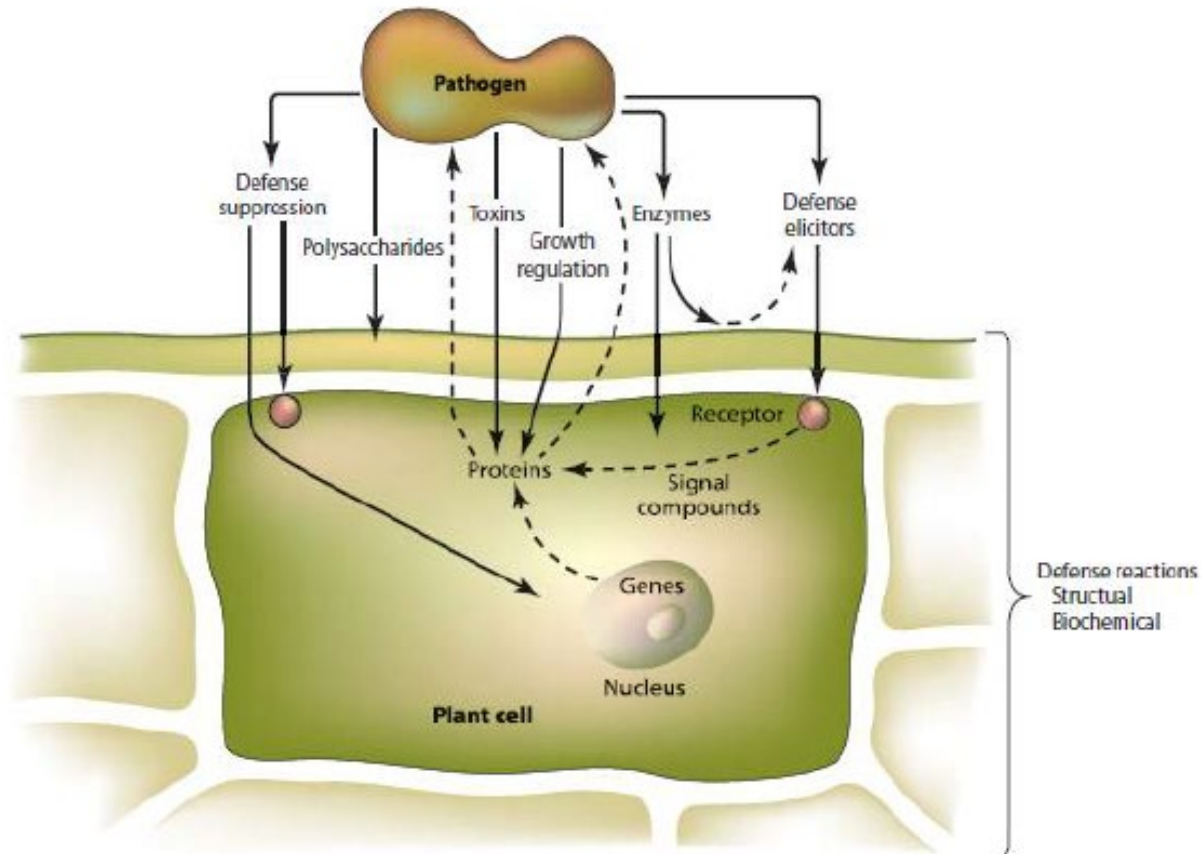


Bases moleculares do reconhecimento de patógenos por plantas

Profa. Dra. Chirlei Glienke
BIOGEMM-UFPR

Mecanismos de Resistência – Fatores de resistência



Representação esquemática da interação do patógeno com a célula da planta hospedeira. Dependendo da composição genética, a célula pode reagir com diferentes mecanismos de defesa

Fatores Estruturais:

Pré-formados (constitutivos)
Pós-formados (ativados)

Fatores Bioquímicos:

Pré-formados
Pós-formados

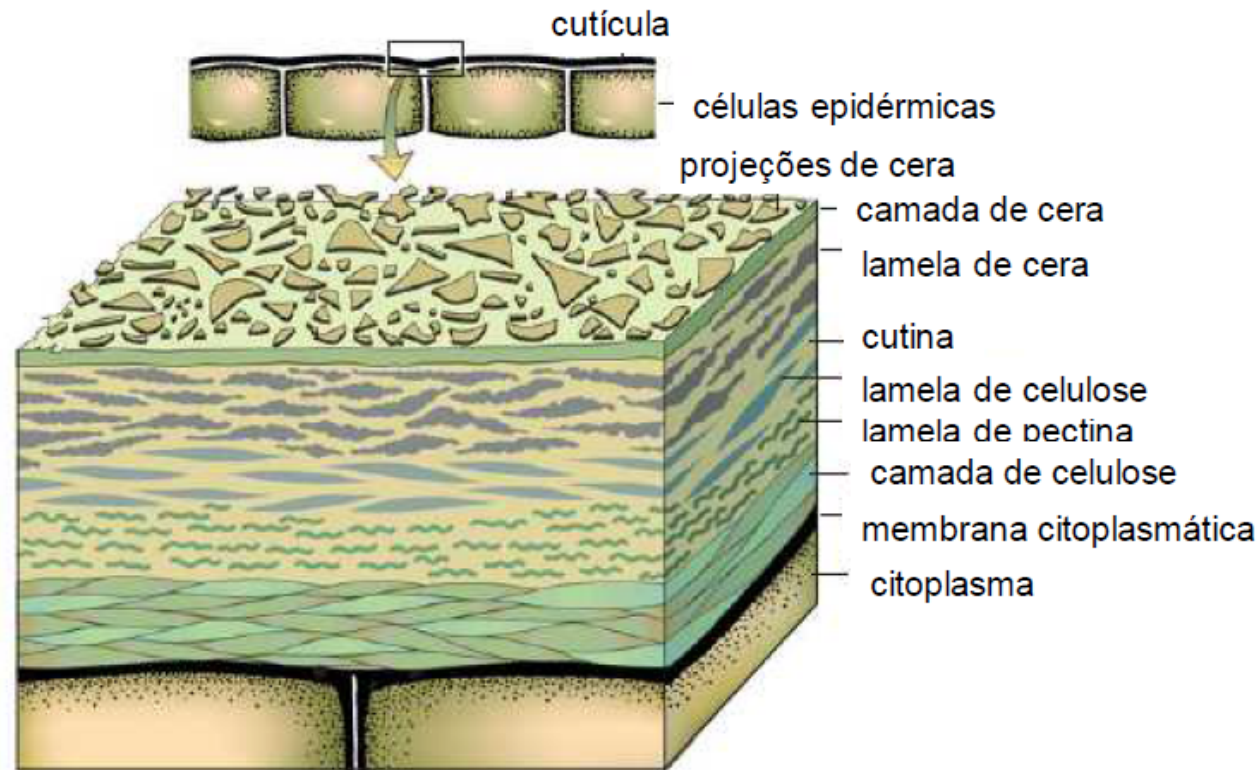
Fatores de resistência - Estruturais

Estruturais (Físicos) = Atraso na penetração



Mecanismos de Resistência – Estruturais pré-formados

***Cutícula: superfície hidrofóbica
(impede a formação do filme de água)**

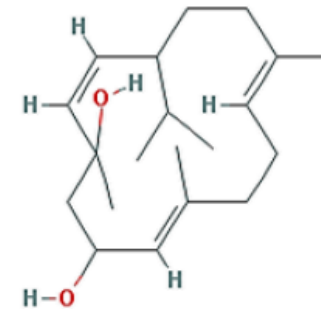


Representação esquemática da estrutura e composição da cutícula e parede celular de células epidérmicas (AGRIOS, 2005).

Mecanismos de Resistência – Estruturais pré-formados

1-CUTÍCULA

- Barreira tóxica:
 - Substâncias antifúngicas:
 - **Duvatrienodiol**
 - Extraído da cutícula de folhas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.).
 - Inibidor de germinação de *Peronospora* sp.



