



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Coffea canephora* CONILON A *Meloidogyne* spp.:

MECANISMOS E GENES CANDIDATOS

EDRIANA ARAÚJO DE LIMA

BRASÍLIA – DF

MARÇO/2015



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Coffea canephora* CONILON A *Meloidogyne* spp.:
MECANISMOS E GENES CANDIDATOS**

EDRIANA ARAÚJO DE LIMA

BRASÍLIA – DF

MARÇO/2015

EDRIANA ARAÚJO DE LIMA

**RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Coffea canephora* CONILON A *Meloidogyne*
spp.: MECANISMOS E GENES CANDIDATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

Orientador: Dr. Cleber Furlanetto

Coorientadora: Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro

Tese de Doutorado realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Dr. Cleber Furlanetto e coorientação da Dra. Regina M.D.G. Carneiro. Apoio institucional da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**RESISTÊNCIA MÚLTIPLA DE *Coffea canephora* CONILON A *Meloidogyne*
spp.: MECANISMOS E GENES CANDIDATOS**

EDRIANA ARAÚJO DE LIMA

Tese aprovada em 26/03/2015 por:

**Dr. Pierre Marraccini
(Examinador externo)**

**Dr. Marc Giband
(Examinador externo)**

**Prof. Marcelo Fagioli
(Examinador)**

**Prof. Juvenil Enrique Cares
(Examinador)**

**Prof. Cleber Furlanetto
Orientador (Presidente)**

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2015**

Dedico o meu Doutorado e esta Tese ao meu
filho, meu grande amor, Leonardo.

Well those drifter's days are past me now

I've got so much more to think about

Deadlines and commitments

What to leave in, what to leave out

Against the wind

I'm still runnin' against the wind

I'm older now but still runnin' against the wind

(Bob Seger)

*Tú mereces lo mejor de lo mejor, porque
tú eres una de esas pocas personas que, en este
miserable mundo, siguen siendo honestas consigo
mismas, y esa es la única cosa que realmente
cuenta.*

(Frida Khalo)

Agradecimentos

Ninguém faz nada sozinho nesse mundo. Eu agradeço, de todo o coração, primeiramente a **Deus**, que sempre cuidou de mim, me amparou nos momentos de angústia e me deu dias maravilhosos.

Agradeço à minha família: meu filho **Léo**, minha **mãe**, meu **pai** (que é o meu anjo da guarda), meus **irmãos**, **sobrinhos**, ao **Daniel**, por todo apoio, carinho e amor que vocês me deram durante o doutorado, sem contar durante a minha vida toda. Vocês são meus amores e é por vocês que eu me inspiro e sigo sempre em frente. Vocês são a minha vida.

Agradeço imensamente ao **Lucas** que me ajudou muito nesta tese, foi meus olhos, quando os meus já estavam cansados demais para ler e reler, foi minhas mãos, quando eu precisei colocar no computador as figuras, me ajudou com todas elas. Você foi o apoio logístico. Minha tese é um pouquinho tua também.

Obrigada à Doutora **Regina Carneiro** por ter me ensinado, orientado, apoiado, escutado, e por fazer parte, hoje e sempre, de minha vida acadêmica. Sou grata ao Doutor **Cléber Furlanetto** por toda ajuda dada no Departamento de Fitopatologia e pelas palavras de apoio.

Agradeço também ao Doutor **Alan Andrade** pela orientação, pelos ensinamentos, apoio e por ter me recebido em seu laboratório ainda que eu não tivesse experiência prévia, à época, em biologia molecular. **Você também é coorientador deste trabalho**. Sou muito abençoada por ter trabalhado com profissionais que só me acrescentaram, me desafiaram e fizeram com que eu crescesse como pessoa em todas as esferas de minha vida.

Agradeço pelos ensinamentos - ao Doutor **Pierre Marraccini**, que muitas vezes sentou comigo e me explicou sobre a tese com a maior paciência; a **Ana Cristina**, que me orientou e me ensinou sobre Microscopia; a **Fernanda Carneiro**, que me recebeu no laboratório e me orientou sobre extração e outros procedimentos relacionados com o maior respeito e carinho;

e a **Michelle Cotta**, que me deu várias aulas sobre genômica, bioinformática e discutiu artigos comigo. Aprendi muito com vocês.

Meus agradecimentos a **Vanessa Mattos** por toda ajuda e por ter me aguentado nesses quatro anos sem nunca ter reclamado. Muito obrigada também a toda equipe do **Laboratório de Nematologia** pela grande assistência: **Marina Carneiro, Mariana Sousa, Aldemiro Jorge Júnior, Rita, Fábio de Souza, Valdir Correa e Marcilene**; e do **Laboratório de Genética Molecular: Érica Cristina, Tatiana Santos Costa e Sinara Aquino, Karoline Duarte** por nossas discussões sobre artigos e pelos ensinamentos e debates e ajuda na hora da extração de RNA.

Obrigada a toda equipe da **Embrapa-Cenargen e Departamento de Fitopatologia** pelo apoio total, especialmente a **Ribamar Frazão**, nosso querido secretário. Agradeço à Equipe do **INCAPER** pelo envio das mudas. Agradeço também à **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio estrutural e financeiro à pesquisa.

Finalmente, agradeço aos meus amigos, **Anna Cristina, José Cardoso e Ligia Olviedo**, pela força e por me aturar. Vocês são irmãos.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
Introdução.....	5
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica.....	10
1.1. O gênero <i>Coffea</i> e <i>C. canephora</i>	10
1.2. O gênero <i>Meloidogyne</i>	16
1.3. Resistência genética como método de controle de <i>Meloidogyne</i> spp. em cafeeiro	24
1.4. Conceito de resistência e aspectos relacionados à interação planta-nematoide	28
1.5. Interação planta-patógeno incompatível: aspectos gerais	32
Capítulo 2 – Resistência genética de genótipos de cafeeiro <i>C. canephora</i> Conilon a <i>Meloidogyne</i> spp.	42
2.1. Introdução.....	42
2.2. Objetivos	43
2.3. Material e Métodos.....	44
2.3.1. Clones de <i>C. canephora</i> usados nos ensaios de seleção para a resistência a <i>Meloidogyne</i> spp.	44
2.3.2. Populações de <i>Meloidogyne</i> spp.	44
2.3.3. Inoculação	45
2.3.4. Avaliação da resistência aos nematoides em condições controladas	46
2.3.5. Ensaio para avaliar presença de <i>Meloidogyne</i> no solo.....	47
2.4. Resultados	48
2.5. Discussão.....	55
2.6. Conclusões	61
2.7. Perspectiva	61
Capítulo 3 – Histopatologia comparada de <i>Coffea canephora</i> , clones 14 (resistente) e 22 (suscetível) infectados com <i>Meloidogyne</i> spp.....	62
3.1. Introdução.....	62
3.2. Objetivos	64
3.3. Material e métodos	64
3.4. Resultados	65
3.5. Discussão.....	70
3.6. Conclusões	75

Capítulo 4 – Identificação de genes candidatos associados à resistência do clone 14 de <i>C. canephora</i> a <i>Meloidogyne paranaensis</i>	76
4.1. Introdução.....	76
4.2. Objetivos	78
4.3. Material e Métodos.....	78
4.3.1. Material vegetal e espécie de <i>Meloidogyne</i>	78
4.3.2. Extração de RNA de raízes de cafeeiro.....	79
4.3.3. Tratamento dos RNAs com DNase para sequenciamento e qPCR.....	80
4.3.4. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	82
4.3.5. Bioinformática.....	84
4.4. Resultados	85
4.4.1. Estudo da expressão genica por RNAseq.....	85
4.4.2. Validação da expressão dos genes candidatos pré-identificados por meio de qPCR...	102
4.5. Discussão.....	105
4.6. Conclusões	112
REFERÊNCIAS	113
Apêndice I. Gráficos da Expressão dos genes (FI e Q) por Cromossomo.	148

