1980 (Rupe 1989; Nakajima et al. 1996). *Fusarium solani* foi considerado agente etiológico, com base nas características morfológicas, que são crescimento lento em meio de batata (BDA), produção de uma massa azulada com grande quantidade de macroconídios (30–65 × 6–8 µm) com 3 a 5 septos e pouca ou nenhuma presença de microconídios (Rupe 1989). Os isolados de *F. solani* capazes de induzir sintomas PVR em soja foram reconhecidos como *F. solani* f. sp. *glycines* (Roy et al. 1997).

Aplicando-se filogenia molecular baseada em sequências multigênicas foi verificado que *F. solani* f. sp. *glycines* trata-se de pelo menos oito espécies/linhagens filogeneticamente distintas do FSSC que incluem *F. tucumaniae*, *F. virguliforme*, *F. brasiliense*, *F. crassistipitatum*, *F. paranaense*, *F. falciforme*, *F. solani* sensu stricto e a linhagem FSSC 11 (Aoki et al. 2003; Aoki et al. 2005; Aoki et al. 2011; Costa et al. 2016; Chitrampalam & Nelson 2016). Destas espécies, *F. tucumaniae* e *F. paranaense* foram reconhecidas como espécies biológicas com base em teste de compatibilidade

sexual (Covert et al. 2007; Costa et al. 2016). O conjunto destes resultados evidencia a inconsistência da identificação tradicional de espécies dentro desse complexo, baseada apenas em características morfológicas.

4.2 *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC)

Fusarium oxysporum se destaca como patógeno do solo responsável por murcha vascular, podridão e tombamento de uma ampla gama de culturas agronomicamente e horticulturalmente importantes. A diversidade das populações é evidenciada pela quantidade de *formae speciales*, formas específicas com patogenicidade a determinada planta. Em *F. oxysporum*, mais de 150 *formae speciales* foram observadas, as quais representam, na verdade, um grande número de linhagens filogenéticas diferentes que apresentam características biológicas e agrônômicas distintas (Baayen et al. 2000; O'Donnell et al. 2009a). Por se tratar de um complexo de espécies que se reproduz assexuadamente, o conceito de espécie biológica não pode ser empregado. Estudos de diversidade em isolados de *F. oxysporum* foram conduzidos usando vários métodos fisiológicos e moleculares, que incluíam Grupos de Compatibilidade Vegetativa (VCGs; Moore et al. 1993), RAPDs (Bentley et al. 1995), RFLP (Koenig et al. 1997), AFLP (Groenewald et al. 2006). A tipagem de sequência de DNA de multilocus (MLST) atualmente representa a abordagem mais robusta para caracterizar a diversidade genética de *F. oxysporum* (O'Donnell et al. 2009a). Para este fim foi feita uma avaliação da utilidade de *TEF-1α* e da sequência de região intergênica do DNA ribossomal (IGS rDNA) para o desenvolvimento de um banco de dados. Entretanto, a análise de congruência identificou relações conflitantes entre a agrupamentos filogenéticos dos isolados com base no gene *TEF-1α* e IGS rDNA, sugerindo que algumas das sequências de IGS rDNA podem ser não ortólogas (O'Donnell et al. 2009a). Nesse trabalho, dos 850 isolados tipificados (*sequences type* – ST), 101 ST foram identificados com base em *TEF-1α*, 203 em IGS rDNA e 256 com base nos dois *loci* foram diferenciados. A discordância genealógica envolvendo o IGS rDNA exclui o uso deste *locus* para a filogenética molecular dentro do FOSC (Skovgaard et al. 2001; Mbofung et al. 2007; Fourie et al. 2009; O'Donnell et al. 2009a). Da mesma forma, filogenias discordantes foram recuperadas empregando quatro genes de poligalacturonase (Hirano & Arie, 2009) e uma região de repetição mitocondrial (Fourie et al. 2009).

4.2.1 Diversidade de espécies do FOSC envolvidos na etiologia da doença do mal do panamá

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (Foc) é o agente etiológico do mal do panamá na bananeira, que causa grandes perdas na produção. Um estudo foi realizado na Indonésia, que é o centro de origem das bananas silvestres e cultivadas e onde provavelmente houve a co-evolução da banana com Foc. Foram obtidos ~200

isolados de 40 diferentes variedades de banana e por meio da filogenia molecular utilizando sequências de *TEF-1a*, *RPB1* e *RPB2* foi possível identificar nove linhagens filogenéticas distintas de Foc, ou seja, existem nove espécies filogenéticas diferentes capazes de induzir os mesmos sintomas em um mesmo hospedeiro. Essas nove linhagens de Foc foram formalmente descritas (Maryani et al. 2018). Este trabalho foi o início para a gradativa substituição do sistema de *formae speciales* por espécies formalmente descritas do FOOSC, que representam agentes etiológicos de relevantes fitodoenças.

4.3 *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC)

O complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* correspondia principalmente à seção *Liseola*. Esta seção foi estabelecida para agrupar espécies caracterizadas pela produção de macroconídios em esporodóquios ou pionotos, microconídios em falsas cabeças e/ou cadeias e que não produzem clamidósporos (Leslie & Summerell 2006). Em seguida foi estabelecida a seção *Dlaminia*, a qual abrigava quatro espécies com as mesmas características morfológicas, mas que produziam clamidósporos. Estudos mostraram, por meio de filogenia molecular (β -tubulina, mtSSU, 28S rDNA), que ambas as seções não eram monofiléticas e estabeleceram o complexo de espécies *F. fujikuroi* (anteriormente *Gibberella fujikuroi*). No complexo estavam 36 espécies filogenéticas, que incluíam aquelas da seção *Liseola*, três da seção *Dlaminia* e espécies de outras seções, como *Discolor*, *Lateritium* e *Elegans* (Nirenberg & O'Donnell 1998; O'Donnell et al. 1998a).

A partir dos estudos realizados por O'Donnell et al (1998a) e utilizando a análise combinada que incluiu mais duas regiões não ligadas do genoma (β -tubulina, mtSSU, 28S rDNA, *TEF-1a* e calmodulina), foi possível reconhecer 53 espécies filogenéticas dentro de FFSC. O número de espécies do FFSC reconhecidas com base na filogenia molecular vem crescendo à medida que diferentes ecossistemas estão sendo estudados (Marasas et al. 2001; Lima et al. 2012; Herron et al. 2015; Moussa et al. 2017; Sandoval-Denis et al. 2018).

Além disso, a filogenia molecular confirmou a robustez do conceito de espécie biológica neste complexo, pois todas as 17 espécies biológicas descritas para FFSC foram também reconhecidas como espécies filogenéticas. Por outro lado, o conceito morfológico aplicado para a espécie *Fusarium subglutinans*, como estabelecido por Nelson et al (1983), foi reavaliado com várias espécies filogenéticas apresentando os mesmos marcadores morfológicos de *Fusarium subglutinans*. A partir de então, apenas a população associada ao milho (*Zea mays*), a *mating population* E, continuou sendo chamada de *Fusarium subglutinans*, porque foi a primeira população estudada a apresentar estas características. Com isso, todas as outras espécies filogenéticas com características morfológicas de *Fusarium subglutinans sensu* Nelson passaram a ser reclassificadas, recebendo outros nomes específicos (Nirenberg & O'Donnell 1998; O'Donnell et al. 1998a, 2000a; Steenkamp et al. 2000; Britz et al. 1999, 2002; Lima

et al. 2012). *Fusarium subglutinans sensu* Nelson possui morfologia que representa pelo menos quatro espécies biológicas e várias espécies anamórficas em diferentes hospedeiros como abacaxizeiro e mangueira.

5. Conclusão

A aplicação da filogenia molecular tem levado ao entendimento da diversificação evolutiva e as implicações taxonômicas da morfologia dentro de uma robusta estrutura filogenética. Assim, espécies com diferenças morfológicas sutis podem ser reconhecidas, com base em números substanciais de substituições de nucleotídeos, em espécies filogenéticas de evolução independente. A correta identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas a culturas de importância econômica é fundamental para programas de monitoramento de doenças e melhoramento genético das culturas.

Referências

- Aoki T, O'Donnell K, Homma Y, Lattanzi AR (2003). Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia*, 95:660–684.
- Aoki T, O'Donnell K, Scandiani MM (2005). Sudden death syndrome of soybean in south America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, 46:162–183.
- Aoki T, Scandiani MM, O'Donnell K (2011). Phenotypic, molecular phylogenetic, and pathogenetic characterization of *Fusarium crassispitatum* sp. nov., a novel soybean sudden death syndrome pathogen from Argentina and Brazil. *Mycoscience*, 53:167–186.
- Aoki T, O'Donnell K, Geiser DM (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80:189–201.
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroeck EJ, Waalwijk C (2000). Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90:891–900.
- Bentley S, Pegg KG, Dale JL (1995). Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPDPCR fingerprinting. *Mycological Research*, 99:1378–1384.
- Booth C (1971). The genus *Fusarium*. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 237 p.
- Britz H, Coutinho TA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Gordon TR, Leslie JF (1999). *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1198–1201.

Britz H, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield BD, Marasas WFO, Wingfield MJ (2002). Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. *Mycologia*, 94:722–730.

Chitrampalam P, Nelson JRB (2016). Multilocus phylogeny reveals an association of agriculturally important *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, and clinically important FSSC 5 and FSSC 3 + 4 with soybean roots in the north central United States. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109:335–347.

Costa SS, Matos KS, Tessmann DJ, Seixas CD, Pfenning LH (2016). *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology*, 20:51–60.

Covert SF, Aoki T, O'Donnell K, Starkey D, Holliday A, Geiser DM, Cheung F, Town C, Strom A, Juba J, Scandiani M, Yang XB (2007). Sexual reproduction in the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium tucumaniae*. *Fungal Genetics and Biology*, 44:799–807.

Crous PW, Hawksworth DL, Wingfield MJ (2015). Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. *Annual Review of Phytopathology*, 53:247–67.

Fourie G, Steenkamp ET, Gordon TR, Viljoen A (2009). Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:4770–4781.

Geiser DM, Jiménez-Gasco MDM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kulda GA, O'Donnell K (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110:473–479.

Gerlach W, Nirenberg H (1982). The genus *Fusarium* – pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*, 406 p.

Groenewald S, Van DBN, Marasas WF, Viljoen A (2006). The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mycological Research*, 110:297–305.

Herron DA, Wingfield MJ, Wingfield BD, Rodas, CA, Marincowitz S, Steenkamp, ET (2015). Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. *Studies in Mycology*, 80:131–150.

Hirano Y, Arie T (2009). Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. *Microbes and Environments*, 24:113–120.

Koenig RL, Ploetz RC, Kistler HC (1997). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. *Phytopathology*, 87:915–923.

Laurence MH, Summerell BA, Burgess LW, Liew EC (2014). Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118:374–384.

Leslie JF, Summerell BA (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell, 388 p.

Lima CS, Pfenning LH, Costa SS, Abreu LM, Leslie JF (2012). *Fusarium tuiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia*, 104:1408–1419.

- Maddison WP (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46:523–536.
- Marasas WFO, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF (2001). *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*, 93:1203–1210.
- Maryani N, Lombard L, Poerba YS, Subandiyah S, Crous PW, Kema GHJ (2018). Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin, *Studies in Mycology*, 92:155–194.
- Matuo T, Snyder WC (1973). Use of morphology and mating populations in the identification of *formae speciales* in *Fusarium solani*. *Phytopathology*, 63:562–565.
- Mbofung GY, Hong SG, Pryor BM (2007). Phylogeny of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* inferred from mitochondrial small subunit, elongation factor 1- α , and nuclear ribosomal intergenic spacer sequence data. *Phytopathology*, 97:87–98.
- Moore NY, Pegg KG, Allen RN, Irwin JAG (1993). Vegetative compatibility and distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Australia. *Animal Production Science*, 33:797–802.
- Moussa TAA, Al-Zahrani HS, Kadasa NMS, Ahmed SA, De Hoog GS, Al-Hatmi AMS (2017). Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110:819–832.
- Nakajima T, Mitsueda T, Charchar MJD (1996). First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *Japanese Agricultural Research Quarterly*, 30:31–34.
- Nalim FA, Samuels GJ, Wijesundera RL, Geiser DM (2011). New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. *Mycologia*, 103:1302–1330.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983). *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nirenberg HI, O'Donnell K (1998). New species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90:434–458.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7:103–116.
- O'Donnell K, Cigelnik E, Nirenberg HI (1998a). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90:465–493.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998b). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:2044–2049.
- O'Donnell K (2000). Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 92:919–938.
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E (2000). A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41:61–78.
- O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, Zhang N, Geiser DM (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:2477–2490.

- O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, Riley R, Zitomer NC, Colyer P, Waalwijk C, Lee Tv, Moretti A, Kang S, Kim HS, Geiser DM, Juba JH, Baayen RP, Cromey MG, Bithell S, Sutton DA, Skovgaard K, Ploetz R, Corby KH, Elliott M, Davis M, Sarver BA (2009a). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46:936–948.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM (2009b). Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:3851–3861.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers HJ, Summerbell RC, Robert VARG, Crous PW, Zhang N, Aoki T, Jung K, Park J, Lee YH, Kang S, Park B, Geiser DM (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:3708–3718.
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJ, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VA, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM (2013). Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52:20–31.
- O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM, Kang S (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43:583–595.
- Pamilo P, Nei M (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5:568–583.
- Park B, Park J, Cheong KC, Choi J, Jung K, Kim D, Lee YH, Ward TJ, O'Donnell, Geiser DM, Kang S (2010). Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics, and knowledge sharing. *Nucleic Acids Research*, 39:640–646.
- Rosenberg NA, Nordborg M (2002). Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature*, 3:380–390.
- Roy KW, Hershman DE, Rupe JC, Abney TS (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease*, 81:1100–1111.
- Rupe JC (1989). Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. *Plant Disease*, 73:581–584.
- Salgado-Salazar C, Hirooka Y, Samuels GJ, Rossman AY, Sanchez RM, Chaverri P (2015). Phylogeny and taxonomic revision of *Thelonectria discophora* (Ascomycota, Hypocreales, Nectriaceae) species complex. *Fungal Diversity*, 70:1–29.
- Sandoval-Denis M, Crous PW (2018). Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. *Persoonia* 41:109–129.
- Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW (2018). Symptomatic Citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia*, 40:1–25.
- Skovgaard K, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rosendahl S (2001). Evolution of *Fusarium*

oxysporum f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. *Phytopathology*, 91:1231–1237.

Steenkamp ET, Britz H, Coutinho T, Wingfield B, Marasas W, Wingfield M (2000). Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Molecular Plant Pathology*, 1:187–193.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31:21–32.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infection in both humans and plants are common in the environment. *Journal Clinical Microbiology*, 44:2186–2190.

Zhao P, Luo J, Zhuang WY (2011). Practice towards DNA barcoding of the nectriaceous fungi. **Fungal Diversity**, 46:183–191.

Avanços na biotecnologia aplicada ao controle de fitonematoides

Julio Carlos Pereira da Silva
Yasmim Freitas Figueiredo

1. Introdução

Estima-se que o prejuízo anual gerado por ataque de fitonematoides é de aproximadamente 100 bilhões de dólares, representando cerca de 12% da produção mundial de alimentos (Abad et al., 2008; Jones et al., 2013; Trudgill & Blok, 2001). O controle destes patógenos é geralmente realizado pela aplicação de nematicidas químicos, quando a resistência das plantas não está disponível. Entretanto, esses produtos são tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, e muitas vezes não alcançam resultados significantes no controle. Dessa maneira, novas tecnologias baseadas na interação nematoide-hospedeiro abrem novos caminhos para o manejo de fitonematoides de forma mais eficaz e sustentável.

A partir da descrição do genoma do nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) em 2008 a nematologia de plantas tem evoluído no estudo da interação patógeno-hospedeiro. A Genômica comparativa e funcional auxiliou no desenvolvimento de novas técnicas para detecção e controle de fitonematoides (Abad et al., 2008; McCarter, 2008). As novas tecnologias para controle de nematoides têm como objetivos: buscar diferentes fontes de resistência natural nos genomas de espécies não hospedeiras; empregar novas formas de resistência; atuar na expressão de proteínas ou peptídeos para o silenciamento de genes (RNAi); buscar compostos nematicidas menos tóxicos ao ambiente; e, explorar microrganismos antagonistas como possíveis agentes de biocontrole (Escobar & Fenoll, 2015; Topalović & Heuer, 2018) (Tabela 1).

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras MG, julioufla@yahoo.com.br

Os avanços recentes tornam possível explorar aspectos mais específicos das interações planta-nematoide. Assim, podem ser desenvolvidas estratégias de controle que impeçam a infecção do nematoide, sua progressão nos tecidos, seu estabelecimento e a redução da capacidade de alimentação/reprodução. O conhecimento de quais genes estão relacionados ao parasitismo do nematoide também pode ser usado para desenvolvimento de novos princípios químicos com atuação mais precisa. Entretanto, essas novas estratégias devem estar disponíveis para serem entregues comercialmente e facilmente aplicáveis no campo. No caso de tecnologias transgênicas, além dos problemas de implantação, como testes de eficiência em campo, regulamentações ambientais e de segurança humana, existem os problemas de aceitação pública dos organismos geneticamente modificados (OGMs) pelo consumidor (Fosu-Nyarko & Jones, 2015). Dessa maneira, as estratégias para o controle de nematoides relacionadas com técnicas transgênicas e edição de genoma devem ser esclarecidas para população em relação aos benefícios e possíveis riscos.

O manejo de fitonematoide em campos de cultivo é cada dia mais destacado como demanda em empresas de biotecnologia. Com os avanços nos estudos biotecnológicos, a liberação de variedades comerciais com novas formas de resistência a nematoides, novos modos de aplicação de agentes de biocontrole e novas moléculas químicas podem se tornar rapidamente disponíveis como produto comercial.

TABELA 1. Novas estratégias biotecnológicas no controle de fitonematoides

Modo de controle	Consideração/Atuação	Exemplo
Parasitismo e outros mecanismos biológicos	Microrganismos podem atuar diretamente no nematoide desde a penetração até a reprodução.	Produtos biológicos registrados como bionematicidas.
Ação nematostática ou nematicida	Compostos nematicidas e modos de aplicação mais sustentáveis.	Novos nematicidas menos tóxicos estão disponíveis para aplicação mais precisas como gotejamento ou tratamento de sementes.
Genes de resistência natural	A obtenção e combinação de genes de resistência natural, de espécies cultivadas ou selvagens, tem sustentado as estratégias de melhoramento.	A seleção assistida por marcadores (MAS) para a resistência a nematoides tornou-se rotina em muitos programas de melhoramento, embora genes de resistência eficazes não estejam disponíveis para todas as culturas.

cont.