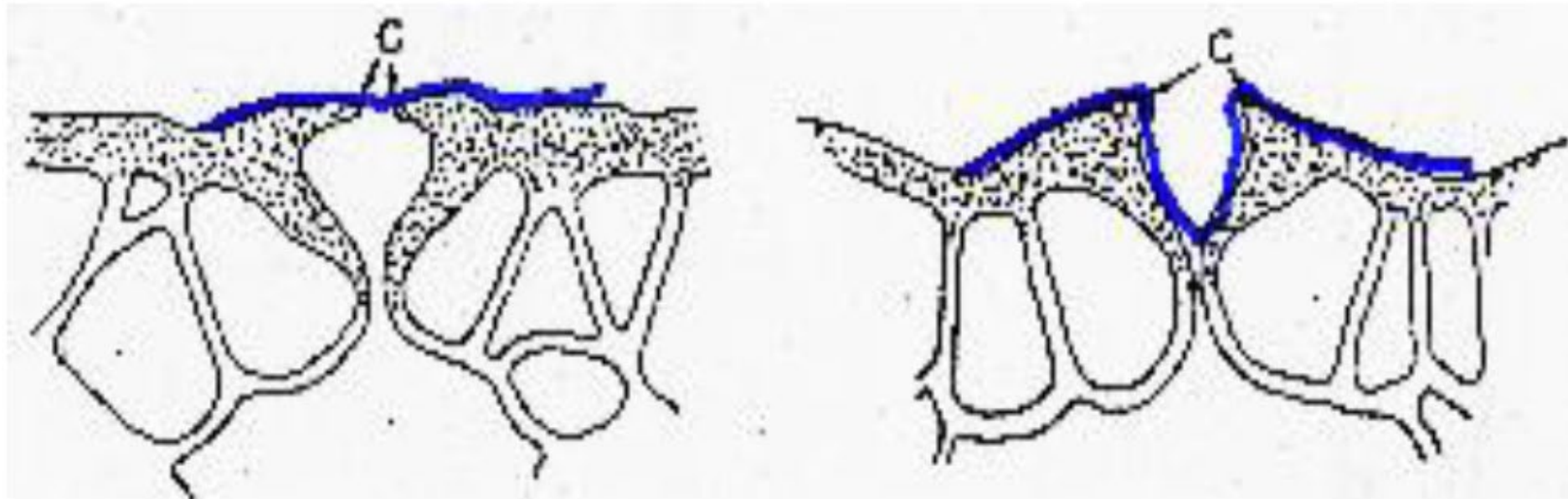
Mecanismos de Resistência – Estruturais pré-formados

2-ESTÔMATOS

- Período de abertura, número, localização e forma
 - *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (ferrugem do colmo) é sensível a CO₂ e penetra somente sob luz.
 - » Abertura tardia de estômatos > maior resistência a *P. graminis*.

Mecanismos de Resistência – Estruturais pré-formados

- Estômatos de espécies de Citrus resistente e suscetível a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.



- Dependendo do tipo de fenda estomática, a penetração das células bacterianas é impedida ou dificultada

Mecanismos de Resistência – Estruturais pré-formados

3-PILOSIDADE/TRICOMAS

- Intervenção na continuidade do filme de água
- Repelir insetos
- Produção de substâncias tóxicas (ligados a glândulas)

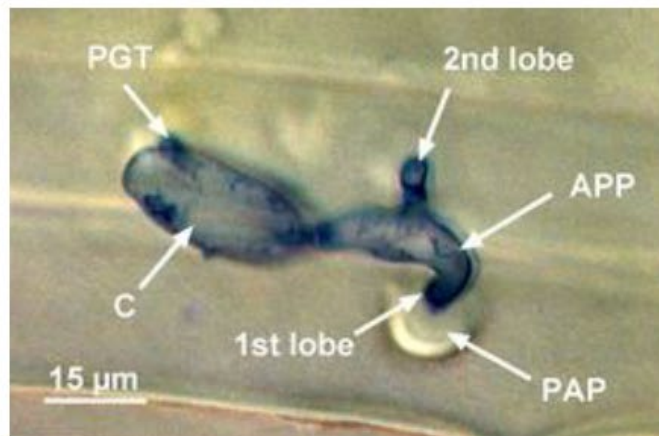


Mecanismos de Resistência – Estruturais pós-formados

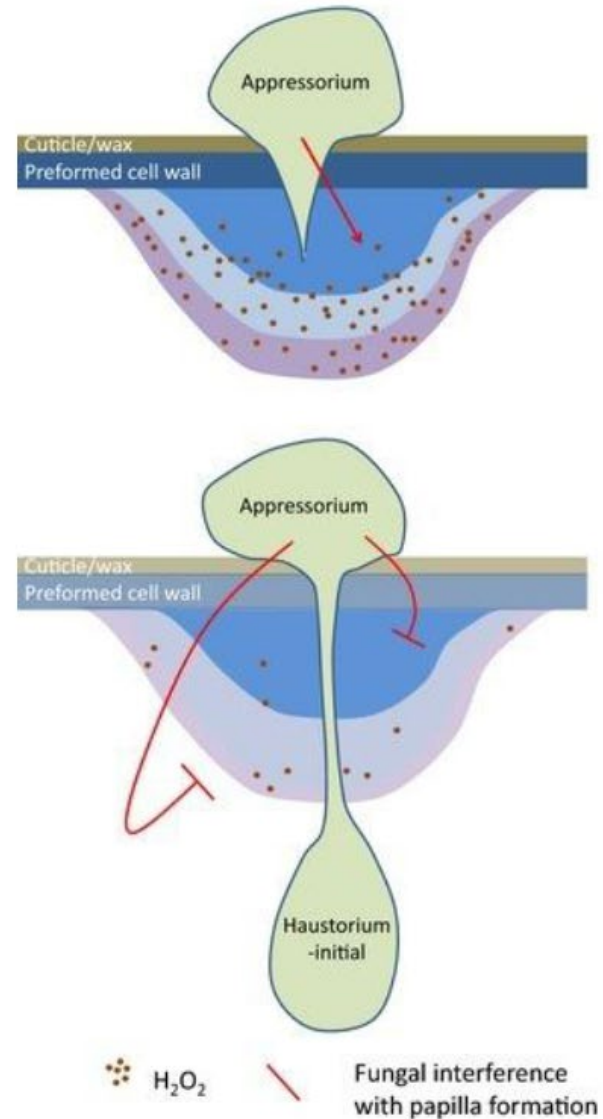
Papilas

- Deposição de material heterogêneo entre a membrana plasmática e a parede celular no sítio de infecção, sob a hifa de penetração;
- Constituídas de calose (β -1,3-glucana), lignina, compostos fenólicos, celulose, silício e suberina;
- Função:** Barreira contra penetração e troca de metabólitos entre o hospedeiro e o patógeno;
- Reparo da parede celular após a invasão.

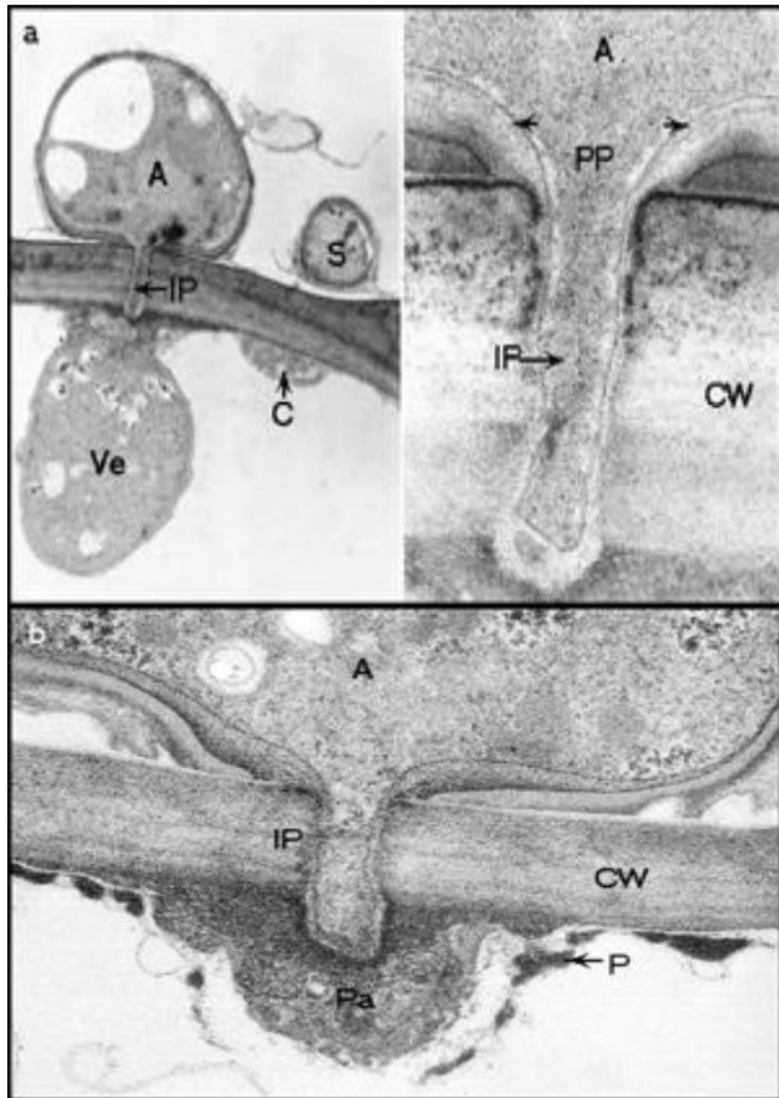
Mecanismos de Resistência – Estruturais pós-formados



Hückelhoven (2014)



Mecanismos de Resistência – Estruturais pós-formados



Colletotrichum
X
Sorghum bicolor

↔ Suscetível

↔ Resistente

Mecanismos de Resistência – Estruturais pós-formados

Lignificação

- Pode interferir o crescimento de fitopatógenos através da modificação química das paredes celulares;
- Aumento na resistência das paredes à ação das enzimas degradadoras;
- Impede difusão das toxinas do patógeno para planta;
- Dificulta migração de nutrientes da planta para o patógeno .