Lista de Figuras

Figura 0.1. Evolução da produção brasileira de café beneficiado (CONAB, 2015). Legenda: (*) Ponto médio.....	6
Figura 1.1. Classificação taxonômica de <i>Coffea canephora</i> (Ferrão <i>et al.</i> , 2010).....	11
Figura 1.2. Origem geográfica dos principais grupos genéticos de <i>Coffea canephora</i> . O grupo formado por cafeeiros selvagens de Angola (indeterminado) ainda está em estudo (modificado de Montagnon <i>et al.</i> , 2012).	13
Figura 1.3. Posição taxonômica do Gênero <i>Meloidogyne</i> Goeldi 1887, de acordo com Siddiqi (2000).	17
Figura 1.4. Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp. (Fonte: Agrios, 1997 com modificações)....	18
Figura 1.5. SCAR-PCR Individual (A) e multiplex (B) para identificação das espécies de <i>Meloidogyne</i> que infectam o cafeeiro (Correa <i>et al.</i> , 2013).....	24
Figura 1.6. Estrutura do domínio NBS-LRR de diferentes proteínas R entre eles a codificada pelo gene <i>Mi</i> de tomateiro (McHale <i>et al.</i> , 2006).	34
Figura 1.7. Eventos bioquímicos que ocorrem dentro e ao redor da célula infectada por fitonematoides (modificado de Medeiros <i>et al.</i> , 2003).	41
Figura 3.1. Seções de raízes do clone 22 de <i>Coffea canephora</i> Conilon (controle suscetível) infectadas com <i>Meloidogyne paranaensis</i> . (a) coloração com fucsina ácida: nematoides do segundo estágio juvenil (J2) localizados no córtex da raiz dois dias após a inoculação (DAI). b-f: coloração com azul de toluidina; (b) localização intercelular de um J2 no cilindro central; (c) J2/J3 ao lado de células gigantes no cilindro central; (d, e, f) J4 ou fêmeas ao lado de células gigantes que exibem citoplasma denso, vacúolos e paredes celulares bem demarcadas. N = nematoide, gc = células gigantes, co = córtex, vc = cilindro vascular.....	66
Figura 3.2. Seções de raízes do clone 14 (resistente) de <i>Coffea canephora</i> Conilon infectadas com <i>Meloidogyne paranaensis</i> . a, c, d, e, g: coloração com azul de toluidina; b, f, h: fluorescência com incitação UV. (a, b) J2 localizado no córtex da raiz e rodeado por células degradadas coradas em azul claro (a) e que apresentam uma fluorescência acinzentada sob iluminação UV (b); (c, d, e, f, g, h): nematoides no cilindro vascular; células gigantes podem ser observadas 8 DAI associadas com a presença de nematoides (c) . A fluorescência azul-cinza é vista em células próximas do nematoide e em paredes dos vasos (f, h); As células (d, e, g, h) do parênquima ao lado dos nematoides e células gigantes exibem um material manchado-escuro que sugere alteração grave do citoplasma; (e, g) células gigantes mostram citoplasma retraído e às vezes numerosos vacúolos. N = nematoide, RH = reação de	

hipersensibilidade indicando morte celular (cd), co = córtex, gc = células gigantes, vc = cilindro vascular, va = vacúolo. Seções visualizados sob luz UV (b, f, h) e, após coloração com fucsina ácida (a, c, d, g).....	67
Figura 4.1. A-B) Gel virtual criado pelo Bioanalyzer após análise da qualidade das amostras de RNA extraídas enviadas para sequenciamento e usadas nos ensaios de qPCR. C) As amostras que não foram lidas pelo programa Bioanalyzer.	81
Figura 4.2. Ferramentas da plataforma “Coffee Genome HUB” (www.coffee-genome.org) utilizadas para análises dos dados obtidos <i>in silico</i> a partir de RNA de raízes inoculadas e não inoculadas com <i>M. paranaensis</i> . A) Genome Browser; B) Blast; e C) Análise da Expressão Diferencial.....	85
Figura 4.3. Dispersão dos genes de resistência (verde) nos clones 14 e 22 de <i>C. canephora</i> , em condições não inoculada (controle) e inoculado com <i>M. paranaensis</i>	87
Figura 4.4. Expressão global dos genes de <i>C. canephora</i> nos clones 14 e 22, nas condições controle e inoculado com <i>M. paranaensis</i> em diferentes dias após a inoculação (DAI). Tanto no diagrama quanto no gráfico é possível observar o declínio na expressão global de genes aos 8 DAI (clone 14 inoculado) e 20 DAI (clone 22 inoculado).	88
Figura 4.5. Genes de resistência que mais se destacaram antes (QC) e após a infecção por <i>M. paranaensis</i> , quanto ao Q (A) e o FI (B) em diferentes tempos. A escala de tempo em dias após a inoculação (DAI) e representada abaixo de cada gráfico. Os genes que estão acima da barra do gráfico tiveram sua expressão aumentada em relação ao tempo zero (QC) e o que se encontra abaixo da barra a expressão diminuiu. O número entre parênteses que acompanha cada gene representa o valor da expressão.....	99
Figura 4.6. Proteínas putativas relacionadas aos genes que mais se destacaram quanto ao Q (A) e o FI (B), em diferentes tempos, após a infecção por <i>M. paranaensis</i> . O número entre parênteses que acompanha cada proteína putativa representa o valor da expressão do gene que a codifica.	101
Figura 4.7. <i>Primers</i> testados (nome em negrito e itálico acima de cada gráfico) em ensaios de qPCR de cDNA de raízes dos clones 14 e 22 infectadas e não infectadas por <i>M. paranaensis</i> . O eixo x corresponde às amostras testadas e o eixo y, ao valor de expressão.....	103
Figura 4.8. Expressão dos genes candidatos à resistência em diferentes órgãos de <i>C. canephora</i> . Dados obtidos por meio do Coffee Genome Hub (coffee-genome.org) onde se encontram os resultados do sequenciamento total de <i>Coffea canephora</i> (Denoeud <i>et al.</i> , 2015).....	105

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Exemplos citados no presente trabalho de acessos/cultivares de <i>C. arabica</i> identificadas pela resistência a <i>Meloidogyne</i> spp. Todos os cafeeiros apresentados são resultados do melhoramento por meio de cruzamento com <i>C. canephora</i> ou <i>C. liberica</i>	29
Tabela 2.1. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne paranaensis</i> sob condições controladas.	49
Tabela 2.2. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i> raças 1 e 3 sob condições controladas.	50
Tabela 2.3. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com populações virulentas e avirulentas de <i>Meloidogyne exigua</i> sob condições controladas.	51
Tabela 2.4. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne paranaensis</i> sob condições controladas.	52
Tabela 2.5. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i> raças 1 e 3 sob condições controladas.	53
Tabela 2.6. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com populações virulentas e avirulentas de <i>Meloidogyne exigua</i> sob condições controladas.	54
Tabela 2.7. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i> raça 3 e <i>M. paranaensis</i> sob condições controladas.	54
Tabela 2.8. Reação de genótipos de cafeeiro, oito meses após inoculação com <i>Meloidogyne arabicida</i> sob condições controladas.	56
Tabela 2.9. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com <i>M. incognita</i> em condições controladas.	56
Tabela 4.1. <i>Primers</i> testados no ensaio de PCR em Tempo Real (Vieira, 2012; Lepelley <i>et al.</i> , 2012).	83
Tabela 4.2. Bibliotecas geradas e número total de <i>reads</i> produzidos por meio do sequenciamento por Illumina (HiSeq 2000) de raízes dos clones 14 e 22 de <i>Coffea canephora</i> inoculadas (I) e não inoculadas (C) com <i>Meloidogyne paranaensis</i> . Não foi obtido o número de <i>reads</i> referente ao nematoide presente nas raízes infectadas.	86
Tabela 4.3. QC = 14C/22C – genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle.	89
Tabela 4.4. QC = 14C/22C – genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle (somente genes de resistência a patógenos).	90

Tabela 4.5. FI = 14I/14C – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com <i>Meloidogyne paranaensis</i> em relação ao ‘Clone 14’ controle.	92
Tabela 4.6. FI = 14I/14C– genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com <i>Meloidogyne paranaensis</i> em relação ao ‘Clone 14’ controle (somente genes de resistência a patógenos).	93
Tabela 4.7. Relação $Q = FI_{14}/FI_{22}$ – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’	94
Tabela 4.8. Relação $Q = FI_{14}/FI_{22}$ – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’ (somente genes de resistência a patógenos).....	96
Tabela 4.9. Genes candidatos à resistência a <i>M. paranaensis</i> que se destacaram quanto ao Q e FI do clone 14 e a expressão basal dos mesmos nas raízes de <i>C. canephora</i> e <i>Coffea</i> encontrada em coffe-genome.org. Todos esses genes não tiveram alto valor de QC.	104

RESUMO

O cafeeiro é uma das culturas mais importantes para o Brasil, sendo fonte de divisas para os países tropicais produtores. Das mais de 90 espécies do gênero *Coffea*, *C. arabica* e *C. canephora* são as espécies cultivadas comercialmente. Os grãos de *C. arabica* são mais consumidos e apreciados no mundo, mas *C. canephora* possui uma parte importante do mercado no que se refere à produção de café solúvel e *blends* com *C. arabica*, além de ser fonte de resistência a patógenos como os nematoides das galhas. Espécies do gênero *Meloidogyne* constituem um dos mais importantes fitopatógenos por sua polifagia, causando danos e perdas consideráveis em culturas importantes, como o cafeeiro. Cultivares de *C. canephora* têm sido usadas como porta enxertos para *C. arabica* e, programas de melhoramento vem produzindo plantas que podem ser promissoras no controle desse patógeno. No entanto, até o presente momento, esses genótipos foram resistentes a uma ou duas espécies de *Meloidogyne*. Os objetivos desse trabalho foram: buscar fontes de resistência às populações de *Meloidogyne* em clones de *C. canephora* desenvolvidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (INCAPER); observar os possíveis mecanismos de resistência envolvidos e também quais genes poderiam ser candidatos à resistência. No primeiro instante, clones de *C. canephora* população Conilon foram avaliados quanto à resistência a seis populações de *Meloidogyne*. Nesse primeiro ensaio, descobriu-se que o clone 14, já previamente avaliado como tolerante a seca, foi resistente a todas as populações testadas do patógeno. Por meio de histopatologia, observou-se no clone 14 inoculado com *M. paranaensis* e *M. incognita*, através da histopatologia, morte celular e reação de hipersensibilidade tanto no período inicial de infecção do patógeno, quanto nos dias finais da observação, nas células ao redor dos poucos nematoides que conseguiram iniciar o sítio de alimentação. Não houve desenvolvimento do nematoide nem produção de ovos observados através da microscopia e a penetração dos juvenis também foi sensivelmente menor no clone