Modo de controle	Consideração/Atuação	Exemplo
Migração na rizosfera e penetração na raiz	Interferência nas funções sensoriais e comunicação.	Peptídeos que inibem a recepção de gradientes nos órgãos labiais (anfídeos); RNAi interferindo em proteínas/função dos anfídeos; Agentes biológicos interferindo na comunicação entre o nematoide e raiz; Compostos nematostáticos de plantas e microrganismos.
Movimento no interior da raiz	Enzimas que degradam a parede podem ser requeridas para migração de Endoparasitas; Conjunto específicos de compostos em raízes detectados na migração para indicar o local desejado na raiz.	Regulação por RNAi da expressão de enzimas que degradam a parede celular; Inibição de detecção sensorial dentro das raízes.
Mecanismo de defesa da planta	Indução de resistência e efetores que permitem que os nematoides escapem ou neutralizem as defesas do hospedeiro.	Ativação das rotas de defesa e <i>priming</i> do hospedeiro; Regulação por RNAi da expressão de efetores envolvidos na prevenção de defesas do hospedeiro.
Genes essenciais do nematoide	Impedimento da expressão de genes essenciais no ciclo de vida do nematoide.	Regulação por RNAi da expressão de genes importantes para o desenvolvimento do nematoide.
Genes de suscetibilidade de plantas hospedeiras a nematoides	Novas abordagens para edição de genoma agora disponíveis para modificação de genes.	Novas tecnologias não necessariamente consideradas como OGM, ou mais legalmente aceitáveis como CRISPR.

2. Mecanismos de defesa ativados contra fitonematoides

Fitonematoides invadem seus hospedeiros e permanecem nos tecidos por vários dias ou semanas. Dessa maneira, apresentam grande potencial de serem reconhecidos por receptores de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). No entanto, até a atualidade, pouco se conhece da interação de PAMPs para o reconhecimento de sinais de fitonematoides. Isto pode ocorrer devido às várias estratégias desenvolvidas por nematoides para suprimir a Imunidade Desencadeada por PAMP (PTI) (Davies & Curtis, 2011). Uma vez dentro da raiz da planta, os nematoides em desenvolvimento passam por ecdises consecutivas sendo que, em cada uma delas, a cutícula apresenta uma nova composição, criando assim um novo desafio para o sistema de defesa da planta. Mesmo não estando claro vários aspectos

do reconhecimento, a invasão de nematoides ativa a resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, 12 horas após a penetração da raiz por *M. incognita*, genes que codificam peroxidases, lipoxigenases e inibidores de proteinase são induzidos (Gheysen & Fenoll, 2002). Além disso, estudos de inoculação com juvenis de segundo estágio em raízes mostram que somente uma fração deles conseguem penetrar nas raízes e induzirem a formação de sítios de alimentação (Tytgat et al., 2002; Wyss & Grundler, 1992). Conjuntamente, estas evidências apontam para um PTI fraco que pode gerar sinais de *priming* para uma defesa forte ocorrida mais tardiamente (Miyara, Ionit, Buki, & Kolomiets, 2015). Nos últimos anos avanços nos estudos de PAMPs, ou no caso de nematoides NAMPs (Padrões Moleculares Associados a Nematoides), vêm demonstrando a importância de uma classe de moléculas no reconhecimento de nematoides. Os ascarosídeos são pequenas moléculas do grupo dos glicosídeos que atuam como feromônios para nematoides e são altamente conservadas (Choe et al., 2012). Vários ascarosídeos já foram identificados em fitonematoides de importância como *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines*. As plantas tratadas com um ascarosídeo denominado Ascr#18 aumentaram a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis thaliana*. Além disso, o reconhecimento do NAMP tornou *Arabidopsis*, tomate, batata e cevada menos suscetíveis a uma ampla gama de patógenos, que incluem vírus, bactérias, oomicetos, fungos e nematoides (Manosalva et al., 2015).

A indução de resistência contra fitonematoides ocorre local ou sistemicamente. Estudos com análise de microarranjo em *A. thaliana* atacada pelo nematoide do cisto *Heterodera schachtii* revelou forte indução de VSP2, um gene marcador para a rota de defesa do ácido jasmônico (JA), em todo o sistema radicular 3 dias após a inoculação (Puthoff, Nettleton, Rodermel, & Baum, 2003). Da mesma forma, o transcriptoma da interação de plantas de soja com o nematoide de cisto *Heterodera glycines*, mostrou uma indução da via de JA em todo o sistema radicular (Alkharouf et al., 2006). Uma comparação da sinalização de defesa sistêmica após a infecção de arroz com *Hirschmanniella oryzae* mostrou que após a inoculação com o nematoide, a via sistêmica de JA e etileno (ET) é induzida após 3 dias, enquanto a via do ácido salicílico (AS) é suprimida. Entretanto, uma resposta diferente é observada com a inoculação de *M. graminicola*, onde a ativação de ambos SA e JA ocorre após 3 dias, enquanto aos 7 dias o JA é reprimido (Kyndt et al., 2012).

Geralmente, os nematoides endoparasitas sedentários como *Meloidogyne* e *Heterodera* induzem inicialmente as vias JA, ET e SA. Estes três fitohormônios atuam nas respostas de defesa individualmente, e também interagem sinergicamente ou antagonisticamente para resultar em posterior defesa. Isso ocorre devido aos nematoides sedentários estabelecerem uma interação mais íntima com seus hospedeiros manipulando o equilíbrio hormonal nas células hospedeiras através de moléculas relacionadas à patogênese ou efetores (Miyara et al., 2015). Muitos efetores são produzidos pela células das glândulas esofagianas no gênero *Meloidogyne* e são secretadas no hospedeiro através do estilete, tendo um papel importante na formação

de células gigante (Davis et al., 2000; Hewezi & Baum, 2013; Mitchum et al., 2013). As proteínas secretadas são conhecidas por desempenhar um papel importante em outros aspectos no parasitismo, incluindo invasão, migração e proteção contra respostas de defesa do hospedeiro (Abad & McCarter, 2011; Mitchum et al., 2013). Apesar da maioria dos estudos focarem em secreções oriundas dessas glândulas, proteínas efetoras também podem ser produzidas por outros órgãos secretores, como a cutícula, anfidios e as glândulas retais. A contribuição de muitos efetores identificados no parasitismo está relacionada com a alteração da célula vegetal e no auxílio ao desenvolvimento do nematoide. Já as enzimas que degradam a parede celular têm mostrado um papel na penetração, na migração intercelular do nematoide, na expansão e espessamento da parede celular e na formação de células gigantes (Davis, Haegeman, & Kikuchi, 2011). Além disso, a corismato mutase dos nematoides atua na via do chiquimato da planta diminuindo a síntese de SA e fitoalexinas, podendo reduzir a defesa do hospedeiro. O secretoma de *M. incognita* contém cerca de 486 proteínas (Bellafiore et al., 2008) e muitas delas podem estar envolvidas no reconhecimento ou Imunidade Desencadeada por Efetores (ETI). No entanto, a maioria dos efetores não têm função claramente identificada no ETI, demonstrando a necessidade de estudos mais aprofundados no reconhecimento de planta a fitonematoides.

Um dos métodos para avaliação da indução de resistência a fitonematoides é a técnica da raiz bipartida ou *split-root*. Em estudo recente, Martínez-Medina et al. (2017) testaram a indução de resistência pelo fungo *Trichoderma harzianum* na reprodução de *M. incognita*. Eles encontraram uma redução significativa nas galhas e na reprodução dos nematoides, tanto local quanto sistemicamente, quando as plantas foram pré-inoculadas com o fungo. Além disso, este estudo mostrou a ação sinérgica de ambas as vias mediadas por SA-JA. Estudo com *Trichoderma atroviride* na indução contra nematoide das galhas também demonstrou redução nas galhas e ovos do nematoide e o efeito *priming* foi transmitido para os descendentes das plantas tratadas (De Medeiros et al., 2017).

3. Busca de resistência natural em populações de plantas

A maioria das culturas economicamente importantes apresentam níveis relevantes de suscetibilidade a mais de uma espécie de fitonematoide. Assim, a transferência de genes R de fontes naturais de resistência contra fitonematoides é a tática mais econômica e ambientalmente sustentável para reduzir danos de doenças e pragas. A busca por grupos de genes envolvidos na resistência acontece em cultivares ou plantas selvagens próximas taxonomicamente da espécie ou cultivar de interesse. Para isso, geralmente é realizada uma seleção de resistência em germoplasma de ancestrais selvagens ou progenitores de cultivares de determinadas culturas, o mapeamento de loci de caracteres quantitativos, a clonagem e talvez o isolamento e caracterização dos genes responsáveis por conferir resistência. Métodos moleculares

usados para mapeamento de populações incluem *Restriction Amplified Length Polymorphisms* (RFLPs), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLPs), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), *Sequenced Characterised Amplified Regions* (SCAR) e *Sequence Tagged Site* (STS) e, mais recentemente, tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS; *Deep Sequencing*).

O objetivo principal da identificação de genes de resistência é a introdução em outras culturas suscetíveis de importância econômica, para aumentar o rendimento, qualidade e reduzir os custos no manejo. Embora vários casos de sucesso com genes de resistência a nematoides (por exemplo, cultivares de tomate com o gene *Mi* ou de batata com o gene *H1*), existem poucos relatos de transferência bem sucedida de genes R caracterizados em novas espécies devido a vários problemas como a falta de interações entre proteínas de diferentes espécies. Por exemplo, mesmo em cultivares de tomate com o gene *Mi* existe variação na resistência a *M. incognita*, de acordo com a sua herança genética (Jacquet et al., 2005). Assim, características poligênicas envolvidas no ataque do nematoide podem ser transmitidas pela herança genética e interferir na durabilidade do efeito monogênico de genes R.

4. Abordagens transgênicas aplicadas no controle de fitonematoides

A engenharia genética tem sido excepcional para o desenvolvimento da resistência a nematoides em plantas cultivadas (Ali et al., 2017). O crescente número de publicações e pesquisas relacionadas à expressão e edição gênica demonstram que a transformação de plantas e microrganismos é uma ferramenta sustentável e efetiva no controle de doenças de plantas. Muitos genes R transferidos por métodos naturais para algumas plantas já foram clonados a partir de numerosas espécies de plantas e podem, ainda, ser transferidos para outras espécies. Como exemplo temos o gene *Mi* de tomate para resistência contra *M. incognita*, *Hs1* da beterraba contra *H. schachtii*, *Gpa-2* de batata contra *Globodera pallida* e *Hero A* de tomate contra *Globodera rostochiensis* (Fuller, Lilley, & Urwin, 2008). Além disso, a superexpressão de diferentes inibidores da protease tais como inibidor de tripsina do feijão-Caupi (CpTI), PIN2 e cistatinas tem sido usada para a produção de plantas resistentes a nematoides (Lilley, Devlin, Urwin, & Atkinson, 1999). Outra estratégia importante é a supressão de importantes efetores de fitonematoides usando a abordagem do RNA interferente (RNAi) (Detalhes no capítulo 01 dessa obra). Recentemente, abordagens de edição do genoma como CRISPR-Cas9 estão sendo empregadas para explorar a função de genes de várias plantas e nematoides envolvidos em interações patogênicas. Várias técnicas de edição baseadas em CRISPR-Cas9 foram desenvolvidas em *Caenorhabditis elegans* (Zamanian & Andersen, 2016) abrindo novas portas para o estudo da biologia de fitonematoides. Essas tecnologias de edição podem ser úteis para entender a interação de proteínas efetoras de fitonematoides com proteínas R de plantas, auxiliar o silenciamento gênico, incrementar a produção de compostos tóxicos além de outras finalidades.

4.1 Inibidores de proteinase

Os inibidores de proteinase são moléculas, em sua maioria proteínas, que inibem a função das enzimas proteinases liberadas pelos patógenos. Após o ataque de herbívoros e ferimentos, uma variedade de inibidores de proteinase é produzida nas plantas. No caso de fitonematoides, esses inibidores tornam ativos contra as quatro classes de proteinases produzidas por nematoides: serina, cisteína, metalo e asparato proteinases. O potencial contra fitonematoides foi primeiramente descrito em batata transgênica expressando a *serina PI* contra o nematoide do cisto (*G. pallida*) (Hepher & Atkinson, 1996). Vários trabalhos mostram a importância e funcionalidade dos inibidores de proteinases contra fitonematoides por expressões obtidas por transgenia (Ali et al., 2017). Estudos com cistatinas de diferentes espécies de plantas vêm mostrando aumento da resistência a nematoides em uma variedade de plantas geneticamente transformadas por inibirem proteínas responsáveis pela formação de galhas nas raízes (Papolu et al., 2016; Tripathi et al., 2015). Além disso, a combinação de diferentes inibidores pode ser útil para obtenção de uma ampla gama de resistência. Isto demonstra que inibidores de proteinase são candidatos potenciais para indução de resistência a nematoides em uma variedade de plantas.

4.2 RNA interferente no silenciamento gênico

A tecnologia do RNA interferente (RNAi) surgiu como uma ferramenta útil para silenciamento de genes, visando a análise funcional de diferentes genes e suprimindo sua expressão. Nesta estratégia, os nematoides adquirem o RNA de fita dupla (dsRNA) ou RNAs de interferência curtos (siRNAs) das plantas hospedeiras, o que gera uma resposta sistêmica de inibição da tradução em células dos nematoides (Detalhes no capítulo 1 dessa obra). Desde a descoberta do RNAi em nematoides, o desenvolvimento de plantas que produzem dsRNA direcionados para o silenciamento da expressão de genes, relacionados com o parasitismo e ciclo de vida, tem sido proposto como uma estratégia sustentável ao manejo desses patógenos (Fire et al., 1998; Tan, Jones, & Fosu-Nyarko, 2013). Após o desenvolvimento da técnica de adição de neuroestimulantes em solução de dsRNA de Urwin, Lilley, e Atkinson (2002), o RNAi tem sido usado para avaliar os efeitos de silenciamento de mais de 30 genes de várias espécies como nematoides do cisto (*H. glycines*, *H. schachtii*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*), nematoides das galhas (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria* e *M. artiellia*), nematoides das lesões (*Pratylenchus zeae*, *P. thornei*, *P. coffeae*) e outros (Fosu-Nyarko & Jones, 2015). Apesar do método de imersão ser eficaz para a seleção inicial da função do gene e para a descoberta de genes-alvo para o RNAi fornecido pela planta visando controle do nematoide, hoje não é o principal método de estudo em RNAi.

Ao contrário do método de imersão em dsRNA, a entrega direta na planta hospedeira (*in planta*) fornece dsRNA continuamente, se expresso por um promotor

constitutivo da célula hospedeira. Este modo de inserção/entrega de dsRNA representa um método ideal e econômico para o controle de fitonematoides. Desde os primeiros trabalhos com a entrega do dsRNA *in planta*, várias cultivares foram projetadas para gerar as pequenas fitas de dsRNA visando silenciamento de genes em células da glândula esofagiana ou relacionados ao desenvolvimento e reprodução em nematoides. Vários trabalhos que mostram reduções significativas no número de fêmeas (81-93%) e ovos (68-95%) de *H. glycines* em raízes de soja transgênica com dsRNA de genes envolvidos na inibição da síntese de proteínas, indicam o potencial de RNAi como uma ferramenta importante para o controle de nematoides (Klink, Hosseini, Matsye, Alkharouf, & Matthews, 2009; Li, Todd, Lee, & Trick, 2011; J. Li, Todd, Oakley, Lee, & Trick, 2010). Outro exemplo é o uso do silenciamento da catepsina S, uma das proteinases de cisteína que desempenha um papel fundamental no parasitismo de fitonematoides. Plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana benthamiana*) expressando dsRNA do gene Rs-cps para silenciar formação de catepsina S foram resistentes ao nematoide *Radophilus similis* e o nível de transcrição de Rs-cps no nematoide foi significativamente reduzido (Li et al., 2017).

O uso do dsRNA para silenciamento é um dos métodos de genética funcional mais promissores para o controle de fitonematoides disponíveis hoje. No entanto, é importante considerar os fatores que influenciam a eficácia desta estratégia como a escolha do gene alvo. São escolhidos como alvos, genes de efetores essenciais para o parasitismo ou um gene cuja expressão seja vital para completar o ciclo de vida do nematoide. Outras considerações são o comprimento de dsRNA usado, a sequência específica escolhida e se existem caminhos para compensar a perda da função inibida. Em termos de aceitação, a sequência alvo escolhida deve ser preferencialmente única para o fitonematoide, ou pelo menos não estar presente em mamíferos, organismos benéficos e outros organismos. Quanto menor a sequência escolhida, menor a chance de ocorrer efeitos fora do alvo, e assim o uso de um miRNA (RNA de 20-24 bases) deve reduzir possíveis efeitos fora do alvo. Mesmo quando esses critérios de seleção são aplicados, a maioria dos experimentos com transgênicos apresentando a tecnologia do RNAi geram vários níveis de controle. Essa observação geralmente é relacionada a variabilidade nas populações de espécies de fitonematoides e não da eficácia de RNAi (Fosu-Nyarko & Jones, 2015).

5. Bioprospecção de novos compostos nematicidas

Vários nematicidas foram retirados do mercado devido ao efeito tóxico a seres humanos e organismos não alvo, deixando os produtores com poucas opções de compostos para aplicação no solo. Apesar de várias outras táticas de manejo mostrarem eficiência na redução populacional de fitonematoides, existe uma demanda por produtos com efeitos imediatos pelos produtores e pela indústria de insumos. Uma das formas para obtenção de novos compostos para o controle de fitonematoides é o uso de produtos naturais com efeitos nematicidas. Tanto plantas

quanto microrganismos produzem metabólitos com efeitos tóxicos a nematoides e podem ser aplicados diretamente no controle ou serem utilizados como fonte de novas moléculas.