Mecanismos de Resistência – Fatores de resistência

Bioquímicos:

Inibição do crescimento

Condições adversas para a sobrevivência

Pré-formados

- Fenóis*
- Alcalóides
- Lactonas insaturadas
- Glicosídeos fenólicos
- Glicosídeos cianogênicos*
- Fototoxinas

Pós-formados

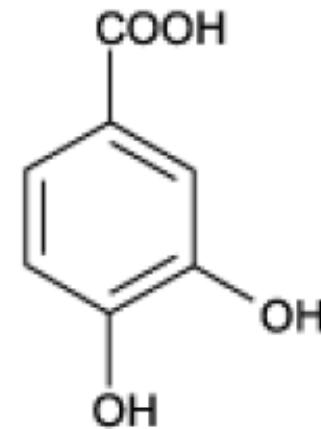
- Fitoalexinas*
- Quitinases*
- β -1,3-glucanases*
- Proteínas-RP
- Inibidores proteicos
- Espécies reativas de oxigênio

Mecanismos de Resistência – Pré-formados

Compostos fenólicos

-Ácido protocatecóico e Catecol

- Exibem atividade antimicrobiana
- Cebola - *Colletotrichum circinans*



Suscetíveis



Resistentes

Mecanismos de Resistência – Pré-formados

Alcalóides (saponinas)

- Compostos antifúngicos
- Lise de células que contenham esteróis na membrana

- α TOMATINA

Eficiente : Tomate - *Sclerotinia rolfsi*

Não possui efeito contra –*Septoria lycopersici*



Mecanismos de Resistência – Pré-formados

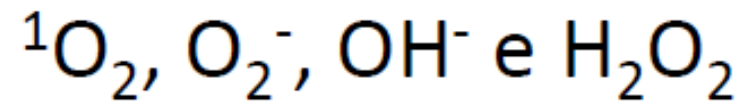
Proteínas e peptídeos antimicrobianos

-Quitinases e β 1,3 Glucanases

- Hidrolizam quitina e as β 1,3 glucanas, principais componentes da parede celular dos fungos;
- O aumento da expressão dessas enzimas em plantas, indica um aumento na resistência contra patógenos.

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Espécies reativas de oxigênio



- São moléculas altamente reativas que se acumulam rapidamente no início do processo infeccioso (explosão oxidativa)
- Interações compatíveis e incompatíveis

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

- Podem inibir o desenvolvimento do patógeno (efeito antimicrobiano direto);

- Expressão de genes de defesa;

Reação de hipersensibilidade (RH);

- Reforço da parede celular (ligações com proteínas estruturais);

- Fortalece a integridade da membrana plasmática.

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

2-FITOALEXINAS

- Compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, sintetizados pelas plantas e acumulados nas células vegetais em respostas à infecção;
- Produzidos em função de estímulos resultantes de elicitores

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Fitoalexinas

Elicitores:

-Bióticos

- Origem microbiana (exógeno), resultantes de estruturas fúngicas, células bacterianas ou partículas virais;
- Origem da própria planta (endógeno), na forma de carboidratos, glicoproteínas, polipetídios, enzimas ou lipídios;

-Abióticos

- luz ultravioleta; metal pesado (HgCl_2)

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Fitoalexinas

Produção de Fitoalexinas x resistência de plantas

- Plantas resistentes invariavelmente produzem altos níveis de fitoalexinas comparadas às suscetíveis;
- A remoção de fitoalexinas no sítio de infecção diminui a resistência da planta;
- Moléculas supressoras de fitoalexinas produzidas por patógenos diminuem a resistência das plantas;
- As fitoalexinas acumulam-se no local apropriado (tecidos do hospedeiro) para causar inibição do patógeno.

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Proteínas relacionadas à patogênese

- São induzidas no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos;
- Podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno;
- Apresentam propriedades físico-química diferentes das demais proteínas encontradas em plantas;

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Proteínas relacionadas à patogênese

- **Ação direta**
 - Inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos;
- **Ação indireta**
 - Indução de resistência;

Mecanismos de Resistência – Pós-formados

REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE

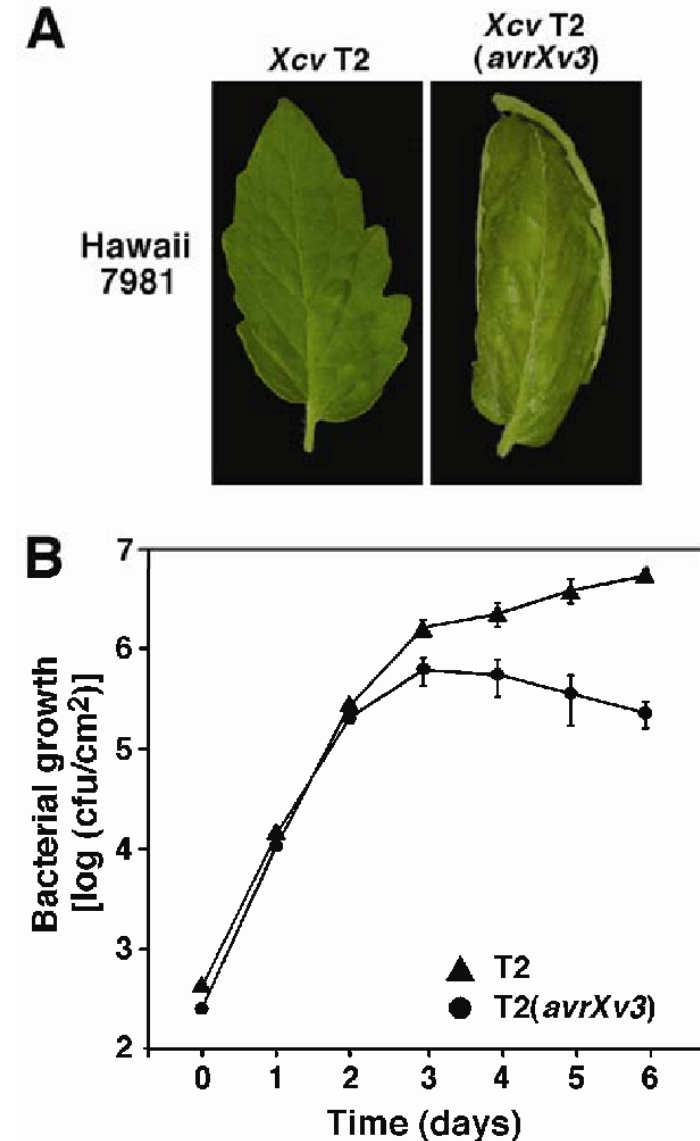
- Resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno;
- Morte de um número limitado de células da planta ao redor do sítio de infecção “Suicídio”;
- Parada do desenvolvimento do patógeno;
- Reações incompatíveis.

REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE

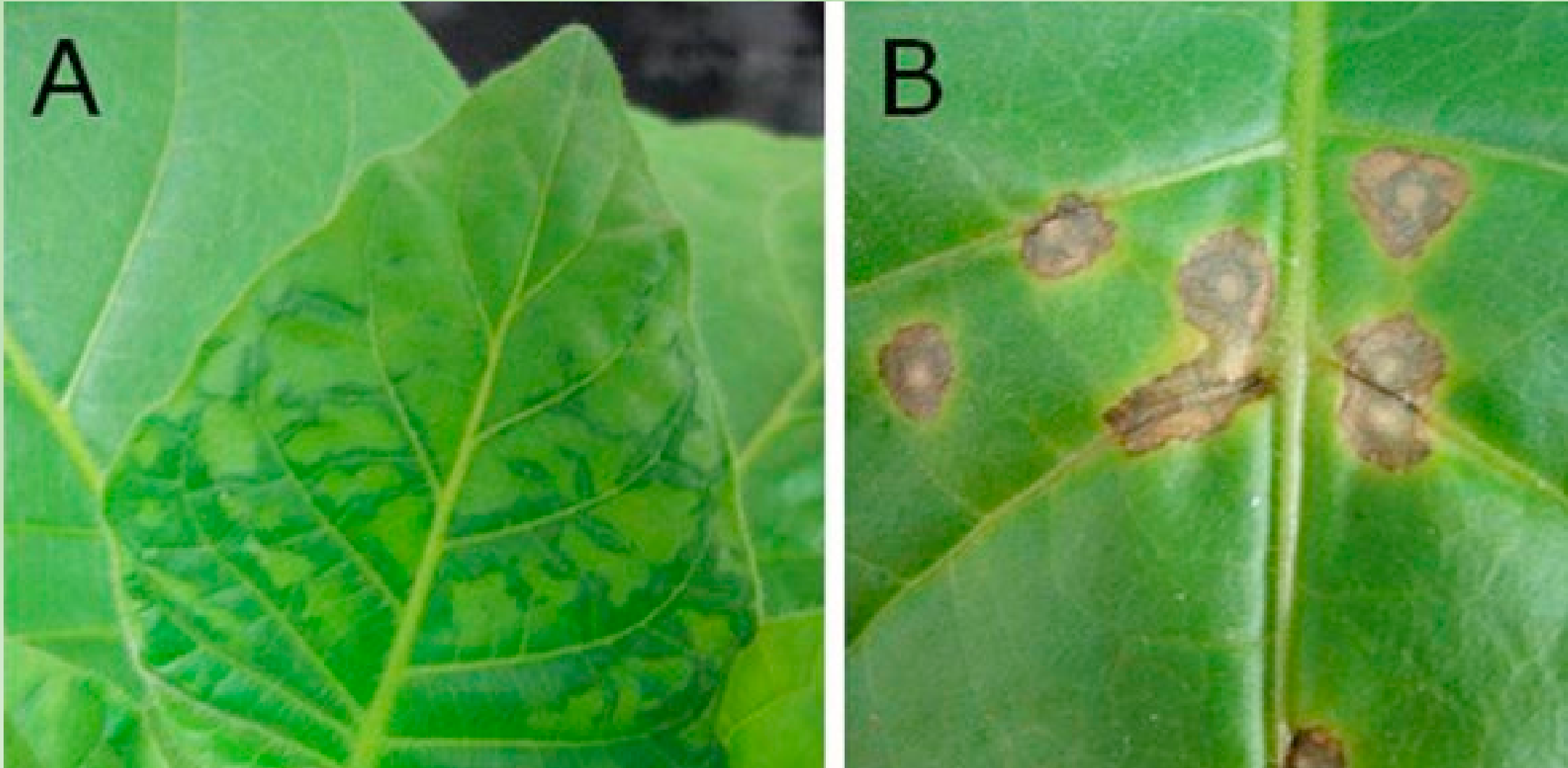


Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Fig. 5. Hypersensitive response elicitation and inhibition of bacterial growth in Hawaii 7981 leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* T2 strains carrying the *avrXv3* gene. **A**, Hawaii 7981 plants were inoculated with bacterial suspensions (10^8 CFU/ml) of *X. campestris* pv. *vesicatoria* T2 (left panel) or *X. campestris* pv. *vesicatoria* T2 carrying *avrXv3* (right panel). Leaves were photographed 24 h after inoculation. **B**, Hawaii 7981 plants were infected as in A at a titer of 10^5 CFU/ml. Bacterial populations in the leaves were estimated from samples harvested during a period of seven days. Triangles and circles represent bacterial concentrations of *X. campestris* pv. *vesicatoria* T2 and *X. campestris* pv. *vesicatoria* T2(*avrXv3*) strains, respectively. Data represent the mean \pm standard error (n = 4).