14 resistente quando comparado aos cafeeiros suscetíveis. Não houve diferença na reação de resistência da planta entre as duas espécies/populações de nematoides das galhas usadas no estudo da histopatologia. Raízes do clone 14 e do padrão de suscetibilidade clone 22, foram inoculadas com *M. paranaensis* e retiradas nos mesmos moldes do ensaio de histopatologia, para a extração de RNA e produção de cDNA para serem utilizados no sequenciamento e qPCR, respectivamente. Foi observada diferença na expressão de genes de resistência, genes relacionados à produção de lignina, cisteína protease e inibidor de cisteína protease e *no hits*, dentre outros, entre os clones resistente e suscetível. No caso da cisteína protease e *lignina-forming*, a expressão foi 3.000 e 6.000 vezes maior no clone resistente que no clone suscetível a *M. paranaensis* nos dias finais do ciclo do nematoide, coincidindo com o período de intensa morte celular e reação de hipersensibilidade na raiz do clone 14. Os resultados demonstraram que o clone 14 pode ser importante fonte de genes relacionados com a resistência à *Meloidogyne* spp. e que esses genes devem ser estudados mais profundamente no futuro a fim de obter maior conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência aos nematoides das galhas e os possíveis pontos de intersecção entre os estresses bióticos e abióticos.

Palavras-chave: cafeeiro, Conilon, genes candidatos, histopatologia, *Meloidogyne*, qPCR, resistência, reação de hipersensibilidade.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important crops in Brazil and worldwide, a source of income for tropical countries that produce it. Among more than 90 species of the genus *Coffea*, *C. arabica* and *C. canephora* are the only commercially cultivated ones. *Coffea arabica* grains are more appreciated and consumed worldwide, but *C. canephora* has an important share of the market regarding soluble coffee and *C. arabica* blends production. It is also a source of resistance to coffee pathogens, such as root-knot nematodes. *Meloidogyne* species are some of the most important phytopathogens, due to their polyphagic habits, and cause considerable damage and loss in several major crops alongside coffee. *Coffea canephora* cultivars have been used as rootstocks for *C. arabica* and breeding programs have produced promising plants to control these pathogens. However, to date, these genotypes were resistant to only one or two species of *Meloidogyne*. The goals of the present study were to search for sources of resistance to *Meloidogyne* populations in *C. canephora* clones developed by the “Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural” (INCAPER) and observe possible resistance mechanisms involved in and which genes could be candidates to resistance. Initially, clones of *C. canephora*, Conilon population, were evaluated for resistance and susceptibility to six *Meloidogyne* populations. In this first experiment, it was found that clone 14, previously reported as drought tolerant, was resistant to all six tested pathogen populations. Histopathology studies in roots of clone 14 plants, inoculated with *M. incognita* and *M. paranaensis*, evidenced cell death and hypersensitivity reactions, both during initial and final days of infection, in cells around the few nematodes that induced feeding sites. Microscopy showed no nematode development or production of eggs, and penetration of juveniles was also significantly lower in the resistant clone 14 when compared to susceptible trees. There was no significant difference in the plant resistance reaction observed between the two *Meloidogyne* species used in histopathology studies. Roots of clone 14 and of the pattern of

susceptibility, clone 22, were inoculated with *M. paranaensis* and collected, as in the histopathology assay, for RNA extraction (sequencing) and production of cDNA (qPCR). Differences were observed between both clones in the expression of genes related to resistance and lignin production, cysteine proteases, cysteine protease inhibitors and *no hits*, among others. Gene overexpression went 3.000 and 6.000 times higher for cysteine proteases and lignin formation, respectively, in resistant clones when compared to the susceptible ones when inoculated with *M. paranaensis*, in the final days of the nematode life cycle. It was coincident with intense cell death and hypersensitivity reaction periods observed in roots of clone 14 plants. Results show that clone 14 may be an important source of genes related to resistance to *Meloidogyne* spp. and those should be further studied to understand more accurately the molecular mechanisms involved in resistance to root-knot nematodes and possible points of intersection between biotic and abiotic stresses.

Keywords: coffee, Conilon, candidates genes, hypersensitivity reaction, histopathology, qPCR, *Meloidogyne*, resistance.

Introdução

O café é uma das culturas mais importantes no Brasil, gerando empregos diretos e indiretos para milhares de pessoas e divisas para os países produtores (Fassio & Silva, 2010). No Brasil, sua importância não se restringe somente a ser uma das bases de nossa economia, mas também à grande importância histórica, política e cultural que ela tem, mesmo com os altos e baixos que acompanharam a sua produção desde que aqui foi introduzida no século XVIII para, posteriormente, se expandir para áreas mais apropriadas para o seu desenvolvimento, como o Rio de Janeiro, seguido do Vale do Paraíba, em São Paulo e Minas Gerais (IBC, 1986; Rufino, 2006; Chalfoun & Reis, 2010).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de café, sendo responsável por cerca de 30% do mercado internacional, totalizando 50.826.000 sacas produzidas (Chalfoun & Reis, 2010; ICO, 2013). No Brasil são cultivadas as espécies de cafeeiro mais exploradas economicamente no mundo: *Coffea arabica* L, correspondente a 75,1% da produção nacional, é cultivada nos Estados de Minas Gerais, (maior produtor nacional), São Paulo, Paraná, Bahia, Espírito Santo, Goiás e Rio de Janeiro; e *C. canephora* Pierre ex Froehner, produzida nos Estados do Espírito Santo, Rondônia, Bahia, Mato Grosso e Pará (24,9% da produção).

Em janeiro de 2014, estimou-se entre 11,46 e 12,62 milhões de sacas a produção de *C. canephora* Conilon no Brasil, o que representa um crescimento entre 5,46% e 16,15% em relação ao ano anterior (CONAB, 2014). Estima-se que tenha havido, no entanto, uma redução entre 8,8 e 6,3% no número de sacas em 2015, devido à estiagem que ocorreu na safra anterior e atual no estado do Espírito Santo (CONAB, 2015). No volume total de café produzido no Brasil, esta redução representa estabilização da produção nos últimos dois anos (Figura 0.1).

As espécies de cafeeiro *C. arabica* e *C. canephora* diferem entre si sob muitos aspectos. *Coffea arabica* é originária da região montanhosa de clima ameno da Etiópia, através do

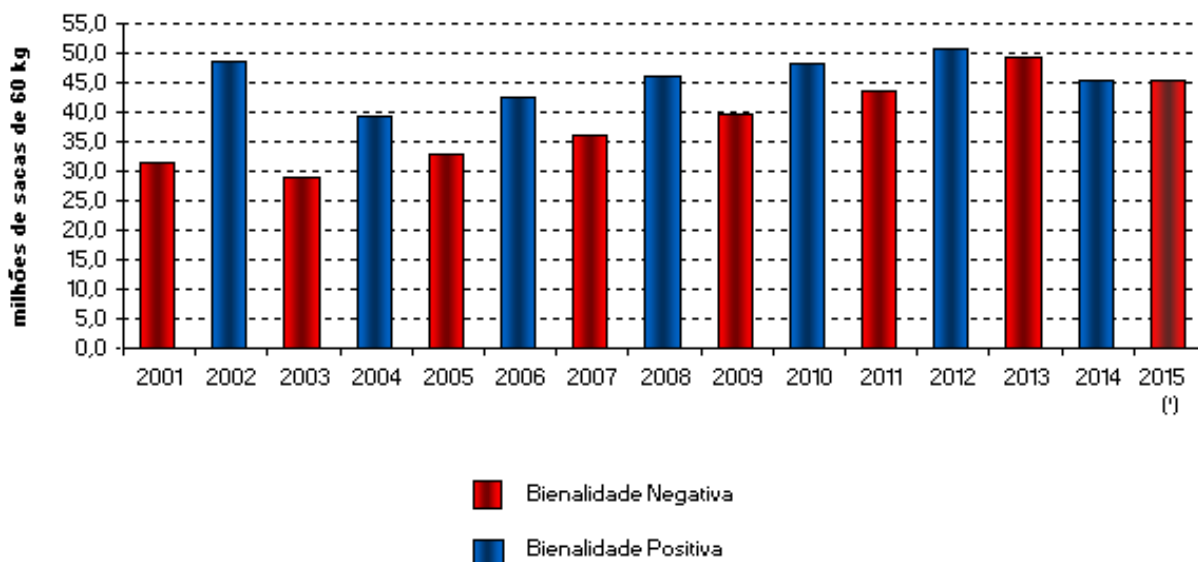


Figura 0.1. Evolução da produção brasileira de café beneficiado (CONAB, 2015). Legenda: (*) Ponto médio.

cruzamento natural e recente de duas espécies de rubiáceas desse gênero, *C. eugenioides* S. Moore (2n) e *C. canephora* (2n) (Lashermes *et al.*, 1999, 2008). Esse cruzamento originou uma espécie tetraploide (4n) que se reproduz através de autofecundação. Com isto, o cafeeiro Arábica possui variabilidade genética restrita, com mudas produzidas por meio de sementes e que também apresentam certa homogeneidade, o que permite a manutenção das características genéticas desejáveis economicamente, mas que tornam essa espécie suscetível a pragas e doenças (Ferrão *et al.*, 2010).

