

Diferenças Genômicas entre Plantas Resistentes e Suscetíveis a Doenças: Técnicas Disponíveis*

Genomic Differences Between Disease Resistant and Susceptible Plants: Available Techniques.

Raquel da Silveira Nogueira Lima^a*

Dr. José Tadeu Abreu Oliveira^b

Dr. Renato de Azevedo Moreira^c

Resumo

A proteção natural das plantas contra patógenos ou predadores é parcialmente baseada na variedade de barreiras constitutivas, sempre presentes na planta antes do ataque patogênico. Em adição, podem apresentar estratégias de defesa induzida. O presente artigo traz à discussão algumas das principais técnicas biomoleculares de identificação de mecanismos vegetais de defesa.

Palavras-chave: defesa vegetal, diagnóstico molecular

Abstract

The natural protection of the plants against pathogens or predators is partially based on the variety of constituent barriers, always presents in the plant before the pathogenic attack. In addition, they can present strategies of induced defense. The present work brings to the discussion some of the principal biomolecular technics used in identification of plant defense mechanisms.

Key words: plant defense, molecular diagnosis

1. Mecanismos de Defesa Vegetal

O entendimento dos mecanismos de resposta vegetal ao ataque patogênico tem avançado rapidamente nos últimos anos (Boyes *et al.*, 1996; Malleck & Lawton, 1998), com as novas ferramentas da biologia molecular, biologia celular, bioquímica e genética, sendo aplicadas em outras disciplinas de pesquisa (Staskawicz *et al.*, 1995; Somssich & Halbrock, 1998). Numa planta sadia ou normal, que se desenvolve na plenitude de seu potencial genético, existe um equilíbrio entre os processos geradores e os processos consumidores de energia; em uma planta doente, este balanço é quebrado, ou seja, a utilização de energia torna-se desordenada, com conseqüente prejuízo

para a planta (Briggs, 1995; Malleck & Lawton, 1998). Uma outra característica da doença vegetal refere-se ao seu caráter de processo contínuo, não momentâneo. Embora essa continuidade seja uma característica relativa, em função do tempo de duração do fenômeno, é ela que permite a separação da doença de outros fatores de danos à planta, que podem ser referidos pelo nome genérico de "injúria" (Hutchson, 1998). Uma injúria caracteriza-se pela ação momentânea, passageira, de um fator físico-químico ou mecânico sobre a planta (Coley & Barone, 1996). O desenvolvimento de doenças em plantas é caracterizado por uma série de eventos sucessivos e ordenados. Trata-se de um processo cíclico, designado por ciclo das relações patógeno-hospedeiro. O ciclo de relações patógeno-hospedeiro, ou ciclo da doença, é constituído por cinco processos básicos: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução (Bergamin Filho *et al.*, 1995; Malleck & Lawton, 1998). Tradicionalmente, desde os primórdios da *fitopatologia*¹, a doença tem sido vista como uma relação entre dois organismos: de um lado a planta, denominada hospedeiro, e de outro, o agente causal, o patógeno. A complexidade funcional, espacial e temporal da defesa contra patógenos é iniciada com a percepção de sinais exógenos, continuada com os mecanismos de percepção e transdução do sinal e resulta em uma reprogramação do metabolismo celular, envolvendo alterações na atividade gênica (Somssich & Halbrock, 1998).

* Parte do Projeto de Qualificação submetido ao Curso de Doutorado em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (DBBM-UFC).

^a Profa. CCS/UNIFOR, Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, DBBM-UFC Campus do Pici, Fortaleza, Ceará Bloco 907, laboratório 2055 - rsnlima@yahoo.com

^b Prof. Adjunto, Laboratório de Proteínas de Defesa, DBBM-UFC jtaoliv@ufc.br

^c Prof. Titular, Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, DBBM-UFC rmoreira@ufc.br

¹ Fitopatologia, palavra de origem grega (phyton, planta; pathos, doença e logos, estudo) que indica o estudo das doenças de plantas em todos os aspectos, desde a diagnose e sintomatologia, etiologia e epidemiologia, até chegar ao controle (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995).