Várias espécies de plantas produzem substâncias que são exsudadas no solo e podem atuar na redução de fitonematoides. Muitos compostos nematicidas foram identificados a partir de plantas (Chitwood, 2002), aumentando, assim, as justificativas para o uso de extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação no controle de fitonematoides. As brássicas são muito utilizadas na biofumigação do solo por produzir compostos sulfurados como os glucosinolatos. Os glucosinolatos são moléculas precursoras de vários compostos tóxicos a fitopatógenos, entre eles, isotiocianatos, tiocianatos e nitrilas. Os isotiocianatos têm sido mais estudados e já são explorados comercialmente com o nome de Basamid (Dazomet - Adapar) para o controle de fitonematoides. O dimetil dissulfeto (DMDS) é uma molécula volátil emitida por espécies de brássicas, como brócolis e rúcula. Por apresentar alto efeito nematicida o DMDS serviu como base para o desenvolvimento do produto nematicida Paladin (DMDS - Arkema) disponíveis em países como EUA e França (Aissani et al., 2015; Silva et al., 2018). Em sementes e folhas de nim (*Azadirachta indica*) são encontrados vários compostos tóxicos a fitopatógenos. Tortas e extratos de folhas de nim já mostraram efeitos tóxicos a nematoides das galhas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Javed et al., 2008; Javed, Gowen, Inam-ul-Haq, Abdullah, & Shahina, 2007). Vários grupos de plantas apresentam efeitos tóxicos pela emissão de compostos voláteis por extratos, óleos e resíduos incorporados (Barros et al., 2014; Estupiñan-López et al., 2017; Jardim, Oliveira, Silva, Campos, & de Souza, 2017; Silva et al., 2018-a). Esses voláteis podem ser facilmente avaliados quanto ao efeito nematicida por técnicas como uso de placa bipartidas e do tubo Supelco (Barros et al., 2015; Barros et al., 2014). Além disso, após constatado o efeito tóxico da emissão dos voláteis, o material pode ser levado para análise de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC/MS) para identificação dos compostos e, posterior, prospecção de compostos nematicidas purificados (Pedroso et al., 2018; Silva et al., 2018).

Assim como as plantas uma infinidade de microrganismos podem produzir compostos tóxicos a nematoides. Fungos como *Muscodor albus*, *F. oxysporum*, *Trichoderma* sp. produzem metabólitos tóxicos a nematoides em vários grupos químicos como alcoóis, terpenos e aldeídos (Silva, Barros, Terra, & Campos, 2018). O isolado de *F. oxysporum* 21 (F.o-21) emitiu voláteis tóxicos a *M. incognita* causando alta imobilidade e redução na infectividade do nematoide em tomateiro. As análises de cromatografia indicaram que as principais classes de compostos emitidos pelo fungo são sesquiterpenos, ésteres e alcoóis (Terra et al., 2017). Espécies bacterianas apresentam extraordinária capacidade de produzir compostos tóxicos a fitonematoides. Gu, Mo, Zhou, Zou, e Zhang (2007) obtiveram 200 isolados bacterianos a partir de solo cultivado com fumo. Dos 200 isolados, 82,5% emitiram voláteis tóxicos ao nematoide da murcha do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*. Os isolados de

Bacillus weihenstephanensis, *B. subtilis*, *B. simplex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens* foram as espécies bacterianas que produziram compostos com maior atividade nematicida. As técnicas para avaliação dos compostos produzidos por fungos e bactérias são semelhante às aquelas utilizadas para avaliação de plantas. Geralmente para verificação de compostos voláteis são usadas técnicas de placas multipartidas ou do tubo Supelco com adaptações (Terra et al., 2017). Além disso, o efeito de compostos não voláteis solúveis em água pode ser medido pela diluição em placa de crescimento do microrganismo, seguida da aplicação direta no nematoide.

Após a identificação dos compostos por técnicas de GC/MS ou cromatografia líquida, as moléculas análogas sintéticas devem ser obtidas na maior pureza possível para avaliação de soluções em diferentes concentrações do composto. Testes com várias concentrações mostraram que o etanol em solução aquosa apresentou alto efeito nematicida contra *M. incognita* em baixas concentrações, com viabilidade de aplicações em pequenas áreas e casa de vegetação a 40% em água (Silva, Campos, Freire, Terra, & Lopez, 2017). No entanto, as concentrações letais, suficientes para matar 50% ou 95% (CL_{50} , CL_{95}) da população são as mais utilizadas para representar o efeito nematicida. Por exemplo, o DMDS apresenta CL_{50} de 18 mg/L, o álcool 3-pentanol apresenta um CL_{50} de 918 mg/L e o nematicida Carbofuran CL_{50} de 191 mg/L (Silva et al., 2018). Assim o DMDS apresenta um alto potencial para uso no campo, mas o 3-pentanol dificilmente será viável para aplicação em grandes volumes. Isso mostra a importância da verificação da eficiência do composto tóxico em relação a compostos disponíveis no mercado para uma discriminação justa em termos econômicos.

6. Agentes de controle biológico e o microbioma antagonista a fitonematoides

A rizosfera é colonizada por um enorme número de microrganismos que podem atuar como antagonistas a vários patógenos (Mendes, Garbeva, & Raaijmakers, 2013). A composição microbiana é um dos principais fatores envolvidos na supressividade do solo contra patógenos de plantas. Solos supressivos são aqueles onde o patógeno é incapaz de causar doenças, mesmo quando o patógeno é introduzido no hospedeiro suscetível presente (Baker & Cook, 1974). A importância da microbiota na supressividade do solo contra fitonematoides pode ser demonstrada pela remoção da supressão por meio de esterilização do solo, onde ocorre a perda da atividade antagonista do microbioma (Figura 1).

Os solos supressivos costumam ter um equilíbrio nas condições do solo e dependem mais da diversidade da microbiota a longo prazo (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012). Estudos da dinâmica populacional em solo com sistema agrícola convencional e sistema agrícola integrado mostram um contraste muito surpreendente da biomassa de diferentes grupos tróficos. Assim, as bactérias dominam a biomassa, seguidos dos fungos e dos nematoides. Em solos com alta biodiversidade, epidemias de doenças de plantas são raras em comparação com solos manejados. Mendes

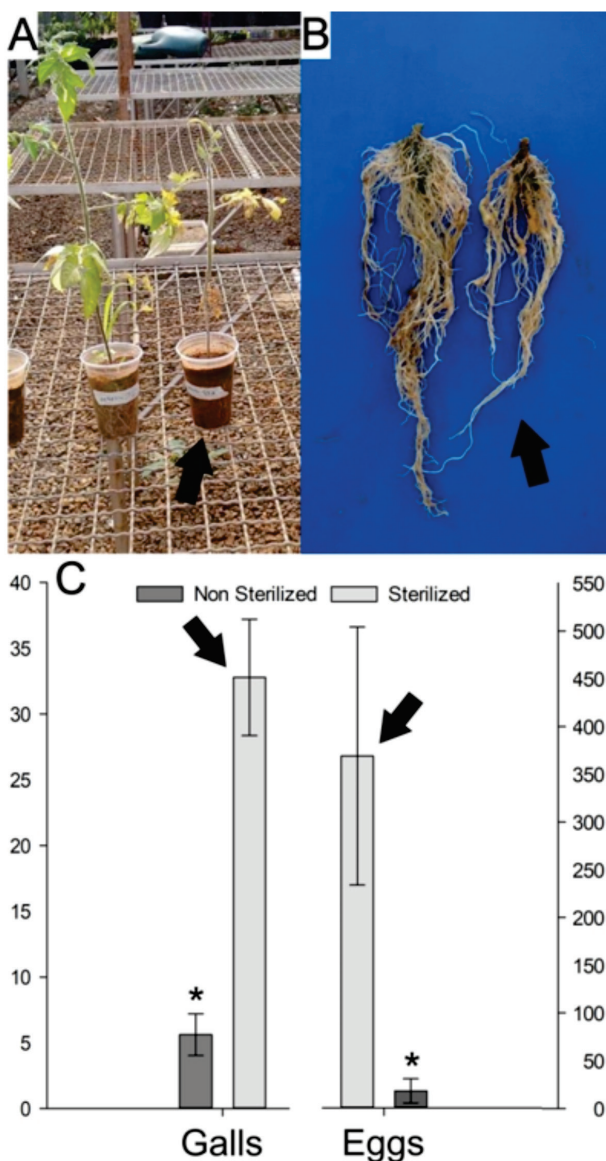


FIGURA 1. Esterilização do solo diminuindo a supressividade contra nematoides das galhas de tomateiro. A) No solo esterilizado o tomateiro teve menor crescimento. B) Menor sistema radicular em solo esterilizado. C) Mais galhas e ovos de *Meloidogyne incognita* no sistema radicular do solo esterilizado. Setas pretas apontam tratamentos com solo esterilizado em autoclave. Fonte: Silva, Medeiros, e Campos (2018).

et al. (2011) detectaram os principais grupos bacterianos e genes envolvidos na supressão a patógenos de solo. Mais de trinta mil espécies bacterianas e arqueias associadas à supressão de doenças de plantas foram relacionados a supressão de patógenos de solo. O conceito de recrutamento microbiano, combinando genótipos de plantas ideais com condições ideais do solo para manter um desenvolvimento benéfico da microbiota, requer mais estudos sobre a influência em fitonematoide. Além disso, novas tecnologias de melhoramento estão sendo desenvolvidas para permitir a transmissão da microbiota antagonica endofítica para a próxima geração da cultura (Wei & Jousset, 2017). A lista de antagonistas a fitonematoides inclui fungos, bactérias, vírus e outros nematoides, mas os microrganismos mais estudados são bactérias e fungos (Berg, 2009; Dong & Zhang, 2006; Mukhtar, Arshad Hussain, & Zameer Kayani, 2013).

O maior entendimento dos mecanismos e modos de aplicação de antagonistas é refletido no mercado de produtos biológicos. O aumento no interesse por produtores e empresas pela aplicação do controle biológico de doenças de plantas acompanha a melhor adequação da legislação para o registro de agentes biológicos em países como o Brasil. Atualmente, nove produtos microbiológicos são registrados e comercializados como bionematicidas para o controle de fitonematoides dos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Pratylenchus* no Brasil (Tabela 2) (Agrofit, 2018). Esses produtos podem ser utilizados para o tratamento de sementes ou aplicação no solo para todas as culturas de ocorrência dos nematoides, uma vez que o registro é realizado com base no patógeno alvo.

A comunidade bacteriana tem grande importância no manejo de fitonematoide, pois as bactérias atuam por múltiplos mecanismos contra patógenos vegetais, como a produção de toxinas e antibióticos, o parasitismo ou a ativação de mecanismos de defesa da planta por indução de resistência (Berg, 2009; Oostendorp, Dickson, & Mitchell, 1990). O microbioma da rizosfera de diferentes propriedades de batata mostrou diferenças nas comunidades bacterianas e no número de *Pratylenchus neglectus* e *Meloidogyne chitwoodi*. Fazendas com menor população das duas espécies apresentaram maior abundância dos gêneros bacterianos antagonistas *Bacillus* spp., *Arthrobacter* spp. e *Lysobacter* spp. Por outro lado, o solo com maior população de fitonematoides apresentou menor abundância desses gêneros bacterianos (Castillo, Vivanco, & Manter, 2017). Assim, entender a relação entre bactérias e nematoides ou mesmo com outros microrganismos poderia esclarecer muitos aspectos envolvidos na supressividade do solo e controle biológico. Por exemplo, uma abordagem para aumentar as chances de obter rizobactérias eficientes para o controle de fitonematoides é a busca dessas bactérias nos hospedeiros dos fitonematoides, os quais podem aumentar as chances de encontrar bons antagonistas em até 600% (Kloepper, Rodríguez-Kábana, McInroy, & Young, 1992). Em relação a rizobactérias, *Pseudomonas fluorescens* frequentemente isolada das raízes, especialmente durante períodos de alta exsudação apresenta alto potencial antagonista a fitonematoides (Stirling, 2014; Thiyagarajan & Kuppusamy, 2014).

TABELA 2. Bionematicidas registrados e comercializados no Brasil

Produto	Microrganismo	Patógeno alvo	Empresa
Nemat	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	Ballagro Agro Tecnologia Ltda.
Votivo Votivo Prime	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Pratylenchus brachyurus</i> , <i>Meloidogyne javanica</i>	Bayer S.A.
Rizos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Pratylenchus brachyurus</i>	Lallemand (Farroupilha S.A.)
Nemacontrol	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>	Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos
Rizotec	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>Meloidogyne javanica</i>	Rizoflora Biotecnologia S.A.
Quartzo	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus linheniformis</i>	<i>Meloidogyne</i> spp. <i>P.ratylenchus</i> spp.	FMC Química do Brasil Ltda.
Onix	<i>Bacillus methylophilicus</i>	<i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Pratylenchus brachyurus</i>	Lallemand (Farroupilha S.A.)
Clariva PN	<i>Pasteuria nishizawae</i>	<i>Heterodera glycines</i>	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

A inoculação de sementes é um meio muito útil para incorporar bactérias no solo e para induzir uma condição supressora específica. Sementes microbiolizadas com *Pseudomonas synxantha* e *P. fluorescens* reduziram o número de ovos e galhas de *M. graminicola* em raízes de arroz (Ludwig, Moura, & Gomes, 2013). O gênero *Pasteuria* spp. é muito eficaz contra fitonematoides devido à capacidade de sobrevivência de seus endósporos, sua resistência ao calor e dessecação, bem como, a possibilidade de usá-los junto com outras práticas de manejo. Esses parasitas de nematoides fixam seus endósporos nos corpos dos nematoides, infectam, esporulam e liberam os endósporos no solo (Preston et al., 2003). A *Pasteuria penetrans* é um parasita de nematoide das galhas que impede a reprodução do nematoide, reduzindo a produção de ovos (Mukhtar et al., 2013; Sayre & Starr, 1985). Recentemente, a *Pasteuria nishizawa* tem sido usada em formulações comerciais para controlar nematoides de cisto em plantações de soja (Tiyagi & Ajaz, 2004; Xiang, Lawrence, Kloepper, Donald, & McInroy, 2017). Muitas espécies do gênero *Bacillus* apresentam atividades

antagônicas contra fitonematoides, e por isso, são muito utilizadas como produtos biológicos (Tabela 2). Assim, diversos estudos utilizando uma combinação de diferentes isolados bacterianos foram desenvolvidos ao longo dos últimos anos (Ludwig et al., 2013). Os isolados de *B. subtilis* induziram resistência sistêmica contra *M. incognita* em tomateiro, demonstrada pelo uso do sistema de raízes divididas (*split-root*) onde as bactérias e os nematoides foram inoculados em raízes espacialmente separadas da mesma planta (Adam, Heuer, & Hallmann, 2014a). A eficácia de *B. thuringiensis* e sua capacidade de induzir resistência já foi demonstrada contra várias espécies de nematoides (Griffitts et al., 2005; Kloepper, Ryu, & Zhang, 2004; X. Q. Li, Wei, Tan, & Aroian, 2007). Tecnologias transgênicas sobre transferências de moléculas levam a manipulação de bactérias modificadas para o controle de nematoides. Peptídeos podem ser assimilados por nematoides de fontes exógenas e levados aos neurônios de células sensoriais. Os peptídeos podem ser acumulados dentro das células do anel nervoso central e provocar alterações na fisiologia dos nematoides. Bactérias transformadas para exsudação de neuropeptídeos como nematicidas atuam na infecção e alimentação dos nematoides. A secreção de neuropeptídios por isolados modificados de *B. subtilis* reduziu a infectividade de *M. incognita* em tomate e *G. pallida* em batata em até 90% quando comparados aos controles com bactérias não transformadas (Warnock et al., 2017).

Muitos grupos de fungos já foram estudados como antagonistas de fitonematoides de importância agrícola com cerca de 150 espécies já conhecidas (Silva, Medeiros, & Campos, 2018). Estes organismos têm a capacidade de capturar, matar e digerir o corpo do nematoide ou seus ovos. Existem vários mecanismos utilizados pelos fungos para atacar fitonematoides, geralmente divididos nos seguintes mecanismos: parasitas de ovos, predadores e produtores de toxinas (Figura 2). Fungos predadores e parasitas de ovos são os grupos mais relatados como agentes de biocontrole (Jatala, 1986; Lopes et al., 2007; Schouteden, De Waele, Panis, & Vos, 2015). O *Purpureocillium lilacinum*, pertencente ao grupo dos parasitas de ovos e cistos, é um fungo oportunista sem especificidade de hospedeiro produtor de cutinases. Estudos realizados em vários países mostraram a eficácia do fungo na redução de nematoides das galhas, nematoides do cisto e até mesmo nematoides de vida livre em uma variedade de culturas, aumentando o crescimento das plantas e reduzindo os danos (Ahmad & Khan, 2004; Kiewnick & Sikora, 2006). Outro parasita de ovos encontrado nos solos em todo o mundo é o fungo *Pochonia chlamydosporia*. O fungo é capaz de sobreviver no solo, longe das raízes, pois produz clamidósporos, o que o torna mais resistente a condições ambientais adversas comparado a outros organismos. Além do efeito indutor de resistência de fungos do gênero *Trichoderma*, sugere-se que o principal mecanismo de supressão de *T. harzianum* envolve o parasitismo de ovos, verificado pela redução da eclosão de ovos e o aumento da atividade da quitinase (Sahebani & Hadavi, 2008). Além dos parasitas de ovos, existem

fungos predadores de juvenis e adultos. Os principais gêneros predadores de nematoides são *Arthrobotrys* spp. e *Monacrosporium* spp., que utilizam estruturas ou anéis adesivos tridimensionais como armadilhas, infectando e colonizando o corpo do nematoide. Estudos já mostraram predação de *Meloidogyne* spp. por diferentes isolados de *Arthrobotrys* spp. e muitos destes colonizam mais de uma espécie (Oliveira, Ferraz, & Dias-Arieira, 2002). Atualmente, existem várias espécies conhecidas como fungos nematófagos que se alimentam de juvenis de fitonematoides. O fungo nematófago *Stropharia rugosoannulata* apresentou atividade mais rápida e eficiente contra nematoide das galhas que as espécies de *Arthrobotrys* (Zouhar et al., 2013). Muitos fungos podem produzir compostos tóxicos a fitonematoide. O fungo *Fusarium oxysporum* é considerado componente comum nas comunidades fúngicas da rizosfera e do solo. Alguns trabalhos já relataram alta taxa de imobilidade e/ou mortalidade de juvenis de *M. incognita* após a exposição aos voláteis emitidos por *F. oxysporum*. Além disso, a inoculação dos nematoides em plantas de tomateiro após a exposição aos voláteis resultou em menor número de galhas nas plantas (Freire et al., 2012; Terra et al., 2017).