O cafeeiro da espécie *C. canephora*, também inicialmente conhecido como café Robusta, é diploide e de fecundação cruzada. É considerado um café menos apreciado que o café Arábica, por apresentar características como alto teor de cafeína (1,5-2,8% por peso seco do grão), que o torna mais duro ao paladar, além de alto teor de sólidos solúveis (Leroy *et al.*, 2006). Assim sendo, essa espécie, possui maior variabilidade genética que o cafeeiro Arábica, sendo que suas mudas são variedades clonais de vários indivíduos selecionados pela superioridade em determinadas características agrônômicas, tais como resistência a patógenos como *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, causador da ferrugem do cafeeiro, *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, causador da *Coffee Berry Disease* e nematoides do gênero

Meloidogyne Goeldi, 1887 (Lashermes *et al.*, 2008). Dessa maneira, o café *C. canephora* possui uma fatia do mercado por ser usado na produção de café solúvel e nos *blends* com café arábica, para adicionar mais corpo ao chamado café expresso, e pode ser também fonte importante para de resistência a pragas e doenças (Chalfoun & Reis, 2010).

Dentre os fatores bióticos limitantes ao crescimento e produção do cafeeiro, destacam-se principalmente os fitonematoides, cuja importância econômica é determinada pela sua patogenicidade, pela extensão dos danos e prejuízos ao cafeeiro, pelas perdas econômicas ao agronegócio do café, além da facilidade de disseminação e adaptação do patógeno a diversas regiões (Salgado & Rezende, 2010). Dentre os nematoides fitoparasitas que afetam o cafeeiro no Brasil, os formadores de galhas, *Meloidogyne* spp., constituem o grupo mais importante devido à ampla distribuição geográfica, à polifagia (capacidade do organismo de parasitar e se multiplicar em um grande número de plantas de diferentes famílias botânicas), à diferença biológica ligada ao parasitismo entre populações de uma mesma espécie, à capacidade de danificar o sistema radicular do cafeeiro e à alta persistência no solo (Krzyzanowski *et al.*, 2001; Campos & Villain, 2005).

Os nematoides das galhas tem sido fator limitante na implementação de novas lavouras de cafeeiros e manejo das já existentes (Carneiro *et al.*, 1996; Campos & Villain, 2005). Esses nematoides dificultam a realização de programas de resistência varietal, que tem sido as medidas de controle mais eficientes em nossas condições ambientais. O parasitismo por *Meloidogyne* spp. pode reduzir ou mesmo acabar com a rentabilidade de varias culturas, como café, goiaba, arroz e videira, e em casos extremos causar a morte das plantas (Campos & Villain, 2005).

Em 1877, C. Jobert visitou o Brasil a fim de identificar a causa do declínio dos cafezais do Rio de Janeiro. Ele encontrou numerosos engrossamentos nas raízes, massas de ovos e juvenis de nematoides após a eclosão. Anos depois, em 1887, o zoólogo Emilio Goeldi

desenvolveu um minucioso estudo sobre as pesquisas iniciadas por Jobert, afirmando que a causa do problema era um nematoide microscópico que parasitava raízes, ao qual chamou *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1892, criando assim o gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892, tido hoje como o mais danoso de todos os nematoides fitoparasitas (Ferraz & Monteiro, 1995).

No Brasil, há poucos dados atualizados sobre perdas e danos provocados por *Meloidogyne* spp. aos cafeeiros. Otoboni & Santos (2008) relataram perdas de cerca de 24% da produção de café beneficiado cultivado em áreas infestadas com *M. incognita*, quando comparadas com áreas sem a presença desse nematoide. Barbosa *et al.* (2004a) relataram perdas por *M. exigua* de até 45%. *Meloidogyne exigua* foi encontrada em 70% das lavouras de sete municípios do Estado do Rio de Janeiro em um levantamento feito por Barbosa *et al.* (2004b) com 190 lavouras de café, 180 de *C. arabica* e 10 de *C. canephora*. Nesse mesmo levantamento, observou-se a presença de *M. incognita* em apenas uma lavoura de *C. canephora*. Lordello *et al.* (2001) avaliaram os cafezais em 37 municípios do Estado de São Paulo e concluíram que 83,8% das amostras estavam infectadas com *Meloidogyne* spp., com 30,6% infectados com *M. incognita*, 24,2% por *M. exigua*, 4,8% por *M. paranaensis*, 1,6% infectados com *M. javanica* e 32,2% infectados com *Meloidogyne* sp. No Estado da Bahia, relatou-se maior presença de *M. exigua* nos cafezais (Souza *et al.*, 2000), assim como no Sul de Minas Gerais (Castro *et al.*, 2008) e em cafeeiros do Estado de Goiás (Silva *et al.*, 2009). Neste último estado foram identificadas também plantas infectadas com *M. paranaensis*, algo não relatado anteriormente para estes estados, o que demonstra o aumento de áreas infectadas por essa espécie de nematoide.

A maior parte das informações sobre a importância econômica dos nematoides das galhas na cultura do café é proveniente do Brasil, onde há mais de 100 anos esses parasitas têm sido relatados em áreas produtoras, causando a migração da cafeicultura para outras regiões devido aos danos causados ou substituindo o cafeeiro por outras culturas não

hospedeiras. Em muitas circunstâncias, os nematoides têm sido importante motivo para convencer o produtor a parar com o cultivo do cafeeiro. O impacto econômico de se mudar para uma nova cultura após a infestação/infecção por nematoides é considerável, em termos financeiros e socioeconômicos (Campos & Villain, 2005). Assim, as perdas causadas pelos nematoides das galhas podem ser sumarizadas como segue: I) decréscimo na produção; II) destruição de mudas em viveiros; III) desemprego em áreas tradicionais de cultivo de café; IV) inviabilização do cultivo em áreas infestadas; e V) perdas econômicas (Campos & Villain, 2005).

No que se refere ao controle de *Meloidogyne*, trata-se de um processo de difícil realização e requer cuidadosa análise de cada situação, além de uma correta identificação dos patógenos antes da definição das medidas a ser recomendadas (Juliatti & Silva, 2001; Krzyzanowski *et al.*, 2001). Assim, a busca por genótipos resistentes a várias espécies ou populações do patógeno, os estudos dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse processo e a busca de genes candidatos implicados diretamente ou indiretamente na redução/contenção do parasita são importantes para os programas de melhoramento genético do cafeeiro visando o controle de *Meloidogyne* spp.

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

1.1. O gênero *Coffea* e *C. canephora*

As espécies do gênero *Coffea* são nativas da África e Madagascar e pertencem à família Rubiaceae, compreendendo mais de 120 espécies (Hendre *et al.*, 2008; De Kochko *et al.*, 2010). Em termos gerais, são plantas dicotiledôneas, de folhas persistentes, flores hermafroditas, caule lenhoso e porte que vai do arbustivo para o arbóreo (Livramento, 2010). Das espécies do gênero *Coffea*, somente duas são utilizadas mundialmente para fins comerciais: *C. arabica*, a mais comercializada, pelas suas propriedades como sabor, aroma e teor de cafeína, que torna os seus grãos mais agradáveis ao paladar (Lashermes *et al.*, 2008; Leroy *et al.*, 2011; Cubry *et al.*, 2013a), e *C. canephora*, que é cultivado em altitudes mais baixas e em clima quente. O cafeeiro *C. canephora* é utilizado em *blends* com *C. arabica*, para dar corpo ao café expresso, na indústria de café solúvel e também nos programas de melhoramento do cafeeiro, devido à sua resistência a pragas e doenças (Bertrand *et al.*, 2003; Lashermes *et al.*, 2008).

As cultivares modernas de *C. arabica* são derivadas de duas populações, Typica e Bourbon, que por sua vez são derivadas de poucas plantas. A origem restrita, associada à autofecundação, restringe a variabilidade dessa espécie, que é atacada por numerosas pragas e doenças. Em contraste, outras espécies de *Coffea*, como *C. canephora*, *C. liberica* e *C. racemosa* apresentam resistência a patógenos importantes na cultura do cafeeiro (Bertrand & Anthony, 2008; Lashermes *et al.*, 2008). Estas espécies podem contribuir como recursos genéticos para o melhoramento de *C. arabica* tornando-o resistente a pragas e doenças, aliando qualidade comercial a características agronômicas interessantes para quem cultiva essa espécie.

Coffea canephora, também conhecido como café Robusta, tem sua origem no Congo (Montagnon, 2000) e é atualmente cultivado na África Central e Ocidental, no sudeste da Ásia

(Vietnã) e em algumas regiões da América, como o Brasil. O nome Robusta dado a essa espécie advém do fato de que se trata de uma espécie rústica e resistente a doenças (Ferrão *et al.*, 2010), e não deve ser confundido com “Robusta”, que é uma das populações de *C. canephora*, juntamente com Conilon (Berthaud, 1986). Possui ampla distribuição geográfica e se adapta bem em regiões de baixa altitude e temperaturas mais elevadas quando comparada a *C. arabica*. Trata-se de uma espécie diploide ($2n = 22$) que se multiplica por fecundação cruzada (Carvalho *et al.*, 1991) em contraste com *C. arabica* ($4n = 44$), que é uma espécie tetraploide e autógama.