A Resistência Sistêmica Adquirida (“Sar”) e Resistência “Gene para Gene”

A proteção natural das plantas contra patógenos ou predadores é parcialmente baseada na variedade de barreiras constitutivas, sempre presentes na planta antes do ataque patogênico (Kuc, 1990; Zhu *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997). O efeito combinado de todas essas barreiras refere-se à resistência constitutiva. Em adição, as plantas podem ativar mecanismos protetores; isso é denominado “resistência adquirida” ou “resistência induzida” (Somssich & Halbrock, 1998). Nas interações “gene-para-gene” entre plantas e seus patógenos, a incompatibilidade (ausência de doença) requer um gene dominante ou semidominante de resistência (“R”) na planta e um gene de avirulência (“Avr”) correspondente no patógeno (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Genes “R” são presumidos ser: (a) capazes de iniciar a transdução do sinal para ativar a defesa e (b) capazes de envolver novos genes “R” rapidamente. O isolamento de genes “R” tem revelado classes principais de seqüência genética, cujos produtos parecem ativar semelhantes mecanismos de defesa. A ativação dos genuínos mecanismos de resistência tem sido demonstrada (Wilson *et al.*, 1997). A resistência é expressa localmente no sítio de inoculação primária, mas também de modo sistêmico nos tecidos localizados distantes do ponto de inoculação ou injúria. Desta forma, a SAR, como um conjunto de sinais de defesa induzida, contribui para a ativação da proteção vegetal, provendo uma seletiva vantagem para a sobrevivência (Trewanas & Gilroy, 1991; Lindsay *et al.*, 1993; Pastuglia *et al.*, 1997; Sticher *et al.*, 1997; Lyon, 1998). Este tipo de resistência é expresso contra um largo espectro de organismos, inclusive organismos distintos dos organismos indutores (Lindsay *et al.*, 1993; Cammue *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 1995; Sticher *et al.*, 1997). Na chamada “resistência gene-para-gene”, a planta é, ao mesmo tempo, resistente e suscetível contra cepas patogênicas ao passo que a SAR confere resistência protetora quantitativa (Sticher *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998). O tempo requerido para o estabelecimento da SAR depende da planta em questão, assim como do microrganismo indutor (Harrison *et al.*, 1991; Cordeiro *et al.*, 1998; Lauge & Lewit, 1998).

Mecanismos Envolvidos na “Sar”

A parede celular vegetal é uma fronteira entre o protoplasto celular e o meio ambiente circundante. Atua como uma barreira física natural contra a penetração de microrganismos. A participação da parede no processo de defesa deve também envolver modificações pós-infectivas na estrutura do envoltório celular, através da deposição de outros polímeros, tais como a **calose, lignina ou glicoproteínas** ricas em hidroxiprolina. Outros metabólitos, tais como compostos fenólicos, devem contribuir para a proteção celular, através,

supostamente, do aumento na sua concentração até níveis tóxicos. A família das proteoglicanas contém cerca de 30 moléculas que variam quanto às funções biológicas, atuando como organizadores teciduais, influenciando no crescimento e na maturação celular, como filtros biológicos, e modulando a atividade de fatores de crescimento (GFs) (Iozzo, 1998). Entre as defesas pós-infectivas, as fitoalexinas são mais estudadas em plantas cultivadas. Esses compostos antimicrobianos de baixa massa molecular estão ausentes em tecidos vegetais até o momento da invasão patogênica. A partir desse momento, haverá a síntese de precursores de defesa e o subsequente acúmulo desses (Hunt *et al.*, 1996; Zoubenko *et al.*, 1997). O reconhecimento é ativado pela troca de sinais químicos, envolvendo a participação da planta e dos microrganismos (Braga *et al.*, 1993; Birkenheimeir & Ryan, 1998; Rezzonico *et al.*, 1998). As paredes das plantas e das células fúngicas contêm carboidratos que podem ser liberados durante as interações planta-microrganismo, e genes ativos que lideram a produção de metabólitos tóxicos (fitoalexinas, principalmente). Tais carboidratos, somam-se aos constituintes celulares (proteínas, glicoproteínas, lipídeos) (Boyes *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1997). Elicidores (eliciadores) são moléculas que estimulam respostas defensivas. De particular interesse está a identificação de proteínas de ligação a elicitores que devem atuar como receptores fisiológicos na cascata de transdução de sinais (Hahn, 1996; Honee *et al.*, 1998). Os **eliciadores glicídicos** (Ebel, 1998) são os mais potentes, freqüentes e conhecidos como moléculas capazes de despertar resposta defensiva vegetal. A formação de aposições em paredes celulares em sítios de infecção (Luderitz & Grisebach, 1981) é bem conhecida em monocotiledôneas e em dicotiledôneas, como forma de restringir a penetração fúngica em células epidérmicas.