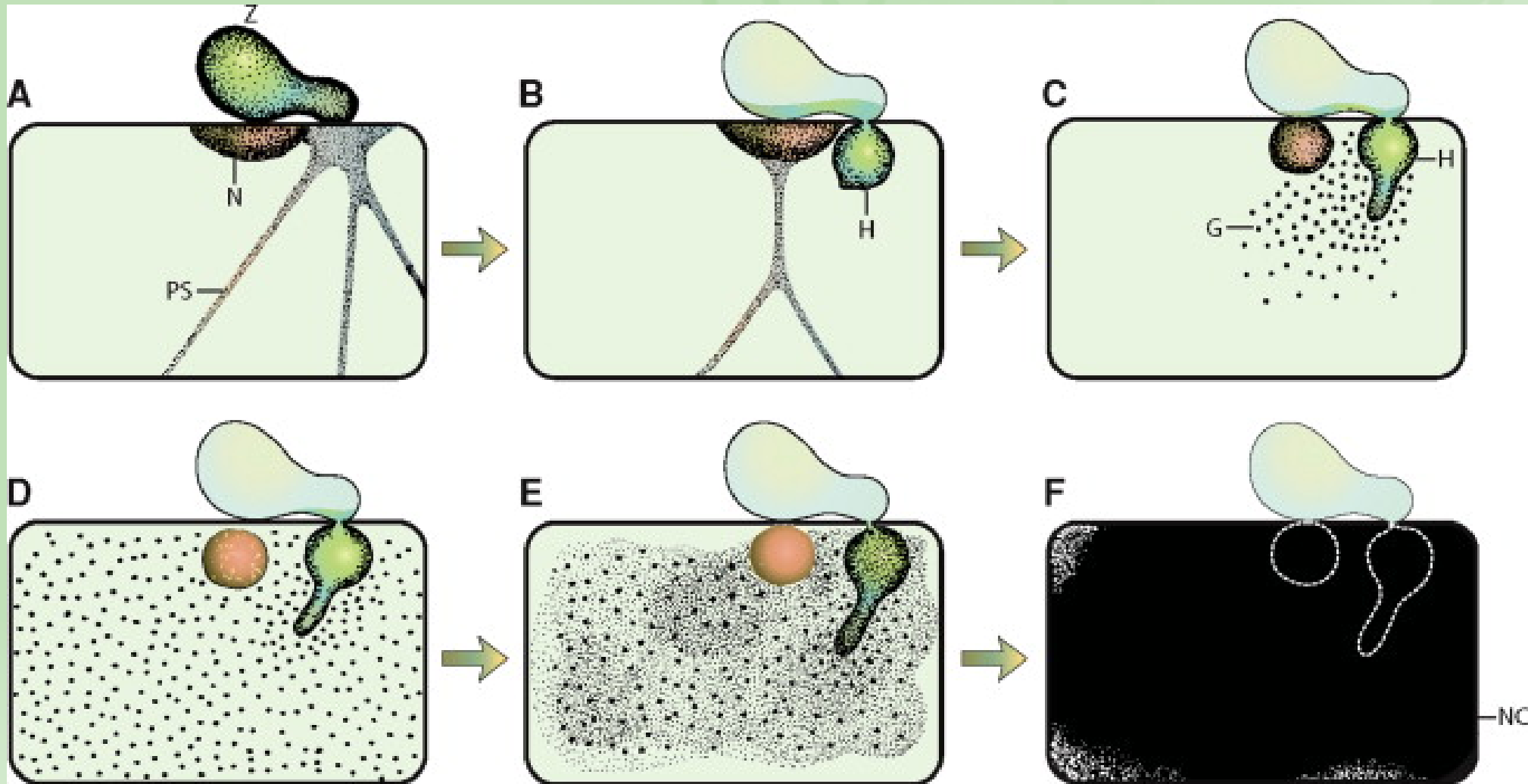


Mecanismos de Resistência – Pós-formados



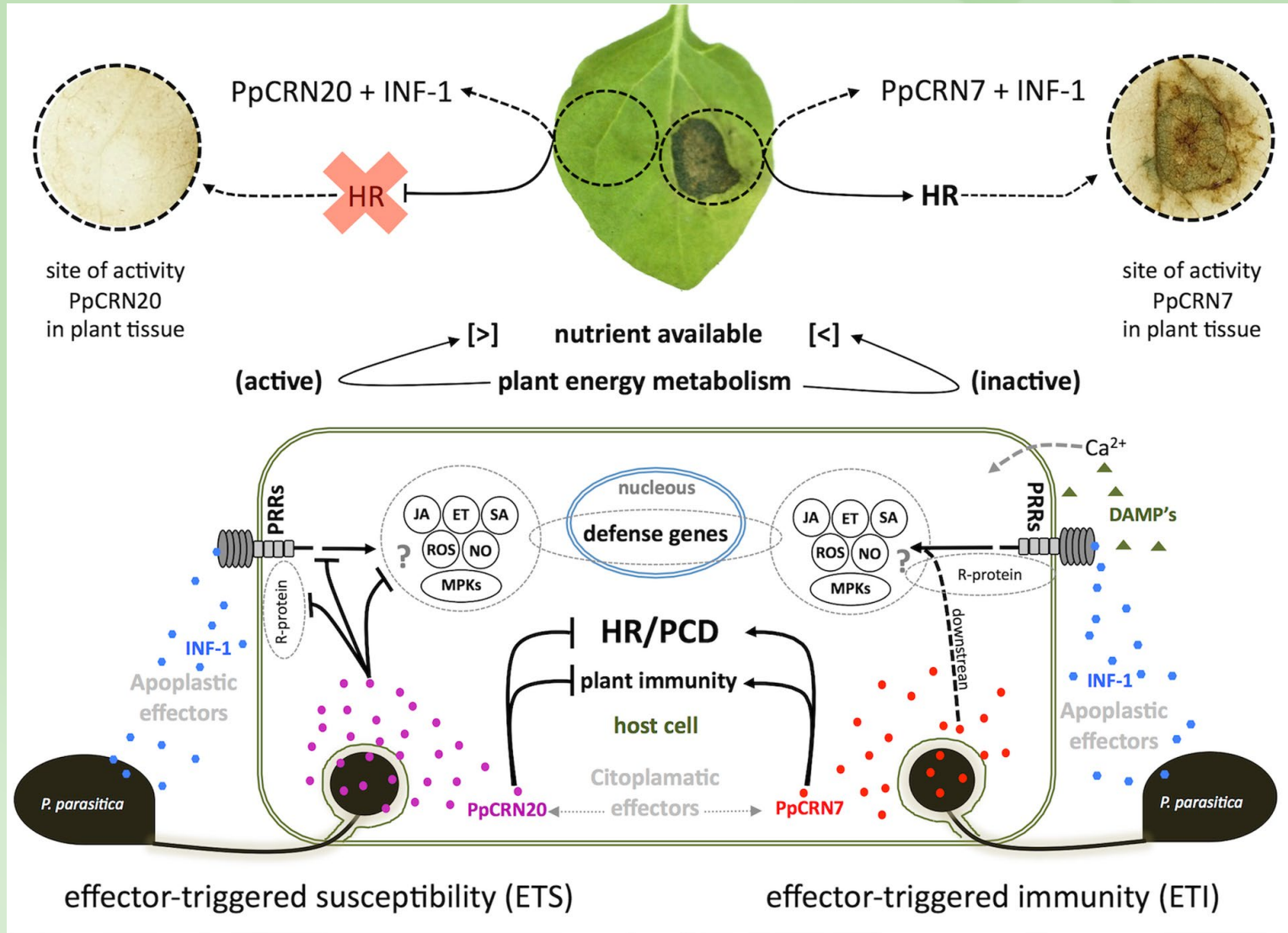
Hypersensitive response (HR) in tobacco (A) Mosaic symptoms caused by tobacco mosaic virus on a susceptible tobacco leaf. (B) Hypersensitive cell death by tobacco mosaic virus on a resistant tobacco leaf. Photo K.B.G. Scholthof.

Mecanismos de Resistência – Pós-formados



Stages in the development of the necrotic defense reaction in a cell of a very resistant potato variety infected by *Phytophthora infestans*. N, nucleus; PS, protoplasmic strands; Z, zoospore; H, hypha; G, granular material; NC, necrotic cell. [After Tomiyama (1956). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **21**, 54–62.]

Mecanismos de Resistência – Pós-formados



Schematic model of the interaction between *P. parasitica* and host plants, including the biological role of PpCRN7 and PpCRN20 effectors. On left, figure represents the PpCRN20 acting on hypersensitive response (HR) and cell-death suppression. On right, figure represents the PpCRN7 acting synergistically with the elicitor INF-1 to promote and potentiate HR and subsequent PCD. The sites of activity of the effectors PpCRN20 and PpCRN7 are highlighted by DAB assay