Estudos sobre o microbioma influenciando na supressividade a fitonematoides vêm crescendo nos últimos anos mostrando a importância da microbiota geral comparada a microrganismos isoladamente (Elhady et al., 2017; Giné et al., 2013; Giné, Carrasquilla, Martínez-Alonso, Gaju, & Sorribas, 2016). O microbioma da rizosfera pode afetar a infecção e a reprodução dos fitonematoides reduzindo os danos às plantas. Por exemplo, o efeito de culturas em rotação ou sucessão no microbioma da rizosfera pode ser aproveitado para aumentar a resistência das culturas contra nematoides parasitas de plantas. A transferência do microbioma de cultivos diferentes para plantas de tomate inoculadas com *Pratylenchus penetrans* ou *M. incognita* mostrou que os microbiomas de rizosfera de milho e tomate reduziram a infecção dos nematoides em comparação com microbiomas da soja (Elhady, Adss, Hallmann, & Heuer, 2018). Geralmente, maior supressividade é alcançada com a maior diversidade da parte aérea devido a influência na comunidade microbiana (Garbeva, Van Veen, & Van Elsas, 2004). Dessa maneira, o entendimento sobre novas tecnologias para estimular ou induzir a supressividade a fitonematoides deve considerar o microbioma rizosférico como um sistema dentro do manejo do solo.

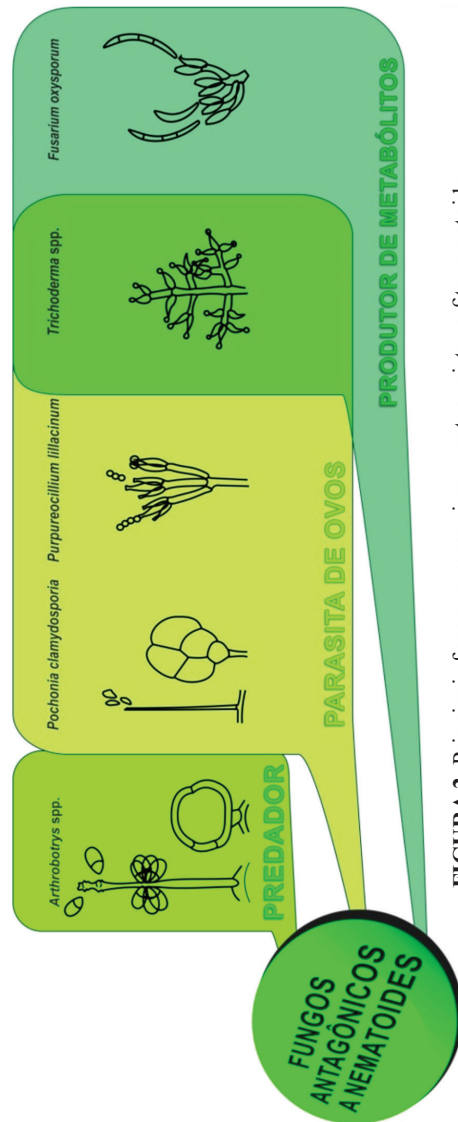


FIGURA 2. Principais fungos e mecanismos antagonistas a fitonematóides.

Referências

Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., . . . Blok, V. C. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8), 909.

- Abad, P., & McCarter, J. P. (2011). Genome analysis of plant parasitic nematodes *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (pp. 103-117): Springer.
- Adam, M., Heuer, H., & Hallmann, J. (2014a). Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PloS one*, 9(2), e90402.
- Agrofit. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 20 de outubro de 2018.
- Ahmad, S. F., & Khan, T. A. (2004). Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, by integration of *Paecilomyces lilacinus* with organic materials in Chilli. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 37(1), 35-40.
- Aissani, N., Urgeghe, P. P., Oplos, C., Saba, M., Tocco, G., Petretto, G. L., . . . Caboni, P. (2015). Nematicidal activity of the volatilome of *Eruca sativa* on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(27), 6120-6125.
- Ali, M. A., Azeem, F., Abbas, A., Joyia, F. A., Li, H., & Dababat, A. A. (2017). Transgenic strategies for enhancement of nematode resistance in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 750.
- Alkharouf, N. W., Klink, V. P., Chouikha, I. B., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Meyer, S., . . . Matthews, B. F. (2006). Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta*, 224(4), 838-852.
- Baker, K., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*: WH Freeman and Company.
- Barros, A., Campos, V., da Silva, J., Lopez, L., da Silva, A., Pozza, E., & Pedroso, L. (2015). Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 44(2), 190-199.
- Barros, A. F., Campos, V. P., da Silva, J. C. P., Pedroso, M. P., Medeiros, F. H. V., Pozza, E. A., & Reale, A. L. (2014). Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, 80, 34-43.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M.-N., Abad, P., Shih, P., & Briggs, S. P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS pathogens*, 4(10), e1000192.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8), 478-486.
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Castillo, J. D., Vivanco, J. M., & Manter, D. K. (2017). Bacterial microbiome and nematode occurrence in different potato agricultural soils. *Microbial Ecology*, 74(4), 888-900.
- Choe, A., von Reuss, S. H., Kogan, D., Gasser, R. B., Platzer, E. G., Schroeder, F. C., & Sternberg, P. W. (2012). Ascaroside signaling is widely conserved among nematodes. *Current Biology*, 22(9), 772-780.
- Davies, K. G., & Curtis, R. H. (2011). Cuticle surface coat of plant-parasitic nematodes. *Annual review of phytopathology*, 49, 135-156.

- Davis, E. L., Haegeman, A., & Kikuchi, T. (2011). Degradation of the plant cell wall by nematodes *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (pp. 255-272): Springer.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M.-N., & Abad, P. (2000). Nematode parasitism genes. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 365-396.
- De Medeiros, H. A., de Araújo Filho, J. V., De Freitas, L. G., Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific reports*, 7, 40216.
- Dong, L. Q., & Zhang, K. (2006). Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant and Soil*, 288(1-2), 31-45.
- Elhady, A., Adss, S., Hallmann, J., & Heuer, H. (2018). Rhizosphere Microbiomes Modulated by Pre-crops Assisted Plants in Defense Against Plant-Parasitic Nematodes. *Frontiers in microbiology*, 9.
- Elhady, A., Giné, A., Topalovic, O., Jacquiod, S., Sørensen, S. J., Sorribas, F. J., & Heuer, H. (2017). Microbiomes associated with infective stages of root-knot and lesion nematodes in soil. *PloS one*, 12(5), e0177145.
- Escobar, C., & Fenoll, C. (2015). Advances in botanical research Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd 24-28 Oval Road, London Nw1 7dx, England.
- Estupiñan-López, L., Campos, V. P., Silva, A. P., Barros, A. F., Pedroso, M. P., Silva, J. C., & Terra, W. C. (2017). Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. *Tropical Plant Pathology*, 1-8. doi:10.1007/s40858-017-0154-4
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806.
- Fosu-Nyarko, J., & Jones, M. G. (2015). Application of biotechnology for nematode control in crop plants *Advances in Botanical Research* (Vol. 73, pp. 339-376): Elsevier.
- Freire, E., Campos, V., Pinho, R., Oliveira, D., Faria, M., Pohlit, A., . . . Silva, J. (2012). Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology*, 44(4), 321.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2008). Nematode resistance. *New Phytologist*, 180(1), 27-44.
- Garbeva, P. v., Van Veen, J., & Van Elsas, J. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 243-270.
- Gheysen, G., & Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 191-219.
- Giné, A., Bonmatí, M., Sarro, A., Stchiegel, A., Valero, J., Ornat, C., . . . Sorribas, F. J. (2013). Natural occurrence of fungal egg parasites of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. in organic and integrated vegetable production systems in Spain. *BioControl*, 58(3), 407-416.
- Giné, A., Carrasquilla, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., & Sorribas, F. J. (2016). Characterization of soil suppressiveness to root-knot nematodes in organic horticulture in

plastic greenhouse. *Frontiers in Plant Science*, 7, 164.

Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., . . . Aroian, R. V. (2005). Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, 307(5711), 922-925.

Gu, Y.-Q., Mo, M.-H., Zhou, J.-P., Zou, C.-S., & Zhang, K.-Q. (2007). Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(10), 2567-2575.

Hepher, A., & Atkinson, H. J. (1996). Nematode control with proteinase inhibitors: Google Patents.

Hewezi, T., & Baum, T. J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 9-16.

Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martinez, M., Verschave, P., Wajnberg, E., & Castagnone-Sereno, P. (2005). Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology*, 54(2), 93-99.

Jardim, I. N., Oliveira, D. F., Silva, G. H., Campos, V. P., & de Souza, P. E. (2017). (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls in soybean plants. *Journal of Pest Science*, 1-9.

Jatala, P. (1986). Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 453-489.

Javed, N., Gowen, S., El-Hassan, S., Inam-ul-Haq, M., Shahina, F., & Pembroke, B. (2008). Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. *Crop Protection*, 27(1), 36-43.

Javed, N., Gowen, S., Inam-ul-Haq, M., Abdullah, K., & Shahina, F. (2007). Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. *Crop Protection*, 26(7), 911-916.

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., . . . Wesemael, W. M. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.

Kiewnick, S., & Sikora, R. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, 38(2), 179-187.

Klink, V. P., Hosseini, P., Matsye, P., Alkharouf, N. W., & Matthews, B. F. (2009). A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Molecular Biology*, 71(6), 525-567.

Kloepper, J. W., Rodríguez-Kábana, R., McInroy, J. A., & Young, R. W. (1992). Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil*, 139(1), 75-84.

Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.

Kyndt, T., Denil, S., Haegeman, A., Trooskens, G., Bauters, L., Van Crielinge, W., . . . Gheysen, G. (2012). Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *New Phytologist*, 196(3), 887-900.

- Li, J., Todd, T. C., Lee, J., & Trick, H. N. (2011). Biotechnological application of functional genomics towards plant-parasitic nematode control. *Plant Biotechnology Journal*, 9(9), 936-944.
- Li, J., Todd, T. C., Oakley, T. R., Lee, J., & Trick, H. N. (2010). Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. *Planta*, 232(3), 775-785.
- Li, X. Q., Wei, J. Z., Tan, A., & Aroian, R. V. (2007). Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Plant Biotechnology Journal*, 5(4), 455-464.
- Li, Y., Wang, K., Lu, Q., Du, J., Wang, Z., Wang, D., . . . Li, H. (2017). Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a hairpin RNAi construct of a nematode Rs-cps gene exhibit enhanced resistance to *Radopholus similis*. *Scientific Reports*, 7(1), 13126.
- Lilley, C., Devlin, P., Urwin, P., & Atkinson, H. (1999). Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasitology Today*, 15(10), 414-417.
- Lopes, E. A., Ferraz, S., Ferreira, P. A., Freitas, L. G., Dhingra, O. D., Gardiano, C. G., & Carvalho, S. L. (2007). Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 31(2), 78-84.
- Ludwig, J., Moura, A. B., & Gomes, C. B. (2013). Potential of microbiolization of rice seeds with rhizobacteria for root-knot nematode biocontrol. *Tropical Plant Pathology*, 38(3), 264-268.
- Manosalva, P., Manohar, M., Von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., . . . Kogel, K.-H. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communications*, 6, 7795.
- Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. (2017). Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, 213(3), 1363-1377.
- McCarter, J. P. (2008). Nematology: terra incognita no more. *Nature Biotechnology*, 26(8), 882.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663.
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., . . . Bakker, P. A. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X., Elling, A. A., Wubben, M., & Davis, E. L. (2013). Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*, 199(4), 879-894.
- Miyara, S. B., Ionit, I., Buki, P., & Kolomiets, M. (2015). The Role of lipid signalling in regulating plant-nematode interactions *Advances in Botanical Research* (Vol. 73, pp. 139-166): Elsevier.
- Mukhtar, T., Arshad Hussain, M., & Zameer Kayani, M. (2013). Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma*

harzianum against *Meloidogyne incognita* in okra. *Phytopathologia Mediterranea*, 66-76.

Oliveira, R. D., Ferraz, S., & Dias-Arieira, C. R. (2002). Eficácia de isolados de *Arthrobotrys* spp. no controle de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira*, 26, 49-57.

Oostendorp, M., Dickson, D., & Mitchell, D. (1990). Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. *Journal of Nematology*, 22(4), 525.

Papolu, P. K., Dutta, T. K., Tyagi, N., Urwin, P. E., Lilley, C. J., & Rao, U. (2016). Expression of a cystatin transgene in eggplant provides resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1122.

Pedroso, L. A., Campos, V. P., Pedroso, M. P., Barros, A. F., Freire, E. S., & Resende, F. M. (2018). Volatile organic compounds produced by castor bean cake incorporated into the soil exhibit toxic activity against *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science*.

Preston, J., Dickson, D., Maruniak, J., Nong, G., Brito, J., Schmidt, L., & Giblin-Davis, R. (2003). *Pasteuria* spp.: systematics and phylogeny of these bacterial parasites of phytopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 35(2), 198.

Puthoff, D. P., Nettleton, D., Rodermel, S. R., & Baum, T. J. (2003). Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *The Plant Journal*, 33(5), 911-921.

Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(8), 2016-2020.

Sayre, R. M., & Starr, M. P. (1985). *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 52(2), 149-165.

Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., & Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1280.

Silva, J. C., Campos, V. P., Freire, E. S., Terra, W. C., & Lopez, L. E. (2017). Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 19(3), 271-280.

Silva, J. C. P., Campos, V. P., Barros, A. F., Pedroso, M. P., Terra, W. C., Lopez, L. E., & De Souza, J. T. (2018). Plant Volatiles Reduce the Viability of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* Either Directly or When Retained in Water. *Plant Disease*, 102(11), 2170-2179.

Silva, J. C. P., Barros, A. F., Terra, W. C., & Campos, V. P. (2018). *Compostos orgânicos voláteis no controle de fitonematoides*. Lavras: Editora UFLA.

Silva, J. C. P. d., Medeiros, F. H. V. d., & Campos, V. P. (2018). Building soil suppressiveness against plant-parasitic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 28(5), 423-445.

Silva, J. C. P., Medeiros, F. H. V. d., & Campos, V. P. (2018). Building soil suppressiveness against plant-parasitic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 1-23.

Stirling, G. R. (2014). *Biological control of plant-parasitic nematodes: soil ecosystem management in sustainable agriculture*: CABI.

Tan, J.-A. C., Jones, M. G., & Fosu-Nyarko, J. (2013). Gene silencing in root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) significantly reduces reproduction in a plant host. *Experimental*

Parasitology, 133(2), 166-178.

Terra, W. C., Campos, V. P., Pedroso, M. P., da Costa, A. L., Freire, E. S., de Pinto, I. P., . . . Santos, T. C. N. (2017). Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*.

Thiyagarajan, S. S., & Kuppasamy, H. (2014). Biological control of root knot nematodes in chillies through *Pseudomonas fluorescens*'s antagonistic mechanism. *Plant Science*, 2, 152-158.

Tiyagi, S. A., & Ajaz, S. (2004). Biological control of plant parasitic nematodes associated with chickpea using oil cakes and *Paecilomyces lilacinus*. *Indian Journal of Nematology*, 34(1), 44-48.

Topalović, O., & Heuer, H. (2018). Plant-Nematode Interactions Assisted by Microbes in the Rhizosphere. *Current Issues In Molecular Biology*, 30, 75.

Tripathi, L., Babirye, A., Roderick, H., Tripathi, J. N., Changa, C., Urwin, P. E., . . . Atkinson, H. J. (2015). Field resistance of transgenic plantain to nematodes has potential for future African food security. *Scientific Reports*, 5, 8127.

Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 53-77.

Tytgat, T., De Meutter, J., Vanholme, B., Claeys, M., Verreijdt, L., Gheysen, G., & Coomans, A. (2002). Development and pharyngeal gland activities of *Heterodera schachtii* infecting *Arabidopsis thaliana* roots. *Nematology*, 4(8), 899-908.

Urwin, P. E., Lilley, C. J., & Atkinson, H. J. (2002). Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematodes leads to RNA interference. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(8), 747-752.

Warnock, N. D., Wilson, L., Patten, C., Fleming, C. C., Maule, A. G., & Dalzell, J. J. (2017). Nematode neuropeptides as transgenic nematocides. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006237.

Wei, Z., & Jousset, A. (2017). Plant breeding goes microbial. *Trends in Plant Science*, 22(7), 555-558.

Wyss, U., & Grundler, F. (1992). Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98(2), 165-173.

Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., & McInroy, J. A. (2017). Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. *PloS one*, 12(7), e0181201.

Zamanian, M., & Andersen, E. C. (2016). Prospects and challenges of CRISPR/Cas genome editing for the study and control of neglected vector-borne nematode diseases. *The FEBS journal*, 283(17), 3204-3221.

Zouhar, M., Douda, O., Nováková, J., Doudová, E., Mazáková, J., Wenzlová, J., . . . Renčo, M. (2013). First report about the trapping activity of *Stropharia rugosoannulata* acanthocytes for Northern Root Knot Nematode. *Helminthologia*, 50(2), 127-131.