Ação da Fenilalanina Amônia Liase (PAL)

As plantas produzem grande variedade de compostos secundários contendo grupo fenol. Tais substâncias, classificadas como **compostos fenólicos**, são quimicamente heterogêneas, tendo papéis diversos na planta, como defesa contra herbívoros ou patógenos; suporte mecânico, atração de polinizadores e dispersores de frutos. As duas vias básicas de biossíntese de compostos fenólicos são a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. A via do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não é encontrada em animais. A maioria das classes de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina em ácido cinâmico, através da eliminação de uma molécula de amônia. A referida reação é catalisada pela **fenilalanina amônia liase (PAL)**, importante enzima regulatória do metabolismo secundário. A atividade da PAL em plantas está sob controle de vários fatores internos ou

externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção fúngica e injúria (Taiz & Zeiaer, 1988). A lignina é formada através da polimerização desidrogenativa (Grand *et al.*, 1987) de precursores produzidos na via fenilpropanóide. Considerando-se o fato de que as plantas são organismos sedentários, representando, desta forma, fáceis alvos de predação, a lignina, exemplo de componente estrutural celular, é elemento crucial de defesa vegetal.

Proteínas Relacionadas à Patogênese

O grupo de proteínas denominadas “proteínas relacionadas à patogênese”, descritas nos idos de 1970 em folhas de fumo infectadas com TMV (vírus do mosaico do tabaco) (Van Loon & Van Kammen, 1970; Gianinazzi *et al.*, 1970), induzidas através de situações patogênicas, denominam-se “proteínas relacionadas à patogênese” (“PR proteins”) (Bowles, 1990; Bronner *et al.*, 1991). Através de alterações nas suas condições fisiológicas, as plantas superiores protegem-se de vários estresses, dentre os quais, ataques patogênicos, injúrias mecânicas, aplicação de compostos químicos, tais como, fitohormônios, poluentes atmosféricos, ozônio, ou mesmo, raios ultravioleta (agentes mutagênicos)² (Pieterse *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1998). “Proteínas relacionadas à defesa” (Bharti & Khurana, 1997; Sticher *et al.*, 1997) foram inicialmente definidas como sendo solúveis em ácidos, resistentes à proteólise, proteínas acídicas localizadas no espaço extracelular. Mais tarde houve a identificação de homólogos de natureza básica. Acumulam-se abundantemente no sítio de infecção, mas também são acumuladas em partes não inoculadas da planta infectada. A natureza ou nível de expressão das proteínas de resistência sistêmica adquirida varia entre as espécies vegetais (Dempsey *et al.*, 1998). As similaridades entre as seqüências, relações imunológicas e as propriedades enzimáticas são parâmetros que têm sido usados na classificação das referidas proteínas (Broner *et al.*, 1991).