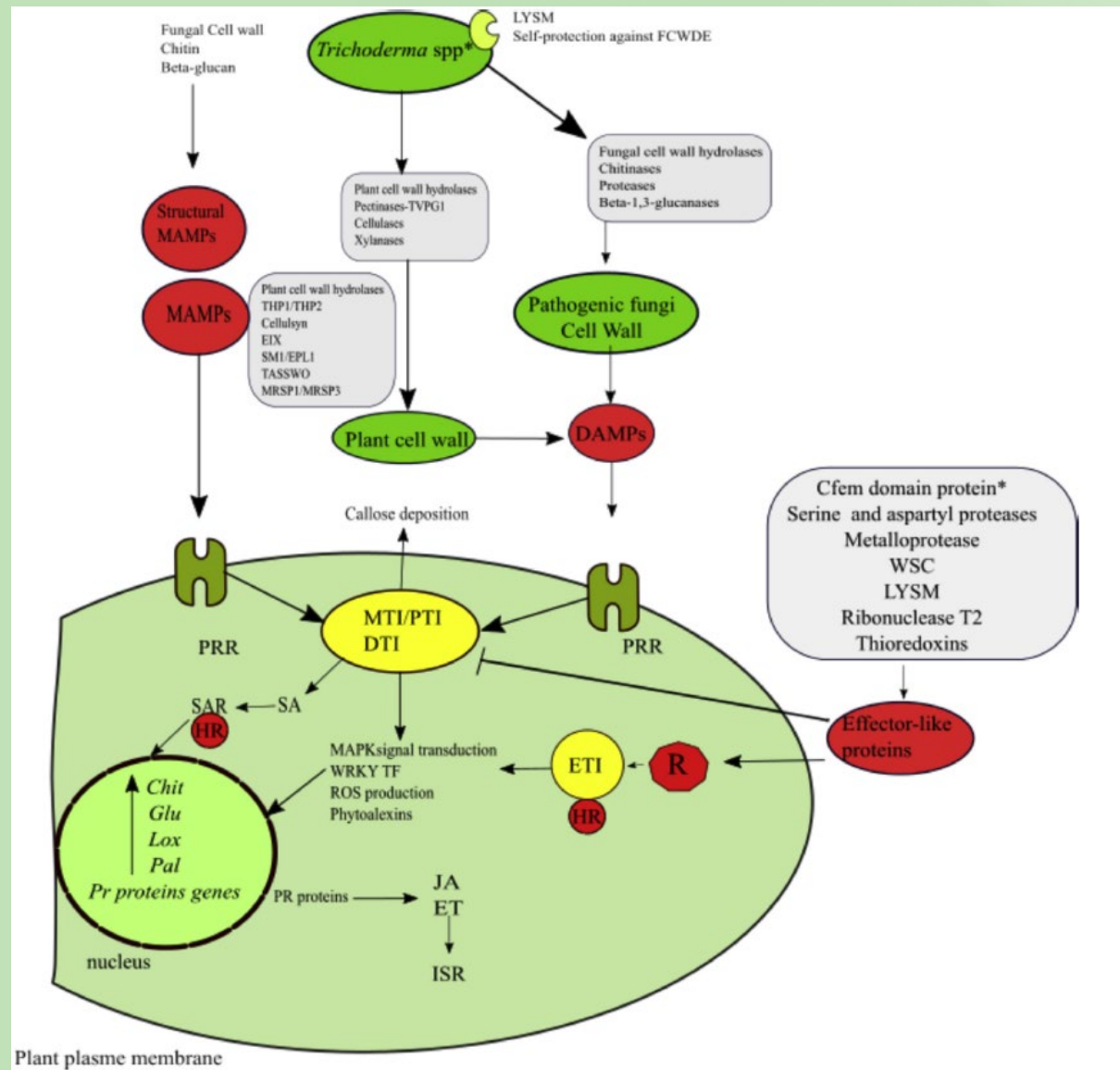
Mancha Preta de Citros



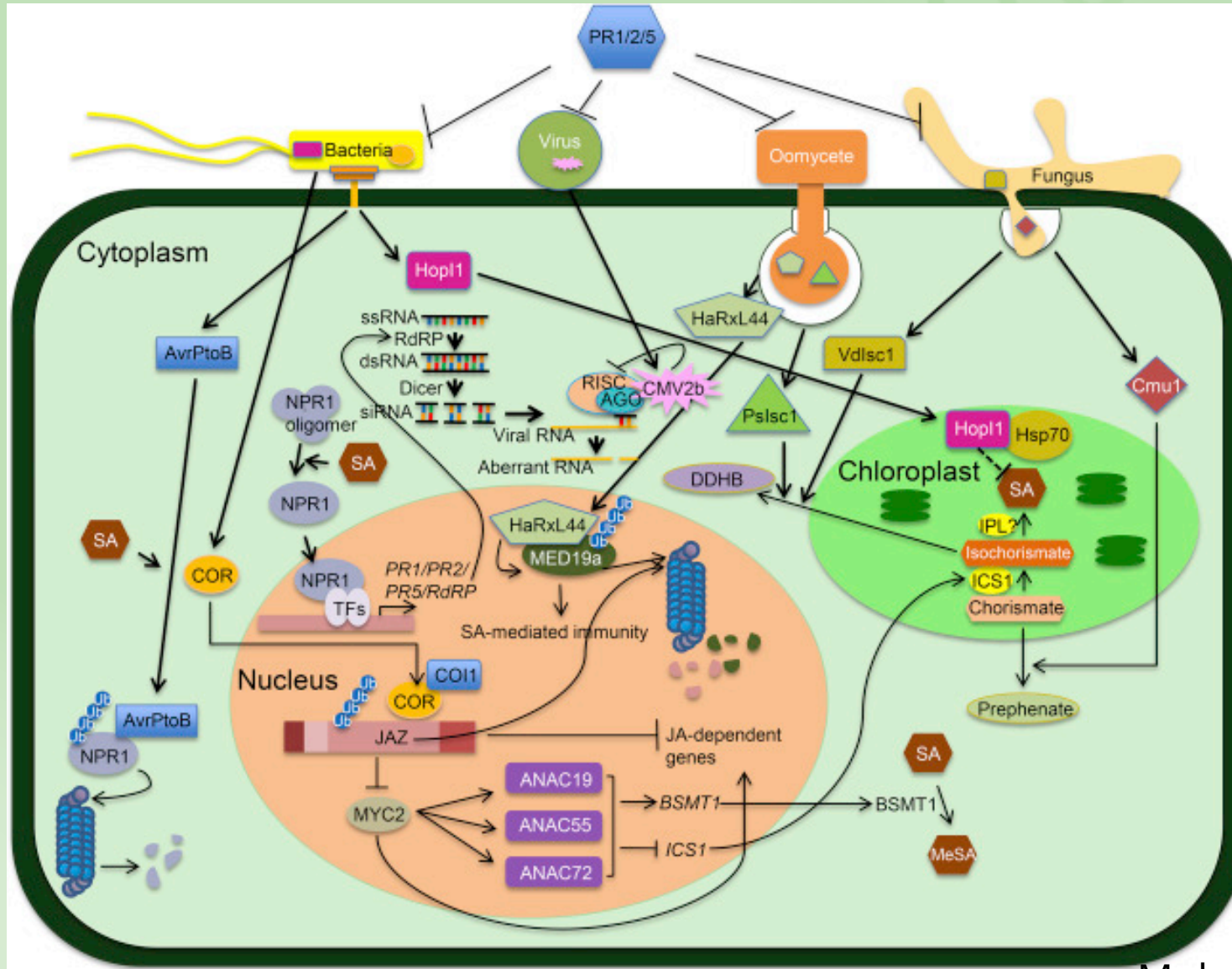
Mecanismos de Resistência – Pós-formados

Tabela 1. Famílias de proteínas relacionadas à patogênese.

Família	Propriedades
PR-1	Antifúngica
PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Quitinase I-II, IV-VII
PR-4	Quitinase I-II
PR-5	Osmotina
PR-6	Inibidores de protease
PR-7	Endoproteinases
PR-8	Quitinase III
PR-9	Peroxidases
PR-10	<i>Proteínas semelhantes a ribonuclease</i>
PR-11	Quitinase V
PR-12	Defensinas
PR-13	Tioninas
PR-14	Proteínas relacionadas com o transporte de lipídios
PR-15	Oxalato oxidases
PR-16	<i>Proteínas semelhantes a oxalato oxidase</i>
PR-17	Desconhecida

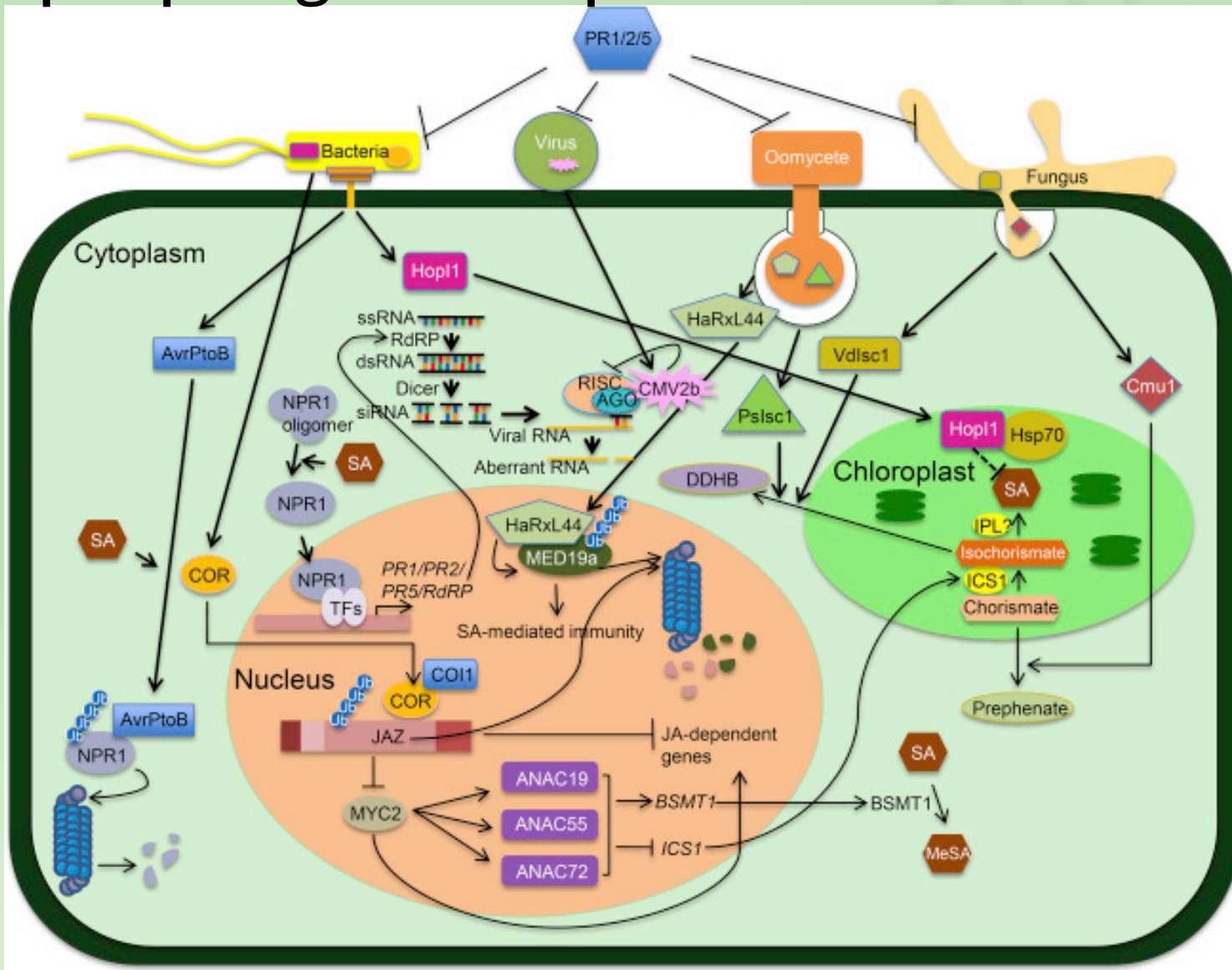


Interrupção da biossíntese e sinalização do ácido salicílico (SA) por patógenos de plantas