Organizado pelo
Núcleo de Estudos em Fitopatologia
Universidade Federal de Lavras

XVIII Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas

BIOTECNOLOGIA APLICADA À FITOPATOLOGIA



RESUMOS

BACTERIOLOGIA

Efeito de produtos bactericidas no controle da mancha aureolada em folhas de cafeeiro	169
---	-----

BIOLOGIA MOLECULAR

Análise da via biossintética do antibiótico pirrolnitrina para a seleção de agentes de controle biológico	170
Mutation of repressive NAC transcription factors as lead to pathogen resistance	171
Caracterização molecular de isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. obtidos de frutos de banana com sintomas de antracnose	172
Assembly of wheat rhizosphere bacterial communities and tolerance against root rot caused by <i>Bipolaris sorokiniana</i>	173
Genes normalizadores de tangerina ponkan para avaliação de qpcr e tratamentos de controle de <i>Alternaria Alternata</i> patótipo tangerina	174

CLÍNICA E DIAGNOSE

Amostras fitopatológicas recebidas pela clínica de patologia florestal e microbiologia do solo – FCA/UNESP	176
--	-----

CONTROLE ALTERNATIVO

Fertilizantes foliares, indutor de resistência e fungicida no manejo da cercosporiose do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i> L.) nas cultivares Mundo Novo e Iapar 59	177
Controle alternativo no manejo de <i>Rotylenchulus</i> sp. em coentro	178
Relação entre produtividade de soja da Bahia e Análise química e enzimática de solo	179
Metabólitos de fungos endofíticos de guaranazeiro no controle de fitopatógenos tropicais	180

Fosfito no manejo de oídio da soja em casa de vegetação	181
Composição de óleos essenciais e mecanismos de ação em frutos de banana com antracnose	182
Efeito fungicida do óleo essencial de limão	184

CONTROLE BIOLÓGICO

Avaliação do manejo biológico do nematoide das lesões radiculares na cultura da soja	185
Competição por fonte de nitrogênio no controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro	187
Controle biológico do mofo branco por <i>Trichoderma</i> spp. isolados de solos da floresta amazônica	188
Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por <i>Bacillus</i> spp. CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> IN VITRO	189
Duravel (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MBI600) no controle de <i>Phyllosticta citricarpa</i> no cultivo de citros	190
Duravel (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MBI600) no controle de <i>Cryptosporiopsis perennans</i> em pré-colheita de maçã	191

CONTROLE QUÍMICO

Detecção molecular da resistência de isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina a estrobilurinas	192
Resistência de isolados de <i>Alternaria alternata</i> patótipo tangerina a piraclostrobina	193
Influência de fungicidas no desempenho de sementes de milho	194
The control of <i>Meloidogyne incognita</i> with the use of ethanol	195
Efeito do tratamento químico na emergência de plântulas de milho	196

Foliar fertilizer and nematicide in the management of <i>Heterodera glycines</i> in soybean	197
---	-----

EPIDEMIOLOGIA

Progressão da ferrugem do cafeeiro nos campos expemimentais da Epamig no sul de Minas Gerais no ano de 2017	198
---	-----

Influência de diferentes tipos de arborização na ocorrência da ferrugem do cafeeiro	199
---	-----

MICOLOGIA

Microconídios produzidos por <i>Pyricularia graminis-tritici</i>	200
--	-----

Avaliação do uso de cepas (<i>Saccharomyces cerevisae</i>) na promoção de crescimento em feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) e soja (<i>Glycine max</i>).....	201
--	-----

Área: Bacteriologia

Efeito de produtos bactericidas no controle da mancha aureolada em folhas de cafeeiro

Vitória Moreno Tedardi¹, Ricardo Magela de Souza², Eduardo Alves³

¹ bolsista PIBIC/CAPES/UFLA; ² Professor Orientador Depto de Fitopatologia/UFLA; ³ Professor Depto de Fitopatologia/UFLA

A cafeicultura enfrenta grandes desafios para aumentar a produção de forma sustentável e obter produtos de alta qualidade, com destaque para as doenças. No Brasil, nos últimos anos, a mancha aureolada causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* tem causado grandes perdas e, até o momento, poucos são os estudos dessa bactéria em folhas de cafeeiro. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito de bactericidas aplicados preventivamente em folhas de cafeeiro sobre a população de *P. syringae* pv. *garcae*, utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Para isso, mudas de cafeeiro ‘Topázio MG 1190’ foram pulverizadas com os produtos a base de hidróxido de cobre (Kocide) e casugamicina (Kasumin), na concentração 0,01mM com duas horas de antecedência da inoculação da suspensão bacteriana por atomização. O delineamento realizado foi o de blocos casualizados (DBC), com três tratamentos e sete repetições, sendo um dos tratamentos a testemunha, inoculada apenas com suspensão bacteriana. As amostras foram coletadas 24 horas após a inoculação e preparadas para MEV, utilizando o protocolo padrão para microscopia eletrônica de varredura. De acordo com as imagens obtidas pelo MEV, houve redução do progresso da multiplicação bacteriana quando as mudas foram tratadas com hidróxido de cobre e casugamicina, em relação às testemunhas não pulverizadas com os produtos. No tratamento com hidróxido de cobre pode-se observar um maior crescimento de colônias bacterianas comparadas às que foram tratadas com casugamicina, nas mesmas concentrações. Portanto, a casugamicina apresentou maior efeito no controle das bactérias em relação ao hidróxido de cobre. O uso do MEV permitiu a visualização das colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em folhas de café e auxiliou a observação da sensibilidade das bactérias aos diferentes produtos aplicados preventivamente para o controle.

Palavras-chave: microscopia eletrônica de varredura (MEV), kasumin, casugamicina.

Apoio: CNPq, CAPES, FAPEMIG, LME/UFLA

Área: Biologia Molecular

Análise da via biossintética do antibiótico pirrolnitrina para a seleção de agentes de controle biológico

Yasmim Freitas Figueiredo¹; Phellippe Arthur Santos Marbach²; Jorge Teodoro de Souza¹

¹Laboratório de Fitopatologia Molecular, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal 3037, Lavras 37200-000, MG, Brasil; ²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, Brasil. E-mail: yasmim_f@hotmail.com

A pirrolnitrina (Prn) é um metabólito secundário derivado da via biossintética do aminoácido triptofano. É produzido por bactérias e possui ação antagonista contra fungos, bactérias e nematoides. Atua na respiração inibindo a cadeia de transporte de elétrons. A síntese da Prn está relacionada com a presença do operon *prnABCD*. As bactérias que possuem esses genes pertencem ao Filo Proteobacteria. As bactérias produtoras de Prn geralmente são utilizadas no controle biológico de patógenos de plantas e humanos. Análogos da pirrolnitrina estão presentes em formulações de produtos para o tratamento de micoses e em fungicidas agrícolas. O enriquecimento dos genes de bactérias produtoras de Prn podem alterar o metabolismo microbiano e auxiliar na bioprospecção de novas moléculas antimicrobianas. Nesse projeto, pretende-se realizar análises genômicas dos procariotos produtores de Prn; fornecer novas informações sobre a origem e evolução da via biossintética de pirrolnitrina; e desenvolver sondas para o isolamento de agentes de controle biológico. Serão recuperadas apenas sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas PrnA, PrnB, PrnC e PrnD e seus homólogos nos bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de genomas completamente sequenciados e anotados. A bactéria de referência (*query*) utilizada será o isolado de referência na produção de Prn o Pf-5 de *Pseudomonas protegens*, que possui todos os quatro genes da via biossintética. A genômica comparativa de proteínas homólogas será realizada entre a *query* de cada proteína individualmente, comparando com cada procarioto. Após a recuperação de sequências, será realizada uma análise da distribuição dos genes em genomas procarióticos. Esse é o primeiro estudo da distribuição dos genes que codificam a síntese da pirrolnitrina em genomas de procariotos completamente sequenciados. Espera-se esclarecer a evolução da via biossintética da pirrolnitrina e a produção de Prn por outros microrganismos além dos presentes no filo de Proteobacteria. A análise das sequências permitirá a construção de primers específicos e sondas para o isolamento de organismos produtores de pirrolnitrina.

Palavras-chave: Genômica comparativa, Prn, Bioinformática

Apoio: CAPES

Área: Biologia Molecular

Mutation of repressive NAC transcription factors as lead to pathogen resistance

Marciel Pereira Mendes, Richard Hickman, Corné M.J. Pieterse, Saskia C.M. Van Wees
Plant-Microbe Interactions, Department of Biology, Utrecht University, P.O. Box 800.56, 3508 TB, Utrecht, the Netherlands

To protect themselves from infection by pathogens, plants need to activate their hormone-dependent immune system. Salicylic acid (SA) is a critical hormonal regulator of defense. To advance our understanding of the architecture and dynamic regulation of the SA gene regulatory network, we performed a high-density time course RNA-Seq experiment (14 time points), upon treatment with exogenous salicylic acid (SA). We identified two highly homologous NAC transcription factors (TFs) from *Arabidopsis*, *ANAC4* and *ANACB*, that co-expressed in the RNA-seq and act as negative regulators of defense. The double mutant *anac4 anacB* displayed enhanced resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Hpa*) and the hemi-biotrophic pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (*Pto*), to a level that was comparable (*Hpa*) or even higher (*Pto*) than that of *dmr6*, a mutant that was previously shown to contain increased SA levels. Interestingly, compared to the *dmr6* mutant, the *anac* double mutant was less severely compromised in plant growth. Altogether, this shows the great potential of these specific NACs for breeding of biotroph-resistant crops. Collectively, our work pinpoints and validates new ANACs TFs in plant immunity, and provides a valuable resource for functional studies on SA signaling components in plant defense and development.

Key words: Hormonal regulator, Salicylic acid, Biotrophic pathogens.

Área: Biologia Molecular

Caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de frutos de banana com sintomas de antracnose

Maria Gilmara Oliveira Soares¹, Amanda Letícia da Silveira², Fernanda Dias Pereira³, Eduardo Alves⁴, Lucas Silveira Lopes⁵

¹Depto de Fitopatologia/UFLA, ²Depto de Fitopatologia/UFLA, ³Depto Fitossanidade/UNESP,

⁴Professor Orientador Depto de Fitopatologia/UFLA, ⁵Depto de Fitopatologia/UFLA

Espécies de *Colletotrichum* causam antracnose na cultura da bananeira afetando principalmente os frutos tanto no campo quanto no período pós-colheita, depreciando seu valor comercial. O objetivo do presente estudo foi verificar a diversidade genética de isolados de *Colletotrichum* associados a frutos de bananas sintomáticos. Foram utilizados 30 isolados oriundos dos estados BA, GO, MG, SP, SC e RN. A divergência genética dos isolados foi acessada por meio do marcador molecular ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) utilizando cinco *primers*. Cada *primer* foi utilizado na amplificação das regiões ISSR, via PCR. Os *primers* ISSR proporcionaram a obtenção de 34 bandas polimórficas que variavam de 500 a 3000 pb aproximadamente. Com base nos padrões de banda gerados, foi construído um dendrograma no qual pode-se observar a formação de 2 grupos e 2 diferentes haplótipos. O grupo 1 foi formado por 25 isolados oriundos de diferentes estados, seguido pelo grupo 2 com 3 isolados e os dois haplótipos oriundos de MG. Estes resultados dão indícios de que pelo menos 4 espécies de *Colletotrichum* estão associadas a antracnose em frutos de banana. Os *primers* de ISSR utilizados foram eficientes no acesso da diversidade genética de *Colletotrichum*, entretanto, filogenia molecular, utilizando regiões *barcode*, deve ser utilizada para a correta identificação das espécies.

Palavras-chave: *Musa* spp., Diversidade, ISSR.

Apoio: Capes

Área: Molecular Biology

Rhizosphere bacterial communities as a strategy in wheat protection against root rot caused by *Bipolaris sorokiniana*

Mírian Rabelo Faria^{1,2*}; Lilian Simara Abreu Soares Costa¹; Josiane Barros Chiaramonte^{1,3}; Maike Rossmann¹; Wagner Bettiol¹; Rodrigo Mendes¹

¹Embrapa Meio Ambiente (Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP);

²UNESP/FCA “Júlio de Mesquita Filho” (Fazenda Lageado Portaria I: Rua José Barbosa de Barros, nº 1780, 18.610-307 - Botucatu, SP); ³Esalq- USP (Avenida Pádua Dias s/n – Piracicaba, SP).

The sustainable agriculture requires the use of advanced and modern technologies with the capacity to increase productivity to feed a world growing population demand. In this context, plant breeding associated with the studies of the rhizosphere microbiome may be an innovative strategy in plant protection against soil-borne pathogens. However, few studies investigate the structure and biodiversity of microbial communities in ancestral genotypes and recent cultivars associated with the plant defense process. Thereby, considering the impact of domestication and plant breeding on interactions in the plant rhizosphere microbiome, in this study, we compared the tolerance level of ancestral and recent wheat genotypes to *Bipolaris sorokiniana* and its correlation with the recruitment of bacteria in the rhizosphere. We evaluated the variation in susceptibility of eight wheat genotypes by inoculating the soilborne pathogen in the soil six days after sowing. The level of disease was assessed four weeks after inoculation. The two most contrasting genotypes, considering resistance against the soil pathogen, were selected for correlation analyzes with the structure of microbial communities in the rhizosphere. IAC 5 Maringá was found as the most resistant genotype to the pathogen and enrichment of Acidobacteria, Chloroflexi, Rhizobiaceae, and Cyanobacteria when compared with Guamirim, the susceptible genotype. In conclusion, the results suggest that the level of disease resistance correlates with the recruitment of specific bacterial groups in the rhizosphere of these genotypes. This observation suggests that genetic plant traits can be associated with the recruitment of specific members of the rhizosphere microbiome, paving the way to breed plants to recruit beneficial microbes to protect the root system.

Key words: Plant domestication, plant - microbe interaction, plant protection.

Support: Capes, CNPq, Fapesp, Embrapa

Área: Biologia Molecular

Genes normalizadores de tangerina ponkan para avaliação de qpcr e tratamentos de controle de *Alternaria Alternata* patótipo tangerina

Silvino Intra Moreira¹, Carlos Henrique Cardon², Mateus Eduardo Nery³, Amanda Letícia Silveira³, Antonio Chalfun Junior⁴, Eduardo Alves⁵

¹Bolsista de Pós-Doutorado PNPD/CAPES do Depto de Fitopatologia/UFLA; ²Doutorando do PPG Biotecnologia Vegetal/UFLA; ³Depto de Fitopatologia/UFLA; ⁴Professor do Depto de Biologia/UFLA; ⁵Professor Supervisor Depto de Fitopatologia/UFLA

Mancha-marrom-de-alternária é uma das principais doenças da tangerina e seus híbridos. Métodos de avaliação de respostas de defesa vegetal são necessários para compreender a interação planta-patógeno e o modo de ação de tratamentos de controle. Neste trabalho avaliou-se a estabilidade da expressão relativa de genes normalizadores por meio de RT-qPCR em folíolos de tangerina Ponkan (*Citrus reticulata*). Os tratamentos, com 3 repetições biológicas cada, foram: T1- Óleo essencial de canela 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T2- Trans-cinamaldeído 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T3- Acibenzolar-s-metil 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T4- Trifloxistrobina 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + Tebuconazole 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T5- Oxicloreto de cobre 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; T6- Suspensão de 10^5 conídios.mL⁻¹ de *A. alternata* patótipo tangerina CML 3245; T7- água destilada. Mudas enxertadas em limão-cravo a 25 °C, 90% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h foram pulverizadas. Amostras foram coletadas 12, 24 e 46 h após tratadas, e armazenadas em -80 °C; a extração de RNA, feita com o método Trizol®, com posterior checagem de integridade e pureza por meio de eletroforese em gel de agarose e análises de absorbância em NanoVue®; a purificação, feita com kit *DNA Free* (Ambion®), e reação de transcrição reversa com kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo-Fischer®). A eficiência dos primers foi determinada através de curva de diluição do pool das amostras (1:5; 1:25; 1:125; 1:625; e 1:1325) e foram testados os genes NADP-isocitrato desidrogenase (EG), Proteína família FBox (FB) e Gliceraldeído-3-P (GA). Foi utilizado o termociclador *Rotor-Gene Q 5 PLEX HRM Real-Time PCR* (Qiagen®) com sistema de detecção *SyBR® Green*. O volume final da reação para cada amostra foi de 15 μL : 7,5 μL *SyBR Green* (*QuantiFast SyBR Green PCR Kit* Qiagen®); 3 μL primers específicos para cada gene a 10 μM ; 1,5 μL cDNA; e 3 μL água *RNase free*. Avaliou-se as correlações e eficiências entre os valores de *Ct* de EG, FB e GA e as concentrações de cDNA utilizadas, com *threshold* 0,03. Os valores de *R*² (0,99) e de eficiência (próximos a 1,0) gerados pelo programa *Rotor-Gene Series Pure Detection* foram considerados satisfatórios. Para testar a estabilidade de EG, FB e GA, outro ensaio foi feito com cDNAs (1:5) de T3, T6 e T7 para o tempo de 24 h, com análise

feita pela ferramenta *RefFinder*. Concluiu-se que os genes normalizadores mais estáveis para utilizar em experimentos de expressão gênica de folíolos de tangerina são EG e FB.

Palavras-chave: Mancha-marrom-de-alternária; PCR em tempo real; Expressão gênica.

Apoio: CAPES, FAPEMIG, CNPq.

Área: Clínica e Diagnose

Amostras fitopatológicas recebidas pela clínica de patologia florestal e microbiologia do solo – FCA/UNESP

Lisandro de Proença Pieroni¹; Lucas A. Benso¹; Sara Y. S. Kurokawa¹; Anny Mery Marcon Ruiz¹; Cristiane de Pieri¹; Edson Luiz Furtado^{1*}

¹Departamento de Proteção Vegetal – FCA/UNESP. *Pesquisador CNPq

O Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA/UNESP, em Botucatu – SP, há mais de vinte anos atende produtores e empresas de todo Brasil, atuando na identificação de agentes causais de doenças nas principais espécies florestais do país. O atendimento é através do envio de material direto dos produtores, com amostras de fragmentos de plantas (fruto, folhas, caule, raiz), solo, substrato e água, em condições de viveiro ou campo. O Laboratório conta com estrutura de casas de vegetação e câmara com ambiente controlado para testes de resistência clonal, equipamentos para análise molecular de patógenos florestais e avaliação de novas moléculas químicas e bioprodutos. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento dos diagnósticos realizados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo – FCA/UNESP, no período de 2015 a 2017, bem como estimar a sintomatologia e a incidência de microrganismos nestas amostras. Neste período foram recebidas 1036 amostras distribuídas em 35 hospedeiros. Entre os hospedeiros, destaca-se o gênero *Eucalyptus* spp. com 69,4% das ocorrências, seguido de *Citrus* spp. (8,7%), *Khaya ivorensis* (2,8%) e *Pinus* spp. (1,64%). As bactérias com 37% e os fungos com 33,5%, foram os agentes causais encontrados com maior frequência. A bactéria de maior ocorrência foi do gênero *Ralstonia* sp., associada a 91,6% das amostras, seguida pelos gêneros *Xanthomonas* sp. (3,8%) e *Pseudomonas* sp. (0,7%). Entre os agentes fúngicos, destacou-se o gênero *Pestalotiopsis* sp., associado a 27,5% das amostras, seguido dos gêneros *Dothiorella* sp. (18,6%), *Cylindrocladium* sp. (15%), *Fusarium* sp. (10%), *Colletotrichum* sp. (5%), *Lasiodiplodia* sp. (4%) e *Ceratocystis* sp. (3,4%). As murchas fúngicas e bacterianas foram os sintomas de maior frequência, encontrados em 42,3% das amostras recebidas, seguido de sintomas no caule e tronco (13%) e foliares (11,7%). Do total de amostras sobressaíram-se as de plantas (86,5%), seguido de solo e substrato (10,9%) e água (2,6%).

Palavras-chave: Diagnose, Clínica Fitossanitária, Incidência.