Ativadores Químicos da Resistência Sistêmica Adquirida

Compostos Inorgânicos

Várias substâncias naturais ou sintéticas induzem a resposta de defesa sistêmica adquirida. O critério aplicado a um agente de proteção vegetal, para qualificá-lo como um indutor de resistência, baseia-se nos seguintes quesitos (Durner *et al.*, 1998): a) nem o agente, nem o metabólito derivado do agente defensivo deve possuir atividade antimicrobiana *in vitro*

ou na própria planta; b) o agente modifica a interação planta-patógeno, permitindo uma interação incompatível, a qual inclui mecanismos relacionados à defesa, induzidos antes e após o ataque patogênico; c) o agente deve proteger a planta contra patógenos; deve protegê-la apenas contra determinado grupo de patógenos, em função da reação de indução. Sais de fosfato induzem a resistência sistêmica adquirida em pepino, feijão e milho. O sequestro de íons cálcio no sítio de aplicação por fosfatos é sugerido ser o gerador de um sinal endógeno de resistência sistêmica adquirida. Em pepino e fumo, pulverizados com preparação de SiO₂, induzem a resistência sistêmica acompanhada por atividades acessórias de quitinase (Creelman & Mullet, 1997; Yang *et al.*, 1997), beta-1,3-glucanase, peroxidase (STICHER *et al.*, 1997) e polifenoloxidase. O oxigênio (Lamb & Dixon, 1997) participa dos processos de formação de espécies oxigênio-ativas, incluindo o ânion superóxido (O₂⁼), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH[•]). O ânion superóxido é um produto intermediário do transporte elétrico mitocondrial, da fotossíntese e das reações da flavina desidrogenase, e pode ser convertido em outras espécies oxigênio-ativas, nas quais o grupo hidroxila é o mais reativo (Sharma & Davis, 1997). A infecção por patógenos avirulentos elicia a ativação de uma bateria de defesas, freqüentemente acompanhadas por um colapso das células atacadas, denominando-se “**resposta hipersensitiva**” (HR) (Conconi *et al.*, 1996; Lamb & Dixon, 1997; Yang *et al.*, 1997).

Compostos Orgânicos Naturais

Em adição ao ácido salicílico e ao ácido jasmônico anteriormente discutidos, ácidos graxos poliinsaturados ou oxigenados, tais como o **araquidônico, linolênico, linoléico e ácido oléico** induzem resposta de defesa sistêmica adquirida (SAR) em batata, contra *P. infestans*. Esse efeito não é acompanhado pelo aumento dos níveis de ácido salicílico ou pela expressão de genes de resistência sistêmica. O ácido araquidônico é imóvel nas plantas e seu efeito sistêmico parece ser mediado pela liberação de um sinal endógeno. Em arroz, derivados oxigenados do ácido alfa-linolênico, que se acumula em folhas infectadas, pode induzir a SAR, quando aplicado em raízes. Oligômeros de quitosana (poli-N-glicosamina), os quais são liberados pela ação da quitosanase através das paredes celulares de fungos invasores, pode proteger raízes de tomate contra *Fusarium oxysporum f.sp. radicum lycopersici*

² A mutagênese devida à ação dos raios UV deve-se à alteração do padrão de leitura da fita informacional de DNA, na qual haverá deslocamento entre o pareamento de bases nitrogenadas adenina-timina, provocando o pareamento errôneo.

quando aplicado às sementes, raízes, ou às folhas. Elicitinas parecem estar envolvidas na percepção do sinal de transdução, liderando a ativação de respostas de defesa (Creelman & Mullet, 1997).

Fitopatógenos Parasitas

A resistência a fitopatógenos pode ser definida pelo índice de reprodutividade do parasita (Taylor & Sasser, 1978; Monteiro, 1982). No entanto, para avaliação da relação planta x parasita, há necessidade da mensuração de um outro fator: o dano causado pelo parasita à planta (Canto-Saénz, 1985; Macculloch et al., 1989).