Do ponto de vista morfológico, *C. canephora* se apresenta como um arbusto multicaule com folhas maiores que as de Arábica, bem onduladas e de cor verde-clara. Suas flores são autoincompatíveis, ou seja, são incapazes de formar sementes quando polinizadas por seu próprio pólen (Schifino-Wittmann & Dall’Agnol, 2002), e devido a essa característica, permitem apenas a fecundação cruzada. Seus frutos são pouco esféricos e menores quando comparados aos de *C. arabica*, com pericarpo e exocarpo mais finos, perisperma de coloração amarelada, bem aderido ao grão, e sementes de tamanho variável. O conteúdo de cafeína é superior a 2%, além de possuir alto teor de sólidos solúveis, características de grande interesse para a indústria de café solúvel (Ferrão *et al.*, 2010). A classificação taxonômica de *C. canephora* se encontra na Figura 1.1.

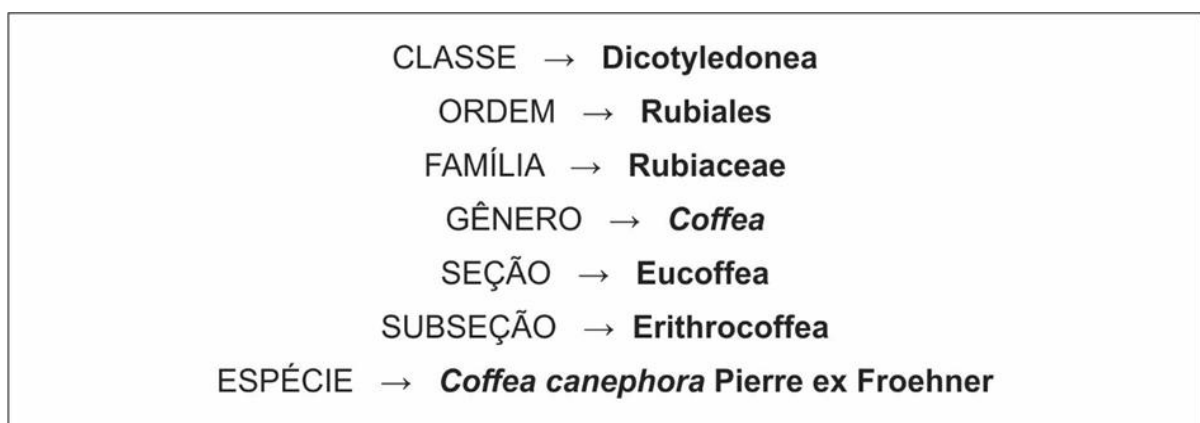


Figura 1.1. Classificação taxonômica de *Coffea canephora* (Ferrão *et al.*, 2010).

A espécie *C. canephora* possui, basicamente, dois grupos de materiais genéticos distintos, classificados como Congolense e Guineano, que foram postulados com base em marcadores enzimáticos e nas regiões geográficas de origem dos mesmos (Berthaud, 1986; Montagnon *et al.*, 1992; Leroy *et al.*, 1993; Cubry *et al.*, 2008) (Figura 1.2). O primeiro grupo inclui genótipos provenientes da costa atlântica, sul e sudeste da África Central, bacia do Rio Congo e Camarões. O grupo Guineano é originário da Guiné e Costa do Marfim. Com base em isoenzimas, dividiu-se o grupo Congolense em dois subgrupos: SG1, tolerante à seca, cujas populações se originaram na região nordeste de Camarões e sudeste do Congo; e SG2, sensível à seca, que reúne as populações oriundas do nordeste do Congo, República Centro-Africana e Camarões (Montagnon *et al.*, 1992).

Utilizando marcadores isoenzimáticos e RFLP, o grupo Guineano foi classificado como 1 (isoenzima) e D (RFLP), o grupo SG1 como 3 (isoenzima) e A (RFLP) e o grupo SG2 como 2 (isoenzima), porém subdividindo em B, C e E, de acordo com marcadores RFLP (Dussert *et al.*, 1999). Montagnon (2000) dividiu o grupo Congolês em quatro subgrupos, classificando-os como SG1, SG2, grupo B e grupo C. O cafeeiro denominado Kouillou, de onde se origina a população Conilon mais cultivada no Brasil, pertence ao grupo SG1 (Alekevetch *et al.*, 2013).

Cubry *et al.* (2008) encontraram forte relação entre os grupos B e SG2 e acessos provenientes de Uganda. Musoli *et al.* (2009) analisaram populações selvagens e cultivadas de Uganda, no centro-leste da África, onde *C. canephora* não havia sido bem estudado. As populações selvagens se mostraram diferentes das cultivadas e também dos cinco grupos conhecidos (Guineano, SG1, SG2, B e C), enquanto as populações cultivadas e provenientes de áreas abandonadas foram próximas geneticamente do grupo SG2 de Congolense. Os genótipos cultivados apresentaram poucas diferenças, enquanto os selvagens exibiram padrões contrastantes. Marcadores microssatélites detectaram diferenças consistentes com a

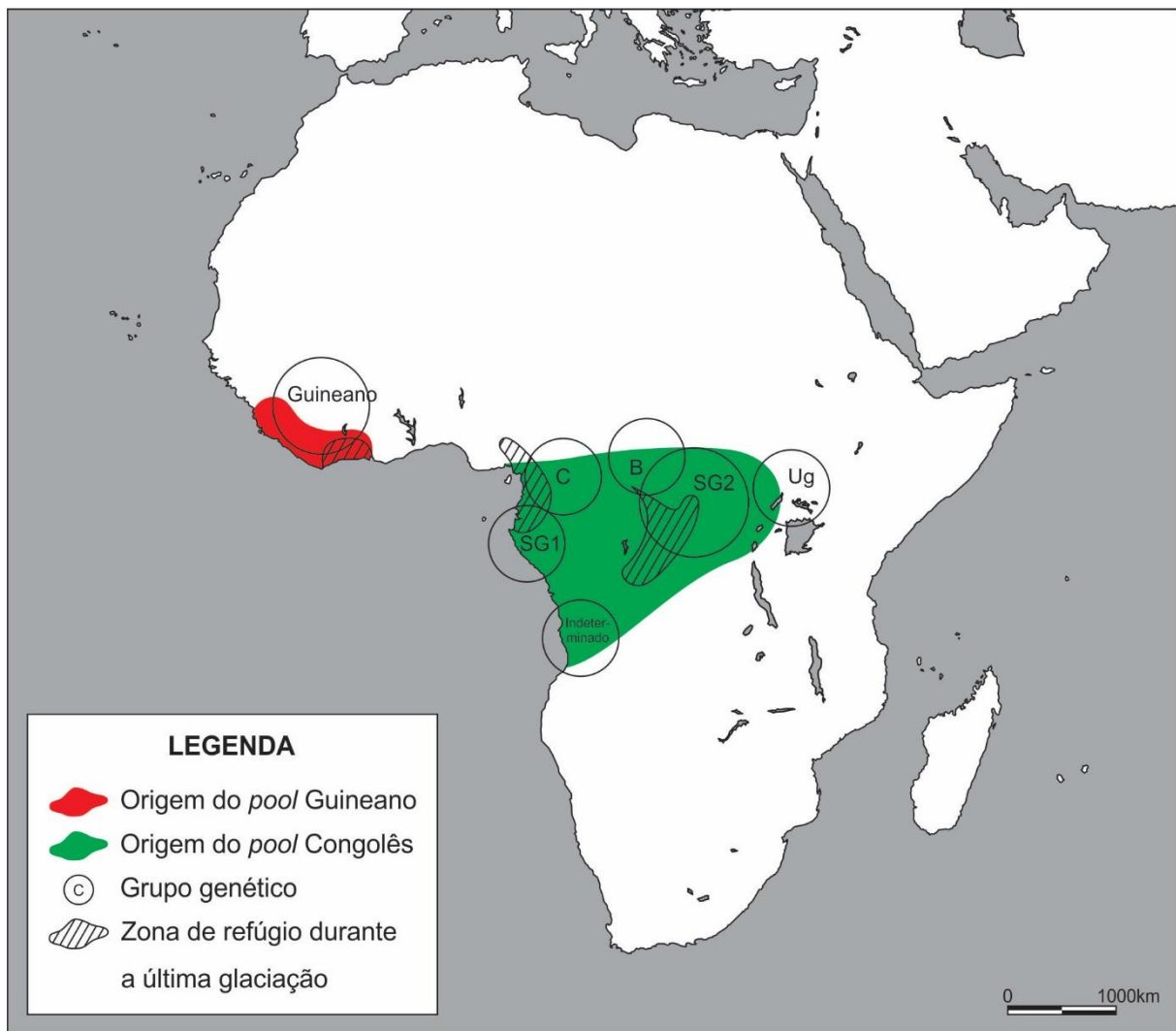


Figura 1.2. Origem geográfica dos principais grupos genéticos de *Coffea canephora*. O grupo formado por cafeeiros selvagens de Angola (indeterminado) ainda está em estudo (modificado de Montagnon *et al.*, 2012).

discriminação do subgrupo C de Congolense dos demais subgrupos deste grupo, bem como a subdivisão do grupo Guineano em dois subgrupos, incluindo um novo subgrupo descrito, GP (Cubry *et al.*, 2013b).