Apoio: CAPES

Área: Controle Alternativo

Fertilizantes foliares, indutor de resistência e fungicida no manejo da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) nas cultivares Mundo Novo e Iapar 59

Camila Aparecida Carvalho¹; Paulo Estevão de Souza²; Mário Lúcio Vilela de Resende³; Edson Ampélio Pozza³; André Augusto Ferreira Balieiro⁴; Deila Magna dos Santos Botelho⁵

¹Mestranda DFP/UFLA; ²Professor orientador DFP/UFLA; ³Professor DFP/UFLA;

⁴Graduando em agronomia UFLA; ⁵Pós-doutoranda DFP/UFLA

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma das espécies agrônomicas mais relevantes para a economia do Brasil. Entretanto, a presença de pragas e doenças é fator limitante à produção de café. Dentre as doenças do cafeeiro, destaca-se a cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk & Cooke). O controle dessa doença é realizado principalmente por meio de fungicidas, e quando utilizados indiscriminadamente, podem causar danos ao ambiente e aos produtores. Diante disso, objetivou-se avaliar fertilizantes foliares e indutor de resistência, comparados ao fungicida, no manejo da cercosporiose em mudas de cafeeiro, nas cultivares Mundo Novo e Iapar 59. Para isso, foram realizados testes *in vivo* em casa de vegetação, com os seguintes tratamentos: fungicida epoxiconazol+piraclostrobina (0,5 mL L⁻¹), fertilizante foliar à base de óxido cuproso (3,0 mL L⁻¹; 2,5 mL L⁻¹), fosfito de cobre (1,5 mL L⁻¹), acybenzolar-S-metil (0,2 g L⁻¹), fosfito de potássio (5,0 mL L⁻¹; 2,5 mL L⁻¹), fertilizante foliar à base de cobre, cálcio e subprodutos da indústria cafeeira (5,0 mL L⁻¹) e testemunha. As mudas avaliadas foram inoculadas sete dias após a aplicação dos produtos com suspensão de conídios de *C. coffeicola*, ajustada para a concentração de 3 x 10⁵ conídios mL⁻¹. As avaliações da severidade da cercosporiose foram realizadas semanalmente, totalizando cinco avaliações. Posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A cultivar Iapar 59 teve a maior suscetibilidade à doença, com AACPD de 138,4 comparada a cultivar Mundo Novo com 82,4. Para o tratamento fosfito de potássio (5,0 mL L⁻¹) foi observado controle da cercosporiose nas cultivares Iapar 59 e Mundo Novo de 96% e 94%, respectivamente, não diferindo do fungicida. Os demais produtos testados tiveram controle intermediário da cercosporiose em mudas de cafeeiro, com menor severidade em relação à testemunha.

Palavras-chave: *Cercospora coffeicola*; Controle alternativo.

Apoio: Cnpq, FAPEMIG, INCT Café

Área: Controle Alternativo

Controle alternativo no manejo de *Rotylenchulus* sp. em coentro

David Ferreira Duarte¹, Guilherme Silva de Podestá²

¹Mestrando em Fitopatologia/UFLA; ²Professor orientador, Depart. de Fitotecnia e Ciências Ambientais/UFPA

O coentro é uma hortaliça bastante utilizada em diversas regiões do Brasil, em especial nas Regiões Norte e Nordeste. É uma hortaliça folhosa que se destaca por ser rica em vitaminas e de fonte de cálcio e ferro. A presença de nematoides em áreas de produção tem causado elevados danos, gerando grandes perdas econômicas e consequentemente redução na produtividade. O presente trabalho teve como objetivo determinar a eficiência dos extratos aquosos de *Tagetes erecta* (cravo-de-defunto), *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca* e *Mucuna pruriens* no controle do nematoide fitoparasita, *Rotylenchulus* sp. na cultura do coentro. No experimento, foi usado solo naturalmente infestado com o nematoide, onde cada vaso com capacidade de 3L apresentou uma quantidade de aproximadamente 23.430 nematoides. Nestes vasos plantaram-se sementes de coentro cv “Tabocas”. Para produção dos extratos vegetais usou-se um grama do material para 10 mL de água destilada utilizando-se, folhas de cravo-de-defunto, sementes de crotalaria e mucuna. A cada 15 dias, 10 mL do extrato vegetal, ou água (controles positivo e negativo, respectivamente) foram aplicados diretamente no solo, até o momento da colheita. Decorridos 45 dias da germinação, avaliou-se população de *Rotylenchulus* sp. no solo infestado. Observou-se redução no nível populacional do nematoide na ordem de 50,98, 53,45% e 71,91% para os extratos de mucuna, *C. ochroleuca* e *C. spectabilis*, respectivamente. O tratamento com cravo – de – defunto, não foi avaliado, pois todas as plantas morreram. A aplicação de extratos aquosos das espécies *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria ochroleuca* e *Mucuna pruriens* são eficientes no manejo de *Rotylenchulus* sp. em coentro, reduzindo sua população no solo. Desta forma os extratos aquosos podem ser utilizados como alternativa sustentável por produtores rurais em substituição aos nematicidas químicos.

Palavras-chave: Agricultura familiar, *Coriandrum sativum*, nematoide reniforme

Área: Controle Alternativo

Relação entre produtividade de soja da Bahia e Análise química e enzimática de solo

Elke Simoni Dias Vilela¹*; Evandro Henrique Figueiredo Moura da Silva; Michelli de Souza dos Santos; André May¹.

¹Embrapa Meio Ambiente (Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP).
E-mail: elke.vilela@embrapa.com.br

O município de São Desidério é um dos nove produtores de soja da Região Oeste da Bahia, tendo apresentado na safra mar/abr de 2018 uma produção de 6 milhões de t de grãos. A região realiza plantio direto de soja, o qual é conhecido pela manutenção da qualidade do solo gerando benefícios sobre a população microbiana do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar um solo com diferentes expressões de produtividade de soja em comparação com uma Mata Nativa (MN), frente às características químicas e enzimáticas. A amostragem foi feita em talhões com histórico distinto de produtividade, sendo Alta (A), com 4,9 t/ha, Média Alta (MA) com 3,5 t/ha e Baixa (B) com 2,2 t/ha. Os resultados mostraram que houve um estímulo de microrganismos produtores de arilsulfatase nas amostras da Mata. Ao comparar as características químicas e enzimáticas sobre a produtividade por meio da análise de componentes principais (PCA), bem como pela análise de Variância entre as áreas de plantio, observa-se que os atributos que mais influenciaram nas áreas de alta produtividade (A), correlação de 54%, foram Cálcio, Magnésio, Soma de Base (SB), Capacidade de Troca de Cátions (CTC), Saturação por Base (V%), Urease e Arilsulfatase. O maior rendimento na área de Alta produtividade pode ter sido influenciado pelos restos de resíduos vegetais incorporados no solo, que ativa microrganismos já presentes naquela área, produtores de Urease, disponibilizando o N-orgânico para as plantas. Quanto à atividade enzimática de arilsulfatase, observa-se que há uma relação direta de produtividade e dosagem da mesma ($A > MA > B$), ou seja, em áreas com maior produtividade existe uma maior população de microrganismos que disponibilizam compostos orgânicos de enxofre para a planta. Assim, deduz que nas áreas de alta produtividade de soja ocorreu uma maior população de microrganismos produtores de arilsulfatase. Ao avaliar os componentes principais, verifica-se a existência de uma correlação positiva entre a produtividade, algumas características químicas do solo, urease e a arilsulfatase.

Palavras-chave: produtividade, química, enzimas, PCA

Área: Controle Alternativo

Metabólitos de fungos endofíticos de guaranazeiro no controle de fitopatógenos tropicais

Jania Lília da Silva Bentes¹ Alex-Sandra Farias de Almeida²; Raquel Brandão Campelo³

¹Professora Orientadora, Faculdade de Ciências Agrárias-UFAM; ²bolsista PósGraduação PGATR/Capes/UFAM; ³bolsista PIBIC/UFAM

A busca por novos métodos e produtos para o controle de doenças de plantas, tem sido um esforço constante de pesquisadores, visando alternativas de manejo fitossanitário compatíveis com a qualidade ambiental. Este trabalho teve o objetivo avaliar *in vitro* o efeito de extratos metabólicos 39 de fungos endofíticos isolados de sementes de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum guaranicola*, *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* spp. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método de difusão em meio sólido, pela técnica de *pour plate*. Foi utilizado 1 mL da suspensão de inóculo de cada fitopatógeno na concentração 10^5 conídios.mL⁻¹, adicionado ao meio de cultura BDA e vertido em placas de Petri (150 x 15 mm). Após solidificação do meio de cultura, foram feitas dez cavidades de 0,5 cm de diâmetro, nas quais foram depositados 100 µL de extrato metabólico fúngico, obtido após o cultivo em BD durante 10 dias, sob agitação constante. As placas foram mantidas em temperatura ambiente (± 26 °C), durante 48 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 repetições. A testemunha constou de uma cavidade contendo água destilada esterilizada em cada placa. A avaliação feita pela tomada da medida do halo de inibição formado em torno das cavidades no meio de cultura. Os extratos metabólicos de *Fusarium* e *Paecilomyces* apresentaram halo de inibição aos três fitopatógenos testados, enquanto os extratos fúngicos dos gêneros *Pestalotiopsis*, *Gliocladium*, *Phytophthora* e *Talaromyces* apresentaram formação de halos de inibição apenas para o isolado de *Colletotrichum* spp. Estes resultados sugerem o potencial destes isolados como produtores de substâncias inibidoras do crescimento de fitopatógenos.

Palavras-chave: Controle alternativo; Extratos fúngicos; Inibição de crescimento.

Apoio: CAPES

Área: Controle Alternativo

Fosfito no manejo de oídio da soja em casa de vegetação

Maria Eduarda Rodrigues Andrade¹; Mário Lúcio Vilela de Resende²; Bruno Henrique Garcia Costa³; Bruno Marques da Silva³; Matheus Henrique de Brito Pereira⁴; Fábio de Oliveira Santos⁴

¹Bolsista PIBIC/UFLA; ²Professor Orientador Depto de Fitopatologia/UFLA; ³Depto Fitopatologia/UFLA; ⁴Bolsista PIBIC/CNPQ

O oídio da soja (*Glycine max*) causado por *Microsphaera diffusa* Cooke & Peck, embora considerado de pouca importância há alguns anos, ultimamente vem aumentando sua ocorrência. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o uso de fosfito de potássio (KH₂PO₃) no manejo do oídio da soja (*Microsphaera diffusa*). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Sementes de soja cultivar BMX Potência RR foram semeadas em vasos com capacidade para seis litros contendo terra, areia e substrato (3:1: 1). O delineamento experimental utilizado foi com quatro repetições e parcela experimental composta por um vaso com duas plantas. Foram realizadas aplicações nos estágios V6 e R1 dos seguintes tratamentos e doses: Testemunha (sem aplicação); Yantra (0,5 L ha⁻¹); Yantra +Big Red (0,5 L+0,05 L ha⁻¹); Orkestra (0,35 L ha⁻¹) e Fox (0,4 L ha⁻¹). As plantas foram naturalmente infectadas com oídio (*Microsphaera diffusa*). Entre a primeira e a segunda aplicação dos tratamentos, com o auxílio de uma escala diagramática, foram iniciadas as avaliações de severidade da doença para o posterior cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença. Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott (p≤0,05). Fox e Orkestra diferiram significativamente dos demais tratamentos apresentando controle de 97% e 94%, respectivamente. A associação entre o fosfito de potássio Yantra e o óxido cuproso Big Red proporcionou controle de 68%, enquanto que aplicação isolada de Yantra resultou em 23%. Os tratamentos com fosfito de potássio e com a associação entre fosfito de potássio e óxido cuproso promovem redução do oídio da soja em casa de vegetação.

Palavras-chave: Controle Alternativo, Oídio, Soja.

Apoio: UFLA, CNPQ

Área: Controle Alternativo

Composição de óleos essenciais e mecanismos de ação em frutos de banana com antracnose

Maria Gilmar de Oliveira Soares¹; Eduardo Alves²; Aurivan Soares de Freitas³; Karen Caroline Camargo ⁴; Thaís Aparecida Sales⁴

¹Depto de Fitopatologia/UFLA; ²Professor Orientador Depto de Fitopatologia/UFLA;

³Professor Universidade Vale do Rio Verde/UNINCOR; ⁴Depto de Química /UFMG; ⁵ Depto de Química /UFLA

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum musae*, é considerada a principal doença pós-colheita da banana. Os óleos essenciais se destacam como alternativa viável e promissora no controle da antracnose em diversas fruteiras, pois apresentam compostos químicos com ação direta no patógeno. Assim, objetivou-se com esse trabalho realizar a identificação de compostos químicos presentes nos óleos essenciais de capim-limão, cravo da índia, canela, orégano e tomilho na concentração 0,1%, bem como investigar o modo de ação desses óleos em frutos de banana. As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os compostos foram quantificados utilizando detector por ionização de chama (DIC), e os resultados foram obtidos por meio da normalização de áreas dos picos (%). Para as análises em microscópio eletrônico de varredura (MEV), fragmentos de frutos de banana tratados com os óleos essenciais foram fixados em Karnovsky's, por um período mínimo de 24 h, lavadas em tampão cocadilato três vezes de 10 min e submetidos à desidratação em série crescente de acetonas nas concentrações de 25, 50, 75, 90 e 100%. As amostras foram levadas ao ponto crítico BAL-TEC CPD 030 para a substituição da acetona por CO₂, cobertas com ouro no evaporador BAL-TEC 050 e observadas em MEV LEO Evo 40 XVP. Os principais componentes identificados no óleo de cravo-daíndia foram eugenol (83,73%), β -cariofileno (13,40%) e α -humuleno (1,51%). No óleo de canela foram identificados trans-cinamaldeído (90,3%) e eugenol (8,45%). Geranial (54,50%) e neral (36,87%) foram os principais constituintes do óleo de capim-limão. Carvacrol (77,34%), seguido de γ -terpineno (12,36%) e linalol (6,48%) foram determinados como principais componentes do óleo de orégano. No óleo de tomilho, o timol (26,84%) apresentou maior teor, seguido do p-cimeno (24,04%), carvacrol (21,97%) e α -pineno (5,87%). Os óleos essenciais de capim-limão e tomilho impediram a germinação e penetração do fungo *C. musae* provocando deformação nas hifas. Os óleos de orégano, canela e cravoda-índia, não promoveram ação na entrada do patógeno nos tecidos do fruto, os conídios germinaram e penetraram facilmente nos estômatos e as hifas mostraram-se bem desenvolvidas. Portanto, óleos essenciais de capim-

limão e tomilho apresentam compostos químicos com ação na germinação, penetração e colonização de *C. musae* em frutos de banana.

Palavras-chave: Cromatografia, *Colletotrichum musae*, Pós-colheita.

Apoio: CNPq.

Área: Controle Alternativo

Efeito fungicida do óleo essencial de limão

Maria Luiza Nunes Costa¹; Patricia Vilela da Silva²; Francisco Mendes de Oliveira Neto¹.

¹Docente - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campus Chapadão do Sul. UFMS/CPCS. E-mail: luiza.costa@ufms.br; ²Discente - UFMS/CPCS

As plantas, de uma forma geral, possuem substâncias diversas com efeito antimicrobiano em sua composição. Dentre elas, os óleos essenciais se caracterizam por ser líquidos, voláteis, lipofílicos, odoríferos e tendo como componente em comum, moléculas de natureza terpênica. Sua característica fungitóxica tem sido avaliada no controle de fitopatógenos, na busca de formulações fungicidas mais eficientes e menos prejudiciais aos humanos e ao meio ambiente. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito fungicida do óleo essencial de limão sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina*. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fitopatologia da UFMS/CPCS. O experimento constou de 4 concentrações do óleo essencial de limão - OEL (0; 0,25; 0,50 e 0,75%), 5 fungos e 4 repetições, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em ambiente controlado, com temperatura de 22 ± 2°C, e fotoperíodo de 12 h. A avaliação constou de medições ortogonais diárias do diâmetro das colônias, em centímetros, até que o fungo da testemunha crescesse em toda a placa. Calculou-se assim o crescimento total, dada pela medição final das colônias e o índice de crescimento micelial - ICM, pelas medições diárias. Comparando-se as médias das colônias dos diferentes tratamentos, observou-se que o efeito do OEL nas crescentes doses sobre os diferentes fungos foi inversamente proporcional, apresentando inibição do crescimento micelial em todos os tratamentos. A inibição do crescimento micelial foi de 48,52; 64,80; 70,51; 87,0 e 60,59% para os fungos *F. oxysporum*, *F. solani*, *M. phaseolina*, *S. rolfsii* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. A concentração de 0,75% de OEL proporcionou redução de 40,04 % para o fungo *F. oxysporum*, 57,24 % em *F. solani*, 55,35% em *M. phaseolina*, 81,53 % para *S. rolfsii* e 51,92 % para *S. sclerotiorum*. Estudos posteriores serão realizados para verificação da dose ótima de inibição dos fungos. Conclui-se dessa forma que o óleo essencial de limão possui efeito inibitório sobre os fungos avaliados.

Palavras-chave: fungos; fitopatógenos; controle.