PCR: Diagnóstico Molecular de Doenças Vegetais

A identificação e caracterização de fitopatógenos são os primeiros passos para seu estudo. Tradicionalmente a identificação é feita baseada em características morfológicas, entretanto, estas levam a controvérsias quanto à identificação de diversas espécies. Técnicas moleculares são ferramentas poderosas e têm sido de grande utilidade na taxonomia e caracterização destes organismos. A técnica de PCR revolucionou várias áreas da biologia, incluindo sistemática e caracterização, possibilitando a obtenção de respostas previamente não possíveis. Pode ser utilizada para a amplificação de genes específicos, assim como para a amplificação de segmentos anônimos do genoma. Métodos baseados em PCR já foram utilizados com esta finalidade, e novos métodos recém-descritos têm o potencial para avançar ainda mais os estudos de taxonomia e genética populacional (Leal-Bertioli, 1998). O uso de critérios morfológicos é ainda o primeiro passo na identificação, mas podem não ser completamente acurados porque (1) diferenças subcelulares podem não ser expressas como características morfológicas (2) diferenças em características morfológicas podem ser devidas à instabilidade de isolado ou condições de cultivos (Shehechter & Hall, 1973; Ferron, 1978; Couteaudier et al., 1994). Portanto, freqüentemente resultados baseados em critérios fenotípicos devem ser confirmados utilizando métodos mais acurados, como, por exemplo, métodos baseados em características genéticas. Análise de DNA oferece maior precisão na diferenciação intraespecífica, que, via de regra, não pode ser alcançada de maneira consistente através de análise morfológica. Vale notar que, na maioria dos casos, classificações baseadas em marcadores moleculares (DNA) corroboram classificações baseadas em características morfológicas. O desenvolvimento de PCR (*polymerase chain reaction*, Mullis & Fallona, 1987) proporcionou um avanço antes inimaginável em taxonomia, por oferecer meios mais rápidos e precisos para identificar e caracterizar fitopatógenos. PCR também pode ser utilizado para DNA *fingerprinting*, amplificando regiões aleatórias do genoma, oferecendo

padrões únicos para cada espécie ou isolado (Caetano-Anollés et al., 1991, Welsh & McClelland, 1990, Williams et al., 1990). Além disso, esta técnica pode ser utilizada para amplificar regiões do DNA de seqüência conhecida, como genes que codificam RNA, genes de mtDNA (Kohn et al., 1991), genes de tRNA (Welsh & McClelland, 1991) e microssatélites (Henson et al., 1993; Charlesworth, 1994; Leal et al., 1997). A amplificação ocorre em 3 etapas (HENSON & FRENCH; 1993): Desnaturação do molde de DNA; anelamento de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos às fitas; extensão dos "primers" por ação da enzima termoestável taq polimerase. As etapas podem ser repetidas por 20 a 40 ciclos, dependendo da seqüência a ser amplificada. Para a detecção dos produtos de PCR recorrer-se-á à eletroforese em gel de agarose, coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta, embora métodos que envolvam a detecção colorimétrica de produtos amplificados possam ser utilizados (MUTASA et al., 1996). Recentemente foi desenvolvida a técnica de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), combinando a robustez de RFLPs e a sensibilidade de PCR.

Análise de Restrição de DNA Ribossomal

Ribossomos possuem a função básica de traduzir mRNA em peptídios e proteínas. Desta forma, genes que codificam para RNAs ribossomais estão presentes em sistemas vivos, em números repetitivos de cópias (100 a 430 vezes por genoma haplóide (Long & Dawid, 1980). Por ser constituído por regiões que evoluem em velocidade diferentes, o rDNA é considerado como um conjunto de cronômetros, cada um oferecendo diferentes perspectivas da história evolucionária do organismo (Woese, 1987; Evans et al., 1988).