De forma resumida, pode-se afirmar que *C. canephora* possui grande diversidade genética, com diferenças entre e dentro das populações e entre as variedades quanto a características agrônômicas, morfológicas (Dussert *et al.*, 1999) e também em nível bioquímico (Ky *et al.*, 2001). Tal variabilidade é importante para seleção de características agrônômicas desejáveis ao melhoramento, não somente de cafeeiros dessa espécie como

também de *C. arabica*.

A introdução de *C. canephora* ocorreu no Brasil por volta de 1920, no Estado do Espírito Santo, município de Cachoeiro do Itapemirim (Carvalho *et al.*, 1946). Segundo Ferrão *et al.* (2010) o primeiro relato de introdução em território brasileiro de *C. canephora* foi feito pelo governador do Espírito Santo, em documento onde o mesmo relatou a aquisição de mudas e sementes Conilon e posterior distribuição entre os anos de 1909 e 1912. Desde então, o cultivo dessa espécie de cafeeiro tem se expandido no Brasil, principalmente nas regiões consideradas marginais ao cultivo do cafeeiro tradicional (Fonseca *et al.*, 2000) devido às condições ambientais não propícias ao cultivo de *C. arabica*, tal como nas regiões de baixa altitude e temperaturas médias altas.

No Brasil, um dos fatores limitantes à produção de café é a deficiência hídrica. Dessa maneira, um aspecto importante sobre o cultivo do café Conilon é a tolerância à seca encontrada naturalmente em alguns clones, como os 10 clones EMCAPA 8141 cv. Robustão Capixapa (Ferrão *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2002). No estado do Espírito Santo, o cultivo do café Conilon tem se expandido para áreas onde o déficit hídrico é o principal fator limitante à produção, principalmente em solos arenosos. Alguns desses clones são por isso denominados de dupla aptidão, devido às suas características fisiológicas e comportamentais; diante do estresse hídrico, produzem satisfatoriamente tanto em condições de seca quanto quando irrigados (Ronchi & DaMatta, 2010).

O interesse em *C. canephora* no controle de doenças do cafeeiro surgiu com os primeiros estudos visando controlar a ferrugem na Ásia, que foi um estímulo no cultivo e utilização de *C. canephora* em programas de melhoramento, devido à sua resistência a doenças (Berthaud, 1986). De fato, devido à suscetibilidade do cafeeiro Arábica a *Hemileia vastatrix*, *C. canephora* foi uma das alternativas encontradas pelos agricultores na Ásia para minimizar as perdas devidas às infecções de ferrugem.

Um marco importante na introgressão de resistência à ferrugem foi a descoberta do Híbrido do Timor (HT) ($2n = 44$), planta de *C. arabica* resultado do cruzamento natural entre as espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Inicialmente, o interesse em estudar o Híbrido do Timor e seus derivados ocorreu devido à resistência à ferrugem apresentada pelos mesmos (Bettencourt & Carvalho, 1968). No que se refere à ferrugem, o HT e seus derivados podem ser resistentes a todas as raças fisiológicas do patógeno e transmitir essa resistência aos seus descendentes (Rodrigues Jr. *et al.*, 2004). Estudos posteriores demonstraram que o HT e seus derivados foram resistentes também a nematoides do gênero *Meloidogyne* e que a resistência ao nematoide das galhas é proveniente de *C. canephora* (Silvarolla *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2005). Assim, o HT serviu como base para o desenvolvimento de novas cultivares de *C. arabica* como Catimor (Caturra x HT) e Sachimor (Vila Sarchi x HT) (Bertrand *et al.*, 1999), importantes para o controle de *M. exigua* e ferrugem, além de apresentarem bom porte, produtividade e qualidade da bebida.

Leroy *et al.* (2005) construíram a primeira biblioteca BAC de *C. canephora* com o objetivo de desenvolver recursos a fim de estudar a estrutura e evolução do genoma dessa espécie de cafeeiro, uma ferramenta importante para identificar características de interesse econômico. O projeto Genoma do Café Brasileiro, iniciado em 2002, visa desenvolver ferramentas úteis para o descobrimento de genes e análise funcional genética das espécies de cafeeiros. O objetivo foi desenvolver uma base de dados ESTs (bibliotecas) obtidas do sequenciamento de material genético de tecidos de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, sendo que a montagem das ESTs gerou 130.792, 12.381 e 10.566 *contigs*, respectivamente, para as espécies analisadas (Vieira *et al.*, 2006; Mondego *et al.*, 2011).

Das bibliotecas de cDNA geradas nesse projeto, uma delas é a biblioteca de raízes infectadas com nematoides. Apesar de não constar quais espécies de nematoides foram usadas, as informações geradas foram importantes para o estudo dos genes que possam atuar

na resposta, na resistência e na interação planta-patógeno como um todo, incluindo também os genótipos suscetíveis aos nematoides (Vieira *et al.*, 2006).

Denoeud *et al.* (2014) sequenciaram o genoma completo de *C. canephora*, permitindo aprofundar o entendimento da evolução dessa espécie de cafeeiro, sua relação filogenética com outras espécies do gênero *Coffea*, uma maior abordagem dos genes relacionados à resistência a doenças e diversas informações relacionadas à estrutura do genoma de *C. canephora*. O sequenciamento completo pode permitir o entendimento global do genoma do cafeeiro, não somente no que se refere à parte funcional.

1.2. O gênero *Meloidogyne*

Fitopatógenos podem se dividir entre aqueles que matam o hospedeiro e se alimentam dos compostos liberados (organismos necrotróficos) e os que requerem um hospedeiro vivo para completar seu ciclo de vida (organismos biotróficos). Fitonematoides podem adotar uma íntima e sofisticada relação com seu hospedeiro, modificando a fisiologia da planta a seu favor, em um exemplo de parasitismo biotrófico (Caillaud *et al.*, 2008). Devido à sua relação estreita com o hospedeiro nematoides do gênero *Meloidogyne* desenvolveram sítios de alimentação composto por células hipertrofiadas, as células gigantes (Huang & Maggenti, 1969). A formação das células gigantes é resultado da interação entre as substâncias produzidas pelo patógenos e as células da planta hospedeira. A posição taxonômica do gênero *Meloidogyne* se encontra na Figura 1.3.

As espécies de fitonematoides mais temidas pelos cafeicultores brasileiros estão no gênero *Meloidogyne*, pois, além de provocarem diversos danos à planta hospedeira, possuem uma alta gama de hospedeiros, afetando diversas plantas de interesse agrícola (Krzyzanowski *et al.*, 2001). Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, também denominados nematoides das Galhas, podem ser caracterizados como organismos fitoparasitas biotróficos com uma ampla



Figura 1.3. Posição taxonômica do Gênero *Meloidogyne* Goeldi 1887, de acordo com Siddiqi (2000).

gama de hospedeiros ao redor do mundo. Seus danos são responsáveis por acentuadas perdas, particularmente em países tropicais.

O ciclo de vida dos nematoides desse gênero (Figura 1.4) se inicia com o desenvolvimento embrionário dentro do ovo, levando à formação do juvenil de primeiro estágio (J1). Ainda dentro do ovo, o juvenil passa pela primeira ecdise, tornando-se J2. Após a eclosão, o J2, que é o estágio infectivo, migra por meio do filme d'água no solo à procura da raiz da planta hospedeira, onde penetra próximo à sua extremidade (início do parasitismo). Uma vez no interior da raiz, o J2 migra pelo córtex até o cilindro central, onde estabelece o sítio de alimentação, tornando-se sedentário. Nesse local, passa por mais duas ecdises que o levam a se transformar em dois sucessivos estágios juvenis, o juvenil de terceiro estágio (J3) e o juvenil de quarto estágio (J4), até atingir o estágio adulto. Em condições favoráveis ao desenvolvimento do nematoide, o J4 passa pela quarta ecdise, se tornando fêmea que, em geral, se reproduz por partenogênese (Castagnone-Sereno, 2006). Em ambiente desfavorável, como por exemplo, raízes com excesso de fêmeas, o nematoide se converte em macho, que