Apoio: UFMS

Área: Controle Biológico

Avaliação do manejo biológico do nematoide das lesões radiculares na cultura da soja

Breno de Oliveira Reis¹, Leila Bernart², Edson Pereira Borges³, Thais Martins do Prado⁴, Débora Cristina Agnes⁵, Claudinei Viana Pereira⁶

Graduando da UFMS¹, Pesquisadora/Fundação Chapadão, Eng o . Agr o . Ma. - CREA RN², Pesquisador/Fundação Chapadão, Eng o . Agr o . Me. - CREA RN 130460001-7.³, Graduanda da UFMS⁴, Biólogo Ma. / Fundação Chapadão⁵, Auxiliar de Pesquisa/Fundação Chapadão⁶

Os parasitas de plantas são um dos principais problemas fitossanitários que ameaçam a sojaicultura brasileira. Por essa razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do manejo biológico de fitonematoides. O experimento foi desenvolvido em Chapadão do Sul/MS e baseou-se em 12 tratamentos com nematicidas biológicos aplicados antes do plantio da soja NA 5909 RG, no tratamento de sementes e pós-plantio pela pulverização do sulco de semente e dos sulcos de adubo. Com 30 e 60 dias após a semeadura (DAS), foram realizadas as análises que levaram em consideração a quantidade de ovos e nematoides adultos presentes em 100 cm³ de solo e na rizosfera. Adicionalmente, avaliou-se o número de planta por metro linear com 7 e 15 dias após a semeadura. O delineamento foi de blocos casualizados com 5 repetições. O nematoide alvo foi *Pratylenchus brachyurus*. Na área do experimento já constava uma média de 890,7 nematoides da mesma espécie. Observou-se que no estande, na avaliação realizada 7 DAS, nenhum tratamento promoveu qualquer redução nas plantas germinadas. Porém aos 15 DAS os tratamentos com Quality + Rizos + Onix , Avicta 500FS e Rugby 200CS, apresentaram uma média de 36 plantas de estande superior a testemunha com a média de 29,3 plantas. A quantidade de *Pratylenchus brachyurus* no solo aos 30 e 60 dias não diferenciou entre os tratamentos, No entanto, aos 30 DAS o tratamento com Nemat + Ecotrich + Moss apresentou média de 5228,0 nematoides presentes na rizosfera comparado com a testemunha que possui média de 1986,6 nematoides presentes na rizosfera , o tratamento se destaca pela sua quantidade a mais de nematoide em relação a testemunha e os demais tratamentos. Conclui-se que para o *Pratylenchus brachyurus*, o tratamento com Nemat + Ecotrich + Moss não promoveu controle da população comparado aos demais tratamentos, testemunha e condição inicial da população de nematoides da mesma espécie, porém constata-se que houve maior média de estande das plantas devido a utilização dos biológicos, sendo assim estruturalmente as raízes estavam bem desenvolvida propiciando meio para a reprodução do *Pratylenchus brachyurus*, assim os tratamentos aumentaram a tolerância da soja NA 5909 RG ao ataque do nematoide.



XVIII Simpósio de Manejo
de Doenças de Plantas

BIOTECNOLOGIA APLICADA À FITOPATOLOGIA



Palavras-Chave: Nematicida, Controle nematológico, lesão radicular, trato biológico, *Transigência Radicular*.

Apoio: Fundação Chapadão, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-UFMS

Área: Controle Biológico

Competição por fonte de nitrogênio no controle da mancha-bacteriana do maracujazeiro

¹Carla Maria Cavalcanti Ribeiro, ²Aline Ferreira dos Santos, ²Inaira Leoni de Souza, ³Giovani Ribeiro de Souza, ³Daniel Augusto Schurt, ⁴Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira
¹Departamento de Fitopatologia/UFLA; ²Universidade Federal de Roraima; ³Embrapa Roraima; ⁴Professor orientador, Embrapa Meio Ambiente

A mancha-bacteriana do maracujazeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae* (XAP), é uma das principais doenças da cultura, e traz impacto significativo à produção. O objetivo deste trabalho foi determinar como a competição por fonte de nitrogênio no filoplano interfere em populações de XAP e na severidade da doença. Utilizou-se antagonista 18SP pertencente ao gênero *Arthrobacter*, selecionado para o controle da doença e que apresentou índice de sobreposição de nicho de 100% quando consideradas as fontes de nitrogênio orgânico. Plantas foram pulverizadas até o ponto de escoamento com suspensão do antagonista 18SP ($Abs_{540} = 0,3$) e plantas do tratamento controle pulverizadas somente com água destilada estéril. Após 24 h, metade das plantas colonizadas com o antagonista e outra com água destilada estéril foram pulverizadas com uma suspensão de ácido L-glutâmico (1 g.L⁻¹). Em seguida foi feita a inoculação com XAP resistente a 200 mg.L⁻¹ de rifampicina, por pulverização em todos os tratamentos. Os resultados demonstraram que a competição por fonte de nitrogênio não alterou a densidade populacional de XAP no filoplano, porém, reduziu a severidade da doença.

Palavras-chave: *Passiflora edulis*, *Xanthomonas axonopodis*, bactéria, controle biológico, filoplano.

Área: Controle Biológico

Controle biológico do mofo branco por *Trichoderma* spp. isolados de solos da floresta amazônica

Laura Bononi^{1,2}; Mayara Sonehara Marin¹; Marta Alves Moitinho^{1,2}; Itamar Soares de Melo¹

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente (Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP), E-mail: laurabononi@hotmail.com ²Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Avenida Pádua Dias s/n – Piracicaba, SP)

No Brasil, a presença de uma gama de patógenos de solo estão entre os fatores limitantes para a produção agrícola. Entre os principais patógenos estão os fungos de solo, como *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco. Devido à agressividade e produção de estruturas de resistência, torna-se difícil o controle desse fungo nas áreas agrícolas. O uso de microrganismos como agentes de biocontrole vêm sendo uma estratégia promissora. Entre os agentes de biocontrole mundialmente conhecidos e empregados, as espécies do gênero *Trichoderma* são proeminentes por controlar vários fitopatógenos, promover o crescimento e melhorar a produtividade de cultivos economicamente importantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antagônico de onze isolados de *Trichoderma*, em casa de vegetação, nas culturas de soja e alface. Os vasos contendo solo foram infestados com *Sclerotinia sclerotiorum* e mantidos em câmara úmida, por sete dias. Após esse período, grãos de arroz colonizados com cada isolado de *Trichoderma* spp. foram incorporados, separadamente, ao solo. Posteriormente foi feito o plantio de sementes de soja, no primeiro experimento, e de plântulas de alface, no segundo experimento. Foram atribuídas notas para avaliar a severidade da doença, considerando as notas de 0 à 4, onde 0 são plantas sem sintomas e 4 plantas tombadas ou mortas. Também foram avaliados a massa de matéria seca da parte aérea e raiz das plantas. Quatro isolados aumentaram significativamente a massa de matéria seca da parte aérea e raiz nas duas culturas, respectivamente, e não apresentaram nenhum sintomas do mofo branco. Três isolados apresentaram resultados promissores no controle do mofo branco para a cultura da soja, AMS 9.42 (333% e 252%), AMS 17.14 (333% e 330%) e AMS 29.38 (272% e 307%) e dois isolados para as plantas de alface, AMS 9.42 (422% e 34%) e AMS 20.5 (437% e 37%). Portanto, esse estudo demonstrou que os isolados de *Trichoderma* da Floresta Amazônica apresentam potencial no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* nas culturas de soja e alface.

Palavras-chave: Biocontrole, mofo branco, soja, alface.

Área: Controle Biológico

Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* IN VITRO

Evaluation of the production and thermostability of metabolites produced by *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* *in vitro*

Marina Guimarães Pacifico¹, Wagner Bettiol², Barbara Eckstein³

¹UNESP/FCA – Campus Botucatu, ²Embrapa Meio Ambiente, ³Embrapa Cenargen. ma_pacifico1@hotmail.com

O biocontrole de fitopatógenos de solo utilizando *Bacillus* spp. é uma tecnologia promissora e que envolve diversos mecanismos de ação. Objetivou-se avaliar em duas concentrações, a produção diária e a termoestabilidade de metabólitos de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov), agente causal da Fusariose do algodoeiro, *in vitro*. Foram utilizados nove isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de Fov. As bactérias foram cultivadas em 100 ml de meio GPL (10 g de glicose; 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 3 g de NaCl; 1 g de KH₂PO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 1000 ml de água destilada e pH 6,0), incubadas a 28°C, sob agitação. Diariamente foram coletadas amostras de 5 e 10 ml de cada caldo fermentado, até o quinto dia de incubação e transferidas para Erlenmeyers, contendo 95 e 90 ml de BDA, e posteriormente autoclavados. A partir do meio solidificado, foram transferidos para o centro de cada placa um disco de 5 mm de diâmetro contendo estrutura de Fov, com sete dias de idade. As testemunhas foram constituídas de placas contendo o patógeno, sem a presença dos metabólitos. O diâmetro da colônia de Fov foi medida diariamente até o sétimo dia de incubação, e calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a porcentagem de inibição micelial (PIC). O delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições. Realizou-se análise de variância após o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e as médias foram comparadas (Scott-Knott à 5% de significância). O isolado AP 210 na concentração 10% com quatro dias de agitação, proporcionou o menor IVCM e o maior PIC (58%). Os isolados 2548 e 2545 nas concentrações de 5 e 10%, durante os cinco dias de produção de metabólitos exibiram valores de IVCM significativos, entretanto o quarto dia de agitação proporcionou PIC superior a 45%. Estes isolados produzem metabólitos termoestáveis eficientes na inibição *in vitro* de Fov e a maior produção foi no quarto dia de multiplicação.

Palavras-chave: Biocontrole, *Bacillus*, fusariose.

Área: Controle Biológico

Duravel (*Bacillus amyloliquefaciens* cepa MBI600) no controle de *Phyllosticta citricarpa* no cultivo de citros

S. G. Castilho¹; F. C. Romano²; M. O. Manosso³

¹Assistente de projetos Biológicos BASF; ²Gerente de Projetos Biológicos BASF; ³Pesquisador de Desenvolvimento de Produtos BASF

A pinta preta dos citros (PPC) causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* é a principal doença fúngica da cultura de citros no Brasil. Problemas relacionados ao uso de fungicidas químicos estimulam a busca de alternativas de controle para essa doença. Objetivou-se nesse trabalho avaliar o controle PPC com aplicações de Duravel, biofungicida a base de *Bacillus amyloliquefaciens* em programa de aplicação e mistura com fungicidas. O ensaio foi realizado em delineamento em blocos casualizados com 8 tratamentos e 4 repetições com intervalo de aplicação de 28 a 42 dias. As aplicações foram realizadas da seguinte forma em cada tratamento: padrão = $T(1 \text{ Kg.ha}^{-1}) + C(0,3 \text{ Kg.ha}^{-1}) / T(1 \text{ Kg.ha}^{-1}) + C(0,3 \text{ Kg.ha}^{-1}) / T(1 \text{ Kg.ha}^{-1}) + C(0,3 \text{ Kg.ha}^{-1})$; com redução de Comet quando acrescido Duravel em 3 aplicações = $T(1) + C(0,2) + D(0,5) / T(1) + C(0,2) + D(0,5) / T(1) + C(0,2) + D(0,5)$; com redução de Comet quando acrescido Duravel nas duas últimas aplicações = $T(1) + C(0,3) / T(1) + C(0,2) + D(0,5) / T(1) + C(0,2) + D(0,5)$; com redução de Comet quando acrescido Duravel somente na última aplicação = $T(1) + C(0,3) / T(1) + C(0,3) / T(1) + C(0,2) + D(0,5)$; acrescentando Duravel no programa de aplicação padrão = $T(1) + C(0,3) + D(0,5) / T(1) + C(0,3) + D(0,5) / T(1) + C(0,3) + D(0,5)$; substituindo Comet por Duravel nas doses de 0,5 e 1,0 Kg.ha^{-1} na última aplicação = $T(1) + C(0,3) / T(1) + C(0,3) / T(1) + D(0,5)$ e $T(1) + C(0,3) / T(1) + C(0,3) / T(1) + D(1)$. Os frutos colhidos foram avaliados quanto a incidência de pinta preta. O percentual de frutos com menor incidência da doença (menos de 10 pintas por fruto) foram somados e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A adição de Duravel no manejo de aplicação com fungicidas proporcionou diferença significativa entre os tratamentos. Duravel quando adicionado ou substituindo Comet na última aplicação na dose de 0,5 Kg.ha^{-1} proporcionou 89 e 93% respectivamente de frutos com menos incidência da doença em relação a 68% do tratamento padrão. Concluiu-se que Duravel quando agregado as doses menores e registradas de Comet, melhorou o controle doença e pode ser uma ferramenta de manejo integrado interessante para o cultivo e enfermidade estudada.

Palavras-chave: Pinta Preta; Citros; Biofungicida.

Área: Controle Biológico

Duravel (*Bacillus amyloliquefaciens* cepa MBI600) no controle de *Cryptosporiopsis perennans* em pré-colheita de maçã

S. G. Castilho¹; F. C. Romano²; M. O. Manosso³

¹Assistente de projetos Biológicos BASF; ²Gerente de Projetos Biológicos BASF; ³Pesquisador de Desenvolvimento de Produtos BASF

A podridão olho-de-boi (*C. perennans*) é uma das principais doenças em pós colheita de maçãs e grande atenção tem sido dada ao uso de alternativas de controle para essa enfermidade. Objetivou-se nesse trabalho avaliar o controle dessa doença com aplicações de Duravel, biofungicida a base de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa MBI600 em programa de aplicação e mistura com fungicidas químicos. O ensaio foi realizado em delineamento em blocos casualizados com 6 tratamentos e 4 repetições em cultivo de maçã da variedade “Catarina”. Foram efetuadas 3 aplicações para manejo da doença: no início de desenvolvimento do fruto, aos 7 e 1 dia antes da colheita, sendo essas aplicações denominadas como A, B e C, respectivamente. Os tratamentos possuíram os seguintes produtos e doses: Comet 0,4L. ha⁻¹, Polyram 3,0kg.ha⁻¹ e Duravel 0,5kg.ha⁻¹. Os tratamentos foram: Comet+Duravel (A), Polyram (B) e Duravel (C); Comet (A), Polyram+Duravel (B) e Duravel (C); Comet (A), Polyram (B) e Duravel (C); Comet (A), Duravel (B) e Duravel (C), Comet (A) e Polyram (B) e uma testemunha sem pulverização para manejo de podridão olho-de-boi. Os frutos colhidos foram armazenados em câmara fria a 20°C no qual foram avaliados quanto a severidade e incidência da doença aos 60, 90 e 105 dias após a colheita (DAC). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Aos 105 DAC, o tratamento Comet (A), Polyram (B) e Duravel (C) apresentou 66,7 e 80,2% de eficácia para o controle de incidência e severidade respectivamente, em comparação a 40,0 e 40,7% do tratamento Comet (A) e Polyram (B). Observou-se elevado índice de controle da doença no tratamento com Comet (A) seguida de 2 últimas aplicações consecutivas de Duravel, variando entre 67 e 100% para controle de incidência e 78 a 100% para controle de severidade aos 60, 90 e 105 DAC. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Concluiu-se que o biofungicida Duravel incrementou a eficácia no controle de podridão olho-de-boi em maçãs quando aplicado em manejo de aplicação e em mistura com fungicidas químicos.

Palavras-chave: Podridão Olho-De-Boi; Biofungicida; Maçã.

Área: Controle Químico

Detecção molecular da resistência de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina a estrobilurinas

Adriano Francis Dorigan¹, Thiago Oliveira Condé¹, Silvino Intra Moreira², Maria Gilmara de Oliveira Soares¹, Nadia Maria Poloni³, Eduardo Alves⁴

¹bolsista CNPq/UFLA. ²Pos-doc PNPd/CAPES, UFLA. ³bolsista CAPES, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Fitossanidade, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

⁴Professor Orientador Depto de Fitopatologia/ UFLA. (adrianodorigan12@gmail.com)

A mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina, é uma doença que atinge pomares de tangerina e seus híbridos em diversas regiões produtoras de citros pelo mundo. Fungicidas inibidores da quinona-oxidase (QoI), pertencentes a classe das estrobilurinas, são empregados no controle do patógeno. Entretanto, a resistência de isolados a fungicidas QoI já foram relatados para diversos patossistemas e estão, em sua maioria, associados a uma mutação não-sinônima do gene citocromo *b* (*Cyt b*) na posição G143A. Tal mutação resulta em uma substituição do aminoácido glicina pela alanina conferindo a isolados um elevado grau de resistência. Diante disso, o objetivo deste estudo foi detectar a mutação G143A em isolados de *A. alternata* patótipo tangerina. Foram avaliadas sequências de DNA de 17 isolados identificados como causadores da MMA, sendo 8 isolados provenientes da cidade de Perdões, Minas Gerais, 5 do estado do Rio de Janeiro e 4 do estado de São Paulo. A extração de DNA dos isolados foi realizada através do protocolo CTAB e os *primers* cytb2f e DTRcytb2-INTr foram utilizados para amplificar a região do gene *Cyt b*. Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) e o sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa *Macrogen Inc.* (Seul, Coreia do Sul). Sequências de DNA dos isolados *A. alternata* EV-3-1S e *A. alternata* MSAH5 foram adquiridas no *Genbank* e utilizadas como referências, sendo o primeiro possuindo genótipo sensível e o segundo genótipo resistente. Todas as sequências foram editadas e alinhadas através do software *Geneious* v11.1.3. O alinhamento resultante revelou que dois isolados (PE9 e SM) apresentaram a mutação G143A no gene *Cyt b* caracterizado pela substituição do nucleotídeo guanina pela citosina. A presença de isolados com genótipo resistente sugere que a aplicação de fungicidas QoI podem estar selecionando indivíduos resistentes nas áreas de cultivo de citros amostradas. Contudo, novas amostragens em diferentes regiões produtoras de citros no Brasil devem ser realizadas para monitorar a presença de populações de *A. alternata* patótipo tangerina resistentes a fungicidas QoI.

Palavras-chave: Inibidores da quinona-oxidase, Mutação G143A, *Citrus reticulata*.

Apoio: CAPES, CNPq e FAPEMIG

Área: Controle Químico

Resistência de isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina a piraclostrobina

Adriano Francis Dorigan¹, Thiago Oliveira Condé¹, Silvino Intra Moreira², Maria Gilmara de Oliveira Soares¹, Nadia Maria Poloni³, Eduardo Alves⁴.

¹bolsista CNPq/UFLA. ²Pos-doc PNPd/CAPES, UFLA. ³bolsista CAPES, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Fitossanidade, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ⁴Professor Orientador Depto de Fitopatologia/ UFLA. (adrianodorigan12@gmail.com)

A mancha-marrom-de-alternária (MMA) é uma importante doença em pomares de tangerina e seus híbridos. Seu agente etiológico é o fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina. A principal estratégia de manejo da doença tem sido o controle químico. Dentre os fungicidas mais utilizados, o inibidor da quinona oxidase (QoI) pertencente a classe das estrobirulinas tem sido amplamente empregado. Nesse estudo foi avaliada a sensibilidade de *A. alternata* patótipo tangerina ao fungicida piraclostrobina com base em valores de EC_{50} (concentração efetiva capaz de inibir 50% do crescimento micelial, em $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foram avaliados 17 isolados de *A. alternata* patótipo tangerina, 8 oriundos de Perdões, Minas Gerais, 5 do estado Rio de Janeiro e 4 do estado de São Paulo. Foi mensurado o diâmetro de colônias em placas de Petri com meio BDA contendo diferentes concentrações de piraclostrobina: 0; 0,1; 5; 10; 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A EC_{50} foi determinada através de regressões não lineares utilizando-se o software GraphPad Prism v. 700. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições por tratamento, sendo o experimento repetido uma vez. Anova e o teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade foram efetuados utilizando-se o software Sisvar v. 5.6. O fungicida piraclostrobina provocou redução do crescimento micelial de *A. alternata* patótipo tangerina em função do aumento da concentração do ingrediente ativo. Observou-se que os valores de EC_{50} para *A. alternata* patótipo tangerina variaram de 0,78 a 45,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, os isolados de *Alternaria alternata* patótipo tangerina avaliados são insensíveis ao fungicida piraclostrobina e fornecem uma forte justificativa para reexaminar o uso de estrobirulinas no controle de MMA.