RAPD-PCR, AP-PCR, DAF, AFLP e DNA Satélite

O método de **RAPD-PCR** (DNA Polimórfico Amplificado Randômico), descrito por Williams e colaboradores (1990), envolve o uso de um primer de dez bases, com a temperatura de ligação ao DNA-alvo de 36°C. Os produtos de RAPD-PCR são analisados diretamente em um gel de agarose corado com brometo de etídio. O **PCR Arbitrário** (AP-PCR) foi descrito por Welsh & McClelland (1990). É semelhante ao RAPD-PCR, porém utiliza *primers* mais longos (de 20 a 34 nucleotídios), com temperatura de ligação de 40°C, seguida por ciclos de temperatura de ligação em torno de 60°C. Os produtos de AP-PCR são marcados radioativamente com aa-^{32P} nos últimos ciclos da reação, e são então separados em um gel de poliácridamida e visualizados por autorradiografia. Combinações de diferentes *primers* foram também utilizadas e observou-se que isto aumentava as possibilidades de se identificarem novos polimorfismos (Welsh & McClelland, 1991). **DAF** utiliza primers bem menores (cerca de 5 nucleotídios, produzindo padrões mais complexos

que RAPD-PCR ou que AP-PCR (Caetano-Anollés *et al.*, 1990). Os produtos são separados em gel de poliacrilamida e visualizados por coloração com prata. Nos tipos de DNA fingerprinting citados acima, cada primer origina um padrão diferente de produtos de PCR, cada um com o potencial de detectar polimorfismos entre linhagens da mesma espécie (Welsh & McClelland, 1991). Estes métodos tornaram-se muito populares, uma vez que não requerem conhecimento prévio de nenhuma seqüência do genoma do organismo a ser analisado. AP-PCR produz menos bandas do que RAPD-PCR OU DAF, por utilizar primers mais longos (com menos chance de ligação do genoma) e temperatura de ligação mais alta (que torna a reação mais específica). Entretanto, a visualização das bandas através de radioatividade é mais eficiente do que a visualização utilizando brometo de etídio, possibilitando a observação de um maior número de bandas por reação. Os primers longos e a temperatura mais alta também fazem de AP-PCR uma técnica mais repetitiva do que RAPD-PCR. A visualização de produtos de DAF é também mais eficiente do que de RAPD-PCR (Li *et al.*, 1996; Esquibet *et al.*, 1998). RAPD-PCR é um método altamente discriminatório, entretanto, é altamente sensível a pequenas variações (às vezes inevitáveis) de protocolo, como mudança de enzima Taq polimerase, de fornecedor de primer ou de dNTPs, ou variações mínimas na temperatura ambiente, enquanto a reação é montada. Portanto, é aconselhável comparar perfis de reações que foram feitas em ocasiões diferentes. Já existe um consenso de que análises filogenéticas baseadas em métodos de PCR só devem ser utilizadas para taxa próximos, como patótipos de uma mesma espécie ou, no máximo, espécies de um mesmo gênero. Assim, as chances de não homologia entre as bandas são minimizadas (Clark & Lanigan, 1993; Hardrys *et al.*, 1992). Para sanar este problema, foram implementadas técnicas complementares a PCR, tais como 'Restriction Endonuclease' (REF) e 'Single Strand Conformational Polymorphism' (SSCP).

AFLP é um método que foi patenteado e licenciado por vários anos pela Keygene (Holanda), mas só foi publicada posteriormente (Vos *et al.*, 1995). Esta técnica tem três passos: clivagem do DNA com enzimas de restrição, ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva de fragmentos de restrição. Um dos primers utilizados é marcado com [32 P] O ATP, e os produtos são analisados por autoradiografia. Uma das vantagens apresentadas por AFLP é que, ao contrário dos outros métodos, pode avaliar um grande número de loci independentes (cerca de 500 por reação), além de ser altamente repetitivo (Majer *et al.*, 1996). O genoma de eucariotos é formado de seqüências repetitivas, que estão arranjadas em "tandem" chamadas de **DNA satélite**. O DNA satélite varia de 10 a 10⁵ cópias por genoma haplóide, equivale a uma porção de menos de 1% até cerca de 70% do genoma