1. Após a infecção do patógeno, altos níveis de SA são produzidos no cloroplasto pela via ICS1 (síntese de isocorismato 1): corismato é convertido em isocorismato
2. SA é presumivelmente feito a partir de isochorismato por IPL (isochorismato piruvato-liase).
3. Um alto nível de SA facilita a redução de proteínas oligoméricas NPR1 em monômeros, que entram no núcleo e interagem com fatores de transcrição para facilitar a expressão dos genes PR (relacionados à patogênese) e RdRP (RNA polimerases dependentes de RNA).
4. As proteínas PR PR1, PR2 e PR5 contribuem especificamente para a defesa da planta contra patógenos biotróficos e semibiotróficos.
5. RdRPs sintetizam RNAs de fita dupla (dsRNAs) que são clivados pela enzima Dicer para produzir pequenos RNAs interferentes (siRNAs), que são então montados no complexo de proteína RISC contendo AGO (Argonaute) e guiam o complexo para alvos de RNA viral

Interrupção da biossíntese e sinalização do ácido salicílico (SA) por patógenos de plantas



6. O fungo fitopatológico *Verticillium dahlia* e o patógeno oomiceto *Phytophthora sojae* liberam os efetores de ISC (**isochorismatase**) **VdIscl1** e **PsIscl1**, respectivamente, nas células vegetais; esses efetores diminuem os níveis de SA por meio da hidrólise direta do isocorismato.

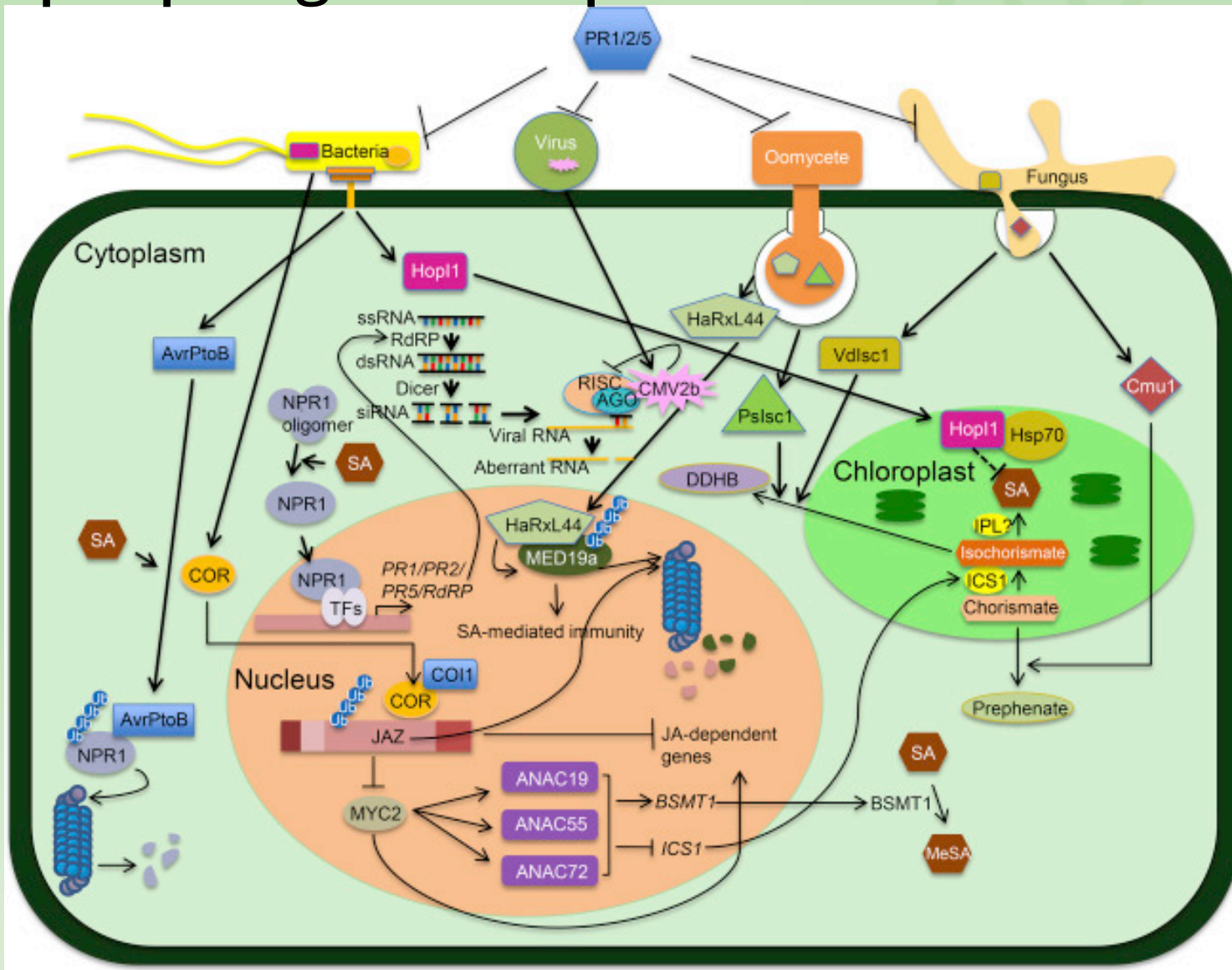
7. O **Cmu1**, que é secretado por *Ustilago maydis*, funciona como uma mutase de corismato que degrada o corismato em pré-fenato para inibir a biossíntese de SA.

8. O efector **Hop11** de *Pseudomonas syringae* tipo III está localizado no cloroplasto. Hop11 interage com Hsp70 e recruta Hsp70 citoplasmática para o cloroplasto para inibir o acúmulo de SA.

9. O efector de míldio localizado nuclearmente **HaRxL44** interage com e degrada a subunidade do mediador 19a através do proteassoma 26S para suprimir a defesa da planta mediada por SA.

10. O efector viral **CMV2b** suprime o silenciamento do gene induzido por SA ao interagir com AGO1 e AGO4 e inibir suas atividades de clivagem no complexo proteico RISC.

Interrupção da biossíntese e sinalização do ácido salicílico (SA) por patógenos de plantas



11. O patógeno bacteriano de plantas *P. syringae* pv tomate produz a toxina coronatina (**COR**), que imita o hormônio vegetal JA, a fim de promover a abertura estomática e os sintomas da doença.

12. COR facilita a interação de COI1 e JAZ, e essa interação leva à degradação de JAZ e ativação do fator de transcrição **MYC2**.