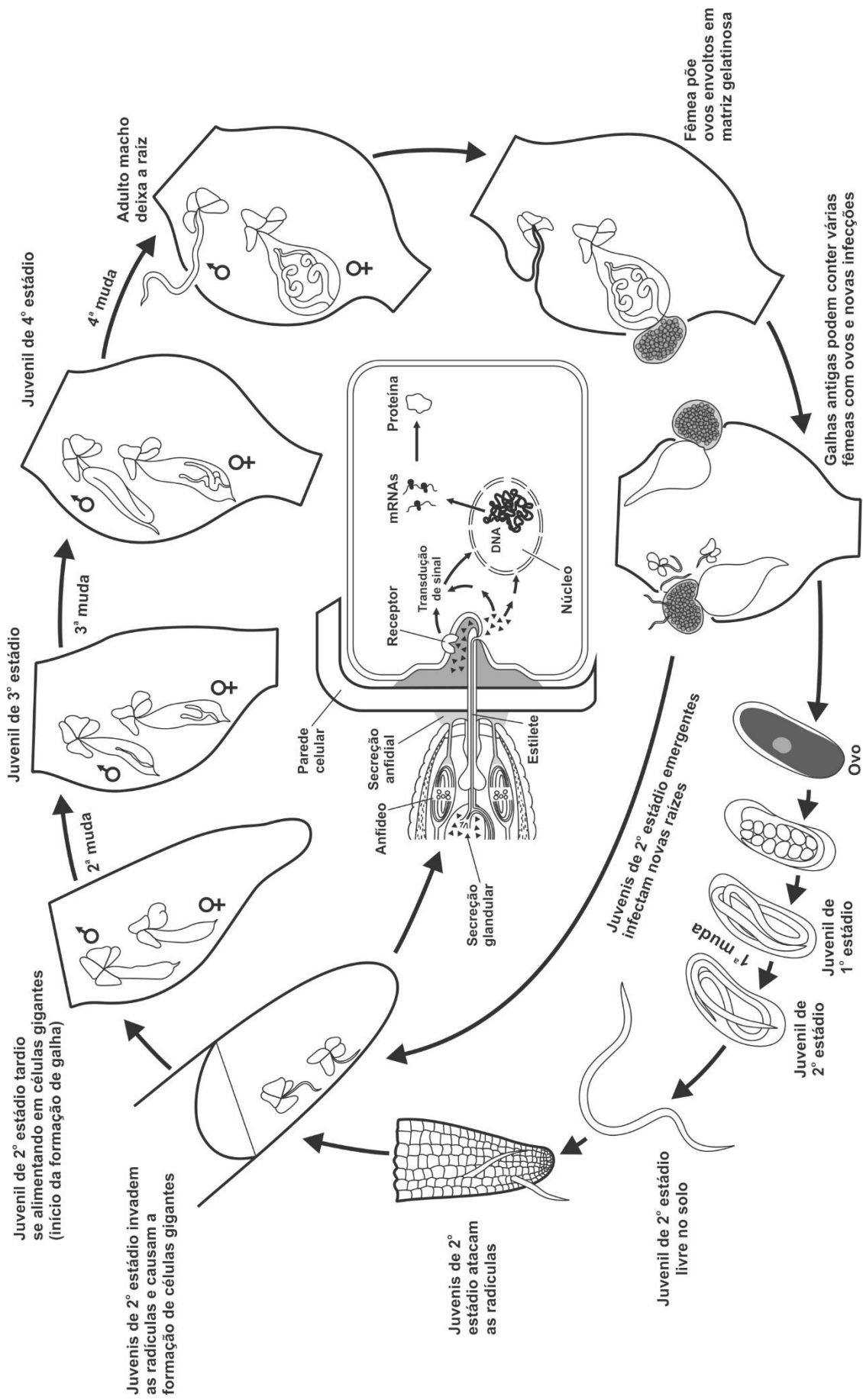


Figura 1.4. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (Fonte: Agrios, 1997 com modificações).

não permanece no sistema radicular, é de vida livre e não se alimenta, permanecendo no solo até morrer. As fêmeas sedentárias, piriformes produzem centenas de ovos (± 500) e permanecem internamente nas raízes da planta hospedeira (Lordello, 1986).

O J2 se caracteriza por possuir região labial com anelção grossa, um distinto disco labial, estilete delicado e cauda com região hialina conspícua, dentre outros caracteres. É a fase infectiva do nematoide, movendo-se entre 40-100 cm de solo na vertical quando a textura do solo é a ideal (Hunt & Handoo, 2009; Eisenback & Hunt, 2009). Quanto aos estádios J3 e J4, ambos são sedentários, de formato salsichóide, sendo que o J3 possui cauda distinta e o J4 tem ânus terminal. Ambos não possuem estilete, portanto, não se alimentam (Hunt & Handoo, 2009).

No que se refere à morfologia das fêmeas de *Meloidogyne*, em geral, elas são arredondadas, em formato de pera, com pescoço curto, branco-leitosas, sem estágio de cisto, com vulva e ânus próximos e região terminal perineal apresentando cutícula estriada. Os fasmídeos estão localizados em ambos os lados do ânus. O estilete das fêmeas é delgado, com 12-15 μ m de comprimento e com pequenos bulbos basais. O poro excretor pode ser anterior ou mediano. A fêmea possui dois ovários, muito próximos do intestino, o que facilita aos nutrientes estocados passar diretamente deste órgão para o sistema reprodutor, permitindo o desenvolvimento e maturação dos ovos. Esses ovos não são retidos em seu interior, mas depositados em matriz gelatinosa (Lordello, 1986). As fêmeas dos nematoides das galhas são endoparasitas sedentárias, ou seja, ficam em seu sítio de alimentação durante toda a vida, mas a musculatura do pescoço permite ao nematoide mudar a posição da cabeça a fim de trocar de célula gigante durante seu processo de alimentação (Eisenback & Hunt, 2009).

Os machos são vermiformes, com cerca de 2mm de comprimento, e possuem cutícula fortemente anelada com normalmente quatro incisuras no campo lateral. Possuem contorno da região labial ligeiramente contínuo com a linha do corpo, estilete robusto (18-25 μ m) com

grandes bulbos basais, espículo delgado, gubernáculo presente e apenas um testículo. A cauda é arredondada e os fasmídeos estão localizados perto da abertura cloacal, que é subterminal. Não possuem bursa (Hunt & Handoo, 2009). Os machos dos nematoides das galhas se tornam vermiformes no terceiro estágio e permanecem assim até a fase adulta, se tornando a partir deste momento móveis. A mobilidade permite que saiam da galha e migrem para o solo. Quando há reprodução por anfimixia, os machos são comuns, porém na reprodução partenogenética, mais frequente para espécies deste gênero, eles são raros, já que não participam do processo (Eisenback & Hunt, 2009).

O sítio de alimentação dos nematoides das galhas é formado por um conjunto de células hipertrofiadas, multinucleadas e de citoplasma denso, denominadas células gigantes. Esse grupo de células é responsável pela nutrição do patógeno durante todo seu ciclo de vida, permitindo seu desenvolvimento e reprodução. A formação das células gigantes ocorre devido à introdução por meio do estilete de secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematoide, e é um processo importante na interação planta-nematoide. O estilete exerce um papel fundamental na penetração, migração e estabelecimento, não somente dos nematoides do gênero *Meloidogyne*, mas também dos demais fitonematoides (Abad *et al.*, 2003). O tempo de duração de um ciclo, quantidade de ovos, tipo de galhas, dentre outros fatores, dependem da espécie de *Meloidogyne*, de características do hospedeiro e da relação entre ambos. Um exemplo interessante é a interação entre *Meloidogyne* spp. e o cafeeiro na qual não ocorrem galhas típicas no sistema radicular dessa planta (Carneiro *et al.*, 1996).

As secreções produzidas pelo nematoide, no caso dos endoparasitas sedentários, atuam na invasão dos tecidos da hospedeira e na diferenciação celular importante para a formação das células que irão nutri-lo, sendo também importantes no desenvolvimento dessas células e do tubo de alimentação (Abad *et al.*, 2003). Por meio deste, o nematoide introduz moléculas que alteram o metabolismo celular enquanto retira seu alimento. Fasmídeos e glândulas

esofagianas são estruturas do nematoide que produzem secreções importantes para a patogênese, sendo que muitas moléculas que compõem essas secreções foram identificadas como enzimas pectino-celulíticas envolvidas na penetração do estilete na parede celular (Abad *et al.*, 2003).

O gênero *Meloidogyne* possui mais de 90 espécies (Hunt & Handoo, 2009) que parasitam as mais diferentes plantas de diversos grupos botânicos. Dessas, 18 atacam o cafeeiro no mundo (Carneiro & Cofcewicz, 2008), e três são economicamente importantes no Brasil: *M. exigua*, *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) (Chitwood, 1949) e *M. paranaensis* Carneiro *et al.*, 1996 (Campos & Villain, 2005). A espécie *M. exigua* é amplamente distribuída nas Américas do Sul e Central e se caracteriza, dentre outros fatores, pela baixa severidade de danos provocados (Campos & Villain, 2005; Bertrand & Anthony, 2008).

Meloidogyne incognita foi primeiramente encontrada em cafeeiros da Guatemala em 1960, e desde então foi relatada sua presença, também, em El Salvador e Brasil (Hernandez *et al.*, 2004a). No Brasil, o ataque aos cafezais por essa espécie e *M. paranaensis* (Bertrand & Anthony, 2008) dizimou muitas plantações (Carneiro *et al.*, 1996; Gonçalves & Silvarolla, 2001). Na América Central, *M. arabicida* Lopez & Salazar, 1989, vem provocando danos em cafezais na Costa Rica (Calderón-Vega, 1989; Carneiro *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2004b; Carneiro *et al.*, 2008), incluindo uma doença complexa, causada pela interação *Meloidogyne* X *Fusarium oxysporium* (Bertrand *et al.*, 2000a). Esta doença provoca declínio progressivo da planta, começando com clorose foliar, seguido de queda de flores e frutos e crescimento reduzido do sistema radicular, porém com extenso desenvolvimento do córtex em raízes principais e secundárias, sintomas os quais podem levar à morte do cafeeiro em um período de dois a quatro anos.