total (Bernard & Miklos, 1979). É principalmente constituído de heterocromatina e parece ser inerte geneticamente. Sua função ainda não foi bem estabelecida, mas parece depender pouco da seqüência, mas da estrutura dentro de uma mesma espécie (Tarès *et al.*, 1993_a). Por estarem representados em grande número no genoma, são de fácil detecção em Dot blot e RFLPs (Tarès *et al.*, 1993_a e 1993_b), assim como fáceis de serem amplificados a partir de um único nematóide (Grenier *et al.*, 1993). Essa característica torna essas regiões extremamente úteis para diferenciação de fitopatógenos difíceis de serem distintos em estágio juvenil, assim como para a detecção de importância quarentenária em germoplasma introduzido. Foram aqui apresentadas algumas das técnicas mais utilizadas na identificação e caracterização de patógenos e parasitas. Na prática, a escolha da técnica a ser usada deve levar em conta fatores como tempo e instalações disponíveis para a análise, assim como o custo e a distância taxonômica dos organismos a serem analisados (PIETERSE *et al.*, 1996; SHIRASU *et al.*, 1996; BONAS & VANDEN-ACKERVAKEN, 1997; ORR *et al.*, 1997; SHAH, 1997).

Referências

- BAKER, B. *et al.* Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, v. 276, p. 726-733, 1997.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. 919 p.
- BERNARD, J.; MIKLOS, G. L. G. *International review of cytology*. New York: Bourne, Danielli & Jeon, 1979.
- BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of arabidopsis as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochem. Photobiol.*, v. 65, n. 5, p. 765-776, 1997.
- BONAS, U.; VAN DEN ACKERVAKEN, G. Recognition of bacterial avirulence, proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant J.*, v. 12, p. 1-7, 1997.
- BOYES, D. C.; McDOWELL, J. M.; DANGL, J. L. Plant pathology: many roads lead to resistance. *Curr. Biol.*, v. 6, n.6, p. 634-637, 1996.
- BRAGA, M. R.; COSTA, A. P. P.; DIETRICH, S. M. C. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. *Carb. Res. Braz.*, v. 45, n.1, p. 76-80, 1993.
- BRIGGS, S. P. Plant disease resistance. Grand unification theory in sight. *Curr. Biol.*, v. 5, n.1, p. 128-131, 1995.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BASSAM, B. J.; GRESSOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, v. 9, p. 553-557, 1991.
- CAMMUE, B. P. *et al.* Gene-encode antimicrobial peptides from plants. *Ciba Found Symp.*, v. 186, p. 91-101, 1994.
- CANTO-SAÉNZ, M. *An advanced treatise on meloidogyne, biology and control*. North Caroline: Raleigh, Sasser & Carter, 1985. v.1, p. 225.

- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v. 371, p. 215-220, 1994.
- CLARK, A. G.; LANINGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotides divergence with RAPDs. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, p. 1096-1111, 1993.
- CLARKE, J. D. et al. Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis cpr6-1 mutant. *Plant Cell*, v. 10 n. 4, p. 557-569, 1998.
- COLEY, P. D.; BARONE, J. A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 27, p. 305-335, 1996.
- CORDEIRO, M. C. et al. Characterization of early induced genes in Arabidopsis thaliana responding to bacterial inoculation: identification of centrin and of a novel protein with two regions related to kinase domains. *FEBS Lett*, v. 434, p. 387-393, 1998.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynth and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 48, p. 355-381, 1997.
- DEMPSEY, D. M. A.; SILVA, R.; KLESSIG, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends in Microbiol.*, v. 6, n. 2, p. 54-61, 1998.
- DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxid, cyclic GMP, na dcyclic ADP-ribose. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 95, n. 17, p. 10328-10333, 1998.
- EBEL, J. Oligoglucoside elicitor-mediate activation of plant defense. *Bioessays*, v. 20, n. 7, p. 569-576, 1998.
- ESQUIBET, M. et al. Differentiation of normal and giant Vicia faba populations of the stem nematode Ditylenchus dipsaci: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. *Heredity*, v. 81, p. 291-298, 1998.
- EVANS, W. B.; HUGHES, J. E.; WELKER, D. L. The use of DNA probes for taxonomic study of Dictyotetium wild isolates. *Gene*, v. 119, p. 561-569, 1988.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 48, p. 575-607, 1997.
- HARRISON, M. J. et al. Stress responses in alfafa (Medicago sativa L.). Cis-elements and trans-acting factors for the quantitative expression of a bean chalcone synthase gene promoter in electroporated alfafa protoplasts. *Plant Mol. Biol.*, v. 16, n. 5, p. 877-890, 1991.
- HENSON, J. M. et al. Use of Polymerse Chain Reaction to detect Gaemannomyces graminis DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil. *Phytopathology*, v. 83, p. 283-287, 1993.
- HONEE, G. et al. Induction of defense related responses in Cf9 tomato cells by the AVR9 elicitor peptide of Cladosporium fulvum is developmentally regulated. *Plant Physiol.*, v. 117, n. 3, p. 809-820, 1998.
- INNES, R. W. Plant-parasite interactions: the gene-to-gene model become outdated? *Trends Microbiol.*, v. 3, n. 12, p. 483-485, 1995.
- IOZZO, R. V. Matrix Proteoglycans; from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 67, p. 609-652, 1998.
- KOHN, L. M. et al. Restriction fragments length polymorphisms in nuclear and mitochondrial DNA of Sclerotinia species. *Phytopathology*, v. 78, p. 1047-1051, 1988.
- KUC, J. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. *Ciba Found Symp.*, v. 154, p. 213-224, 1990.
- LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 48, p. 251-275, 1997.
- LAUGE, R.; DE WIT, P. J. G. M. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genet. Biol.*, v. 24, n. 3, p. 285-297, 1998.
- LEAL, S. C. M. et al. Amplification and restriction endonuclease digestion of the PR-I gene for detection and characterization of Metarhizium strains. *Mycological Research*, v. 101, p. 257-265, 1997.
- LUDERITZ, T.; GRISEBACH, H. Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol: NADP+ dehydrogenase from spruce (Picea abies L.) and soybean (Glycine max L.). *Eur. J. Biochem.*, v. 119, n. 1, p. 115-124, 1981.
- MAJER, D. et al. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*, v. 100, p. 1107-11, 1996.
- MALECK, K.; LAWTON, K. Plant strategies for resistance to pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 9 n. 2, p. 208-213, 1998.
- MORRIS, S. W. et al. Induced resistance responses in maize. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 11, n. 7, p. 643-658, 1998.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Methods in Enzimology*, v. 155, p. 335-51, 1987.
- PIETERSE, C. M. et al. A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, v. 10, n. 9, p. 1571-1580, 1998.
- SHAH, D. M. Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 8, n. 2, p. 208-214, 1997.
- SHARMA, Y. K.; DAVIS, K. R. The effects of ozone anfloxidant responses in plants. *Free Radical Biol. Med.*, v. 23, n. 3, p. 480-488, 1997.
- SHIRASU, K.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Signal transduction in plant immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 8, n. 1, p. 3-7, 1996.
- SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science (reviews)*, v. 3, n. 3, p. 86-90, 1998.
- STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v. 268, p. 661-667, 1995.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, A.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 35, p. 235-270, 1997.
- SZALANZI, A. L. et al. Identification of cyst nematodes of agronomic

- and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *J. Nematology*, v. 29, p. 255-267, 1997.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic Acids Research*, v. 19, p. 861-866, 1991.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, I.; VOGEL, J.; SOMERVILLE, S. Signalling pathways - a common theme in plants and animals. *Current Biology*, v. 7, p. 175-178, 1997.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, p. 221-271, 1987.
- YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant, defense responses. *Gen. Develop.*, v. 11, p. 1621-1639, 1997.
- YU, I. C.; PARKER, J.; BENT, A. F. Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, n. 13, p. 7819-724, 1998.
- ZHU, Q. et al. Transcriptional activation of plant defense genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 6, n. 5, p. 624-630, 1996.
- ZOUBENKO, O. et al. Plant resistance to fungal infection induced by nontoxic pokeweed antiviral protein mutants. *Nat. Biotechnol.*, v. 15, n. 10, p. 992-996, 1997.