Palavras-chave: Estrobilurina, Controle químico, *Citrus reticulata*.

Apoio: CAPES, CNPq e FAPEMIG

Área: Controle Químico

Influência de fungicidas no desempenho de sementes de milho

Bruno Fernando Berthequene¹; José Aparecido Benevenuto Neto¹, Maria Luiza Nunes Costa²; Mariana Vale dos Santos¹; Aline Cordeiro Taveira¹.

¹Discente - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. e-mail: brunof.btg@live.com;

²Professora Orientadora - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campus Chapadão do Sul. E-mail: luiza.costa@ufms.br

As doenças do milho, com ênfase nas fúngicas, podem comprometer o rendimento da cultura. Devido a utilização de fungicidas ineficientes, o tratamento das sementes pode comprometer a germinação e a emergência das plântulas. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a germinação padrão e o estande de emergência das sementes de milho inoculadas com *Fusarium verticillioides* e tratadas com fungicidas. O experimento foi realizado no

Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Chapadão do Sul, MS. Os tratamentos constaram da combinação de sementes inoculadas e não inoculadas, sementes tratadas e não tratadas, T1: inoculadas e tratadas (IT) - tiofanato metílico + fluazinam - 150 mL/100 kg de sementes; T2: IT - tiofanato metílico + fluazinam - 180 mL/100 kg de sementes; T3: IT - fludioxonil + metalaxyl-M - 150 mL/100 kg sementes; T4: sem IT; T5: I sem T. Utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado nos testes de germinação e Delineamento em Blocos Casualizados nos testes de emergência. O tratamento 1 (tiofanato metílico + fluazinam 150 mL/100 kg de sementes) proporcionou os melhores resultados de germinação das sementes (primeira contagem: 76% e segunda: 95%) e de estande de campo aos 15 e 30 dias após emergência, 95,83% em ambas as avaliações. Comparando-se o tratamento 1 com o tratamento 5, sementes inoculadas com o *Fusarium verticillioides* mas sem tratamento de sementes, o tratamento proporcionou uma diferença de 22% de incremento do vigor das sementes.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*; tratamento de sementes; *Zea mays*.

Apoio: UFMS

Área: Controle Químico

The control of *Meloidogyne incognita* with the use of ethanol

Franciely M. P. de Rezende¹; Vicente Paulo Campos²

¹Mestranda em fitopatologia CNPq/UFLA; ²Professor Depto de Fitopatologia/UFLA

The lettuce *Lactuca sativa* L. is included as one of the main vegetables in the daily consumption of man. Phytonematodes belonging to the genus *Meloidogyne* are considered a limiting factor in lettuce cultivation. *Meloidogyne incognita* is a species that causes losses that vary from imperceptible to the death of a large number of plants, making it impossible to grow areas for planting. Chemical control with agrochemicals is forbidden; however, it is among the farmers' preference. An alternative control would be the use of ethyl alcohol, which is not toxic to animals and man, and it evaporates rapidly (its boiling point is 78.4°C). The assays were conducted in the greenhouse at UFLA and were repeated twice with 5 replicates. The experiments to evaluate the effect of ethanol on the bipartite plates were assembled in a completely randomized design. The greenhouse tests were assembled in a randomized complete block design (RCBD). The goal of this work was to verify the toxic effect of ethanol on J2 and eggs of *Meloidogyne incognita*, evaluate the effect of water exposed to ethanol in the volatile phase, evaluate the best concentration and the best dose of ethanol in reducing the infectivity of J2 of *M. incognita* in lettuce roots and evaluate the toxic effect of ethanol on soils infested with *M. incognita* in relation to the use of plastic cover for retention of its volatile phase. The number of galls and eggs of *M. incognita* was significantly reduced ($P < 0.01$) with increasing doses of aqueous solution of 40% ethanol. The number of galls was reduced by 89% compared to the control when the dose of 40 mL was used. This reduction did not differ from the treatment at 70%. Similarly, the number of eggs was reduced by 94% over the control when the concentration of 40 mL was used, not differing from the dose of 80 mL. Ethanol presents high toxicity to *M. incognita*, both in aqueous solution and in volatile form, suggesting it as a new molecule for use in the control of phytonematoids.

Key words: *Lactuca sativa* L., Ethyl alcohol, Toxic effect

Financial support: CNPq, FAPEMIG and CAPES.

Área: Controle Químico

Efeito do tratamento químico na emergência de plântulas de milho

Mariana Vale dos Santos¹; José Aparecido Benevenuto Neto¹; Maria Luiza Nunes Costa²; Bruno Fernando Bertequine¹; Aline Cordeiro Taveira¹

¹Discente - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campus Chapadão do Sul. e-mail: marianavale99@outlook.com; ²Professora Orientadora - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campus Chapadão do Sul. e-mail: luiza.costa@ufms.br

O aumento da ocorrência de doenças em plântulas tem sido notado nos últimos anos, principalmente nas áreas de plantio direto. Contra supostas infecções oriundas do campo as sementes passam por um processo de tratamento, onde comumente é utilizado o método químico, cujo intuito é de promover a proteção da mesma. Em relação a dois princípios ativos tiofanato metílico + fluazinam e fludioxonil + metalaxyl-M, o presente trabalho objetivou-se analisar o efeito de ambos na emergência de plântulas de milho anteriormente inoculadas com *Fusarium verticillioides* e a influência dos mesmos na altura de plantas. O trabalho foi executado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Chapadão do Sul, MS, utilizando-se bandejas distribuídas em blocos (DBC) na casa de vegetação. Os tratamentos constaram da combinação de sementes inoculadas e não inoculadas, sementes tratadas e não tratadas (T1: inoculadas e tratadas (IT) (tiofanato metílico + fluazinam -150 mL/100 kg de sementes); T2: IT (180 mL/100 kg de sementes); T3: IT (fludioxonil + metalaxyl-M - 150 mL/100 kg sementes); T4: sem IT; T5: I sem T). Foram avaliados o índice de velocidade de emergência, e a altura das plântulas aos 30 dias. O índice de velocidade de emergência de plântulas das sementes tratadas foram superiores ao das sementes sem tratamento, inoculadas e não inoculadas, destacando-se os tratamentos 1 e 3. No entanto em relação à altura das plântulas, o tratamento 2 foi superior, com uma altura de 33,18 cm comparado com 30,67, referente às sementes inoculadas e não tratadas.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*; tratamento de sementes; *Zea mays*.

Apoio: UFMS

Area: Chemical Control

Foliar fertilizer and nematicide in the management of *Heterodera glycines* in soybean

Thaísa Conrado Nunes Santos¹, Victor Augusto Maia Vasconcelos¹, Manoel Batista da Silva Junior¹, Mário Lúcio Vilela de Resende¹

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal 3037, Lavras 37200-000, MG, Brasil

The soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) can cause significant losses in soybean (*Glycine max*). The low efficiency of registered products demand new sources of control, where resistance inducers stand out. The aim of this study was to evaluate the effect of the commercial resistance inducer, Fulland® (P, Cu and MO) associated or not with abamectin in the management of *H. glycines* in soybean. The experiment was set in 5L pots in a greenhouse, under randomized block design, with 4 replicates. We inoculated 2000 second stage juveniles (J2) per seed on planting day and the treatments tested were only the resistance inducer, the resistance inducer associated with abamectin and the isolated abamectin, all of them compared to a control. The treatments were applied in the V2 and V4 stages with pressurized manual sprayer at 40psi and 200L/ha of syrup volume. At the R3 stage the roots were collected, washed and the cysts and J2 were extracted. After extraction, the number of J2, cysts and eggs per gram of root and the control of each treatment were calculated. The averages were compared by the Tukey test in software R 3.1.3. The resistance inducer associated with abamectin or applied alone differed significantly from control reducing by 90% and 59%, respectively the cyst number and by 69% the J2 number. The egg number did not showed any differences among the treatments. Thus, it is supposed that the resistance inducer is effective in the management of *H. glycines* in soybean when associated or not to abamectin.

Key words: Alternative Control, Cyst nematode, *Glycine max*.

Área: Epidemiologia

Progressão da ferrugem do cafeeiro nos campos Experimentais da EPAMIG no Sul de Minas Gerais no ano de 2017

Alessandro Botelho Pereira¹; Christiano de Sousa Machado de Matos¹; Rogério Antônio Silva²; Vicente Luís de Carvalho²; Ana Luísa Machado Pinto³

¹Bolsista CBP&D/EPAMIG; ²Pesquisador EPAMIG Sul; ³bolsista PIBIC/FAPEMIG/UFLA

Ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) causada pela ação do fungo *Hemileia vastatrix* é uma doença de alta importância por apresentar grandes perdas para a cafeicultura. A doença pode ser observada pelo aparecimento de pústulas na face inferior das folhas (Zambolim et al., 2002). A ação da doença provoca um desfolhamento precoce das plantas, em consequência disso, o produtor sofrerá grandes prejuízos, chegando até 50% de perda na produção do ano seguinte (Carvalho et al., 2011). Objetivou-se nesse trabalho um estudo da progressão da ferrugem nos campos experimentais da EPAMIG em São Sebastião do Paraíso, Três Pontas, Lavras e Machado no ano de 2017. Para o presente estudo foi feita a coleta de folhas do cafeeiro nos campos experimentais da EPAMIG, coletando folhas do terço médio das plantas, do terceiro ou quarto par, escolhendo ao acaso nos dois lados da planta, totalizando 50 folhas por parcela. A avaliação do progresso da doença foi feita através da porcentagem de folhas com pústulas esporuladas. Observou após as avaliações que nos campos experimentais da EPAMIG de São Sebastião do Paraíso e de Lavras a incidência da doença começou a aumentar a partir de maio, sendo que seus picos foram em junho e agosto com 70 e 73% de incidência, respectivamente. No campo experimental da EPAMIG de Três Pontas, os resultados das avaliações mostraram uma evolução da doença, aumentando sua incidência em março com 3 picos: março, junho e agosto. Já no campo experimental da EPAMIG de Machado a incidência aumentou em abril chegando a 98% e atingiu 100% nos meses de maio a julho. A partir de agosto a incidência foi diminuindo devido à queda das folhas e também por causa das condições climáticas. Conclui-se que quando se faz um monitoramento da ferrugem ao longo do ano, a aplicação de fungicida deve ser focada quando a evolução da doença é baixa, para assim minimizar a desfolha e proporcionar uma boa produtividade.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., *Hemileia vastatrix*, incidência.

Apoio: CBP&D Café, EPAMIG

Área: Epidemiologia

Influência de diferentes tipos de arborização na ocorrência da ferrugem do cafeeiro

Christiano de Sousa Machado de Matos¹; Alessandro Botelho Pereira¹; Bruno Botelho Pereira²; Rogério Antônio Silva³; Sara Maria Chalfoun de Souza³; Vicente Luiz de Carvalho³

¹Bolsista CBP&D Café/EPAMIG Sul; ²Bolsista PIBIC/CBP&D Café/EPAMIG Sul;

³Pesquisador EPAMIG Sul

Segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) haverá um aumento da temperatura e alteração no regime de chuvas das regiões tropicais. A utilização da arborização em cafeeiro seria um método de suavizar essas mudanças climáticas. A arborização em cafeeiros muda o microambiente dentro da lavoura, propiciando o aumento da incidência da ferrugem. Portanto esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência do consórcio de duas espécies frutíferas com cafeeiro no progresso da ferrugem. O experimento foi realizado no período de janeiro a dezembro de 2017 e encontra-se instalado em uma propriedade particular, denominada Fazenda da Lagoa, localizada no município de Santo Antônio do Amparo-MG, onde duas espécies frutíferas foram implantadas concomitantemente com a lavoura de café em dezembro/janeiro de 2012. Foram implantadas as espécies *Persea americana* (abacate) e *Macadamia integrifolia* (macadâmia) distribuídas entre as plantas na linha dos cafeeiros. A testemunha é em pleno sol. Para a determinação da incidência da ferrugem foram coletados a cada 30 dias, 100 folhas por parcela para a quantificação da incidência a qual foi determinada pela porcentagem de folhas com pústulas esporuladas. Observou-se que a ferrugem teve um aumento na incidência a partir de junho, com seu pico em agosto, atingindo 64% no sistema abacate/café e 50% no sistema macadâmia/café. Na testemunha a pleno sol, a incidência foi de 28%. Com exceção dos meses de outubro e novembro, tanto o abacate quanto a macadâmia apresentaram incidências maiores do que a testemunha. Concluímos que, apesar dos benefícios do sombreamento em relação aos efeitos das mudanças climáticas e a agregação de valor com as espécies frutíferas, temos que monitorar constantemente a ferrugem, pois os sombreamentos que o abacate e a macadâmia proporcionaram aumentaram consideravelmente a sua incidência.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, consórcio, sombreamento.

Apoio: CBP&D Café, EPAMIG

Área: Micologia

Microconídios produzidos por *Pyricularia graminis-tritici*

Dérica Gonçalves Tavares¹; Silvino Intra Moreira²; Eduardo Alves³

¹bolsista CAPES Depto de Biologia/UFLA; ²bolsista PNPd/CAPES Depto de Fitopatologia/UFLA; ³Professor Orientador Depto de Fitopatologia/UFLA

A reprodução assexuada do agente causal da brusone do arroz *Pyricularia oryzae* (Po) (sin. *P. oryzae* linhagem *Oryza*) ocorre pela produção de macroconídios piriformes, pigmentados e normalmente tri-celulares, desenvolvidos em conidióforos livres, além de microconídios unicelulares, hialinos, fusiformes e curvados originados em fiáldes, em falsas cabeças. Poucos estudos têm sido realizados sobre o papel dos microconídios no ciclo de vida de *Pyricularia* spp. e não existem estudos sobre a produção de microconídios para o agente etiológico da brusone do trigo *Pyricularia graminis-tritici* (Pygt) (sin. *P. oryzae* linhagem *Triticum*). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de microconídios de Pygt em meio de aveia ágar (AA) e em meio de batata dextrose ágar (BDA). Foram utilizados 16 isolados de Pygt, cultivados em AA por 10 dias. Discos das extremidades das colônias com cerca de 8 mm foram transferidos para lâminas de vidro cobertas com meio AA e BDA, e sobre os discos foram colocadas laminulas. Estas foram incubadas em câmara úmida por 10 dias a 25 °C sob luz constante. Após esse período foi feita a observação utilizando microscópio de luz. Foram observados microconídios apenas em meio AA, para 7 isolados. Para mensurar estruturas fúngicas foram utilizados 4 destes isolados (12.0.368, 12.1.117, 12.1.169 e 12.1.291), amostrando-se dez unidades para cada estrutura. As fiáldes apresentaram em média 25,0 (10,2–43,8) × 2,1 (1,5–2,5) µm, formando na superfície do meio uma massa globular de microconídios (falsas cabeças) coberta com uma matriz extracelular. Foram observados microconídios hialinos e unicelulares, separados em dois tipos. O primeiro tipo apresentou menor comprimento (<3,99 µm), com média de 3,0 (2,0–3,8) × 1,6 (0,8–3,0) µm e formato obovoide. Por outro lado, o segundo tipo era maior (>4 µm), com 4,9 (4,0–7,0) × 1,8 (3,0–1,4) µm e de formato fusiforme e curvado. Embora o papel dos microconídios não esteja totalmente elucidado, trabalhos mostram que tais estruturas podem ter importância na disseminação sistêmica da brusone na planta, e futuros estudos podem ser realizados verificando seu papel no ciclo de vida desse fungo.

Palavras-chave: Reprodução assexuada, Conidiogênese, Ciclo de vida.

Apoio: CAPES, CNPq, FAPEMIG

Área: Efetores e Elicitores

Uso de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na promoção de crescimento em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*)

Italo Rodrigues Da Silva¹, Eduarda Daparé Kirnew², Lisandro de Proença Pieroni¹, Cristiane De Pieri¹, Edson Luiz Furtado^{1*}

¹Departamento de Proteção Vegetal - FCA/UNESP. ²FAEF/Garça. *Pesquisador Cnpq

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem amplo uso comercial e industrial, desde a produção de pão, vinho, cerveja e álcool. Na agricultura, essa levedura pode trazer benefícios no desenvolvimento de diversas culturas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no desenvolvimento da fase vegetativa das culturas de feijão e soja, em condições de casa de vegetação. Para a produção das mudas utilizou-se cinco sementes por vaso, e após o aparecimento das folhas primárias realizou-se o desbaste deixando duas plântulas por vaso. Três diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas, T1 - Produção de pães, T2 - Produção de vinho e T3 - Produção de cerveja. Os vasos receberam as soluções de levedura com três dias de crescimento em meio líquido. As avaliações de diâmetro do colo, altura da parte aérea, comprimento radicular, massa (fresca e seca) da parte aérea e radicular, foram realizadas quando as plantas atingiram o estágio fenológico V4. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento. Com os dados obtidos foi realizada a análise de variância pelo programa estatístico SISVAR. Para a cultura da soja, em relação ao diâmetro do colo, comprimento da raiz e massa seca da parte aérea, nenhum tratamento diferiu estatisticamente da testemunha. Todos os tratamentos diferiram em relação a testemunha para a massa seca da parte radicular, obtendo menor crescimento. Para a altura da parte aérea o tratamento T3 teve maior crescimento em relação aos demais. Já para a cultura do feijão, nenhum tratamento diferiu estatisticamente da testemunha, embora o tratamento T1 apresentou maior aumento no diâmetro do coleto. E, para o tratamento T2 observou-se maior acúmulo de massa seca na raiz. Concluímos que as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho não apresentaram promoção de crescimento vegetativo nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Levedura, crescimento vegetativo, microbiologia.

ORGANIZAÇÃO



NÚCLEO DE ESTUDOS
EM FITOPATOLOGIA

REALIZAÇÃO



PATROCÍNIO



APOIO