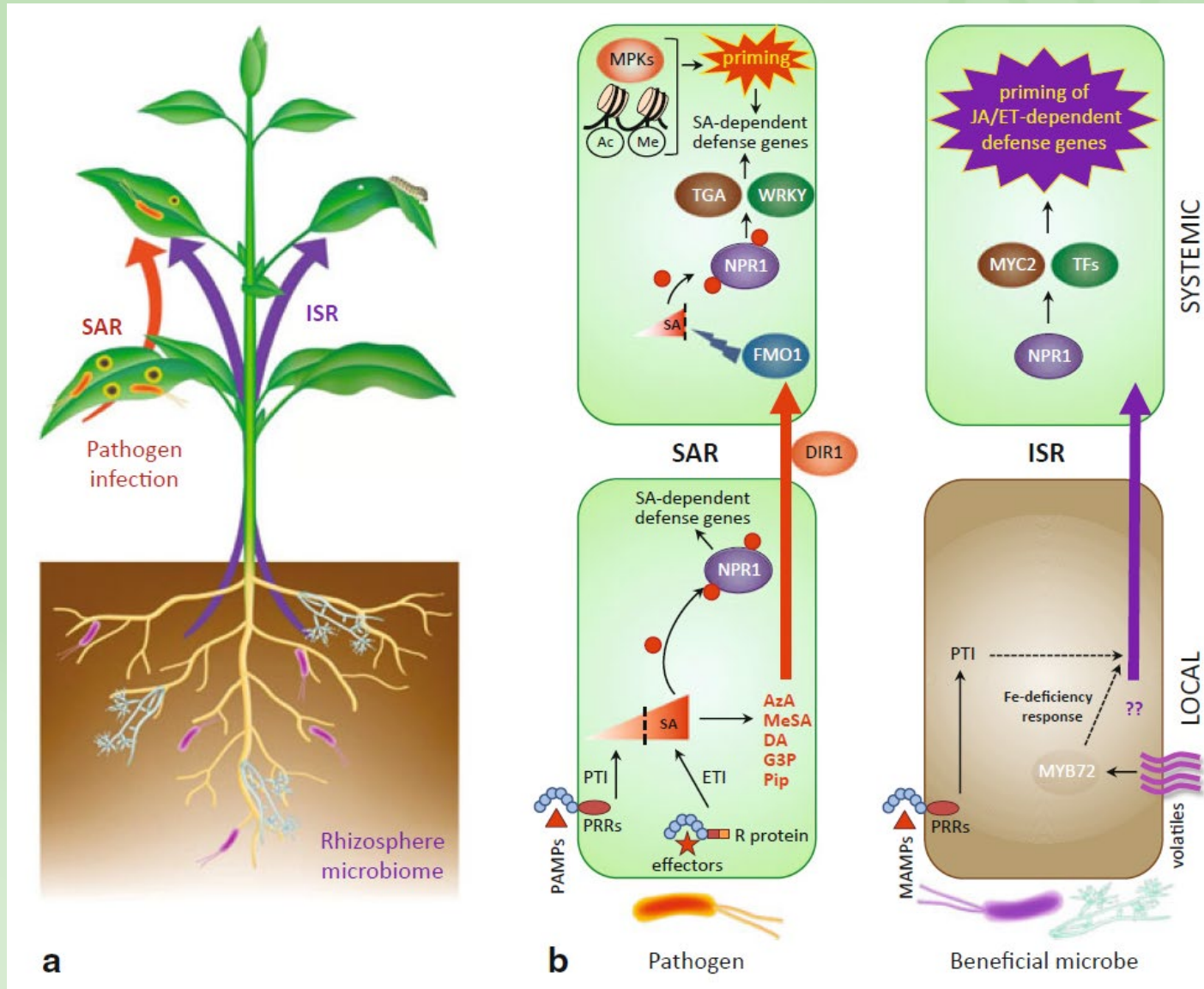
As proteínas JAZ são consideradas como o interruptor liga / desliga para a via JA (Lorenzo e Solano, 2005, Pieterse et al., 2012). Na ausência de estresse, há ausência de JA na planta, o que permite que as proteínas JAZ se liguem e inibam o MYC2 TF; no entanto, quando as plantas sofrem estresse de patógenos necrotróficos, herbívoros ou parasitas, o nível de JA aumenta em resposta.

13. MYC2 subsequentemente ativa **ANAC019**, **ANAC055** e **ANAC072**, que por sua vez reprimem a expressão de **ICS1** e ativam a expressão de **BSMT1** para inibir o acúmulo de SA.

Estratégias para indução de resistência

- Genes candidatos:
 - Efetores
 - Hipervariável, hipermutável, às vezes pouco efeito se individual
 - Enzimas diversas
 - β -1,3-glucan synthase (parede celular de fungos)
 - Urease (metabolismo)
 - Chorismate mutase 1

Resistência sistêmica: Pathogen-Induced Systemic Acquired Resistance (SAR) x Induced Systemic Resistance (ISR) por microrganismos benéficos (Promotores de crescimento)



PAMPs (PTI) e Efetores (ETI) → SAR systemic acquired resistance:

↑ Salicylic acid (SA)

Proteínas NONEXPRESSOR OF *PR* GENES1 (NPR1)- fator transcrricional:

↑ *PATHOGENESIS-RELATED* (PR) genes

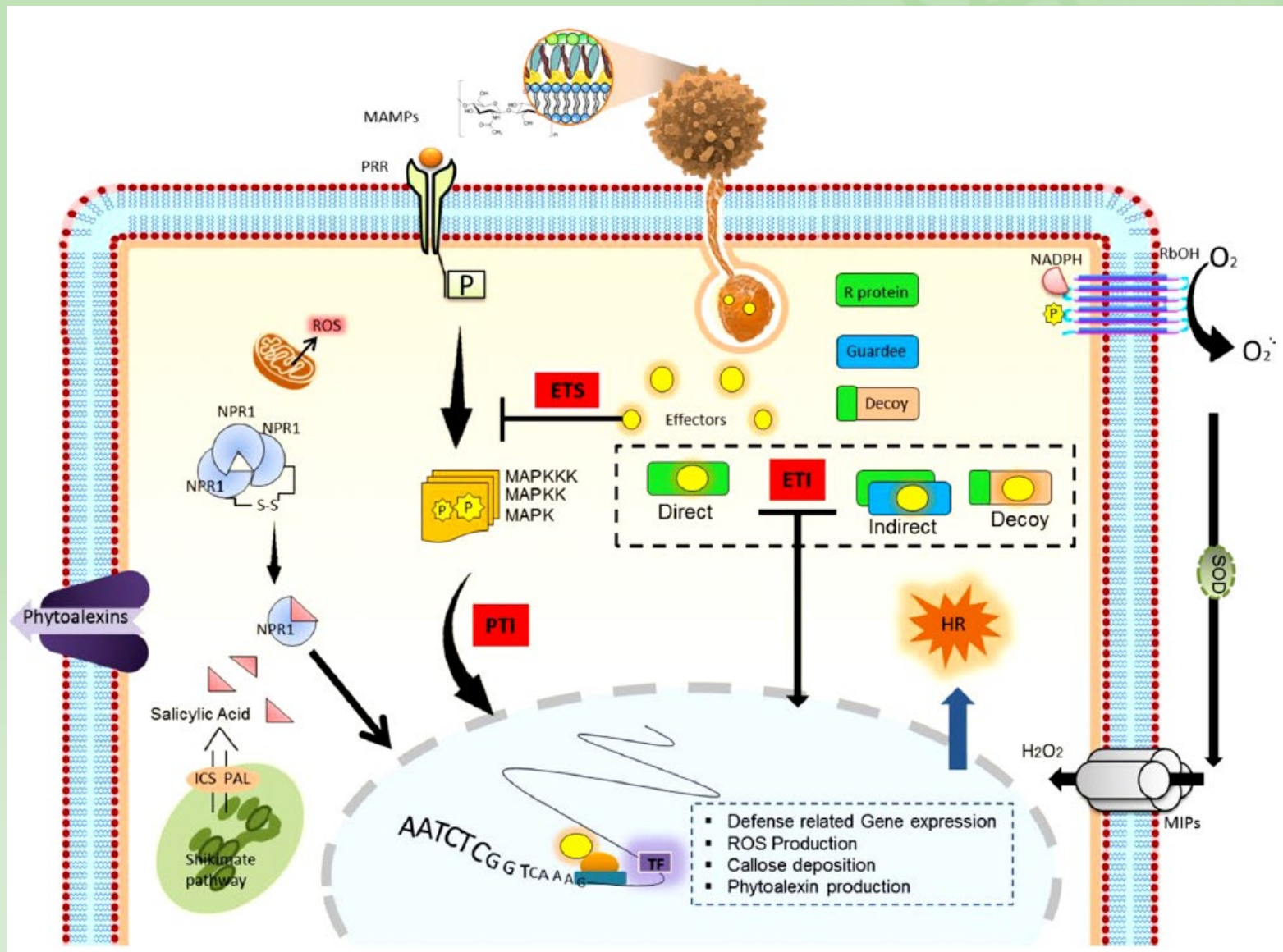
MAMPs, lipopolysaccharideos (LPS), antibioticos, Sideroforos e voláteis

ISR induced systemic resistance

JA e ET → genes de defesa

Ac acetylation,
 ET ethylene,
 ETI effector-triggered immunity,
 Fe iron,
 ISR induced systemic resistance,
 JA jasmonic acid,
 MAMP microbe-associated molecular pattern,
 Me methylation,
 PAMP pathogen-associated molecular pattern, PRR pattern-recognition receptor,
 PTI PAMP-triggered immunity,
 R protein Resistance protein,
 SA salicylic acid,
 SAR systemic acquired resistance,
 TF transcription factor
PATHOGENESIS-RELATED (PR) genes

Comunicação entre o sistema imunológico da planta hospedeira, efetores de fungos e proteínas de virulência



Resposta da planta: produção de compostos antimicrobianos: proteinases, quitinases e glucanases que danificam as estruturas do patógeno; inibidores de enzimas direcionados a moléculas produzidas pelo patógeno; e moléculas antimicrobianas não proteicas

Troca de sRNA entre o hospedeiro e os patógenos fúngicos durante o processo de infecção