Carneiro *et al.* (2005a) descreveram uma nova espécie de nematoide das galhas em cafeeiros provenientes de El Salvador, *M. izalcoensis*, espécie com padrão perineal

semelhante a *M. paranaensis* e *M. incognita*, mas distante filogeneticamente das duas e com padrão de esterase I4 (Carneiro *et al.*, 2004; Villain *et al.*, 2007; Carneiro & Cofcewicz, 2008). Recentemente, Humphreys-Pereira *et al.* (2014) identificaram uma nova espécie de *Meloidogyne* atacando cafeeiros na Costa Rica, *M. lopezi*, que produz galhas pequenas onde se encontram fêmeas individualizadas, diferentemente de outras espécies como *M. arabicida*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, que induzem escamação do sistema radicular. Os sintomas de *M. lopezi* nas raízes são muito semelhantes aos de *M. izalcoensis* (Carneiro *et al.*, 2005a, 2005b; Greco; & DiVito, 2009).

Em cafeeiros suscetíveis aos nematoides de galhas, os sintomas podem ser distintos de acordo com a espécie que está provocando a infecção. *Meloidogyne exigua* produz numerosas galhas com massas de ovos no córtex abaixo da epiderme radicular, enquanto *M. incognita* provoca escamação e quebra do tecido cortical da raiz infectada, devido à hipertrofia dos tecidos adjacentes ao sítio de alimentação da fêmea, e as massas de ovos são produzidas na superfície radicular. Os sintomas de *M. paranaensis* se assemelham a *M. incognita*, os quais provocam rachaduras no córtex, não produzem em geral galhas típicas e depositam massas de ovos muitas vezes internas ao tecido radicular. No caso dessas últimas espécies citadas, pode ocorrer necrose do tecido infectado (Vovlas & Di Vito, 1991; Bertrand & Anthony, 2008).

Os nematoides das galhas estão amplamente distribuídos nas plantações de café do Brasil, onde causam grandes perdas para os produtores e para a economia do país. *Meloidogyne incognita*, *M. exigua* e *M. paranaensis* foram relatados em plantações de café nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais por muitos anos, com flutuações na predominância de uma espécie em relação às outras (Campos & Villain, 2005). Levantamentos realizados nos Estados do Paraná e São Paulo têm mostrado um verdadeiro aumento na distribuição de *M. paranaensis* e *M. incognita* (Krzyzanowski *et al.*, 2001; Lordello *et al.*, 2001), enquanto no Estado de Minas Gerais *M. exigua* tem sido mais comum

(Campos & Villain, 2005). Estudos recentes mostraram a predominância de *M. incognita* no Estado de São Paulo, muitas vezes em populações isoladas, outras vezes, ocorrendo em mistura com *M. paranaensis* (Carneiro *et al.*, 2005a). Barros *et al.* (2011) relataram pela primeira vez a presença de *M. paranaensis* no Espírito Santo em cafeeiro arábica cultivar Catuaí, um indicativo do avanço geográfico dessa espécie no Brasil.

Diversos fatores atuam no sucesso da disseminação de *Meloidogyne* spp.: a ampla distribuição geográfica do patógeno, plantio de mudas contaminadas, solos arenosos, alta persistência no solo, erosão, baixa eficiência do controle químico e a destruição do sistema radicular do cafeeiro Arábica. Com isso, esses parasitas constituem fator limitante na implantação de novos cafezais em áreas contaminadas.

Para que os trabalhos de resistência genética de cafeeiros a *Meloidogyne* spp. possam ser realizados, é necessária a correta identificação da espécie de nematoide a ser testada, além da pureza do inóculo a ser utilizado. A análise bioquímica por meio da isoenzima esterase tem se mostrado efetiva na identificação dos nematoides do gênero *Meloidogyne* que atacam o cafeeiro (Carneiro *et al.*, 1996; 2004; 2005b). *Meloidogyne paranaensis* pode ser identificada pelos fenótipos esterase P1 e P2, *M. incognita* pelos fenótipos I1 e I2 e *M. exigua* pelos fenótipos esterase E1 e E2 (Carneiro & Cofcewicz, 2008).

Randig *et al.* (2004) desenvolveram um kit multiplex-PCR utilizando marcadores SCAR por meio do qual se pode identificar, simultaneamente, as espécies *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. Correa *et al.* (2013) desenvolveram mais dois marcadores espécie-específicos a fim de identificar mais duas espécies de *Meloidogyne* que atacam cafeeiros, *M. arabicida* e *M. izalcoensis*. Dessa maneira, o Kit Scar-café identifica cinco espécies de *Meloidogyne* presentes nos cafezais, sejam individualizadas ou misturadas (Figura 1.5).

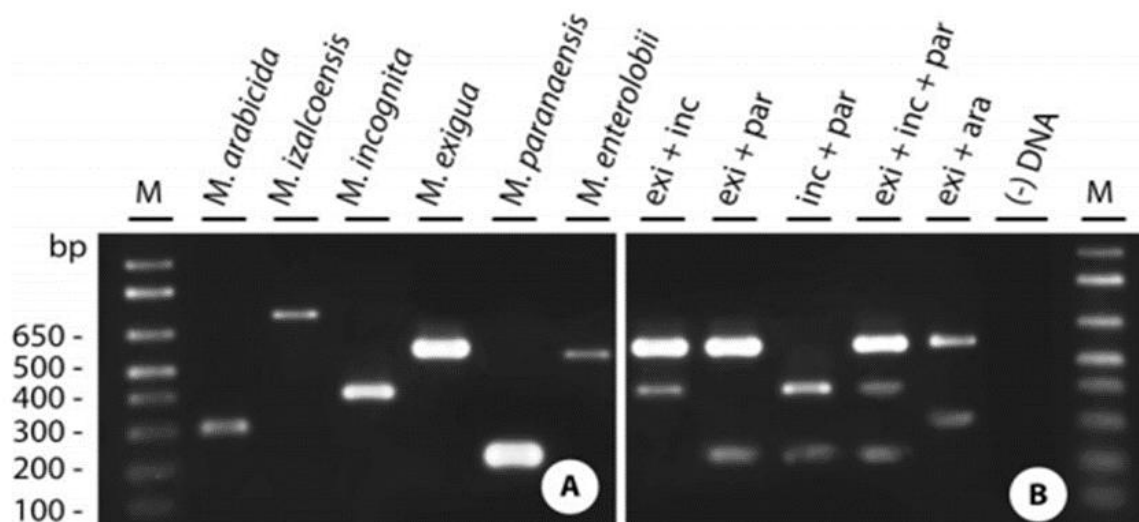


Figura 1.5. SCAR-PCR Individual (A) e multiplex (B) para identificação das espécies de *Meloidogyne* que infectam o cafeeiro (Correa *et al.*, 2013).

1.3. Resistência genética como método de controle de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro

Nematoides sedentários são de particular importância para a agricultura, devido à sua íntima interação com a planta hospedeira. Por esse motivo, grandes esforços têm ocorrido no sentido de desenvolver plantas resistentes (Grundler, 1996). A importância dos fitonematoides na produção brasileira de café é bastante variável e depende da espécie ou cultivar de cafeeiro plantada, das condições edafoclimáticas das regiões de cultivo, das práticas culturais adotadas e do nível populacional e espécie e ou raças do nematoide presente no solo (Gonçalves *et al.*, 2000). Dentre os principais métodos de controle desses patógenos, as variedades resistentes têm sido recomendadas para o produtor de café.

A resistência da planta impede que o nematoide se desenvolva, conduzindo a baixas taxas de reprodução. Consequentemente, além do parasita não causar dano à cultura, o uso de resistência leva também à redução da densidade populacional do nematoide no solo, sendo eficiente meio de controle. Dessa maneira, o uso de plantas resistentes tornou-se uma das formas mais econômicas e eficientes de se produzir em áreas infestadas com nematoides. Porém, para que essa prática funcione, é importante conhecer bem a espécie, raça ou biótipo

do nematoide, pois a resistência é, na maioria das vezes, específica. Entender os mecanismos envolvidos na virulência desses patógenos é de grande importância para o controle durável dos nematoides das galhas (Abad *et al.*, 2003).

Em condições de campo pode ocorrer mistura de mais de uma espécie do gênero *Meloidogyne* (Carneiro *et al.*, 2005b) e de outros gêneros de nematoides fitopatogênicos (Bertrand & Anthony, 2008). Cultivares promissores de *C. arabica* resistentes a uma ou mais de uma espécie de *Meloidogyne* são poucos (Campos & Villain, 2005). Como exemplo, tem-se a cultivar de *C. arabica* IPR 100 (resultado do cruzamento de Catuaí e genótipo de cafeeiro da série BA-10, que é um híbrido que contém genes de *C. liberica*), desenvolvida pelo Instituto Agrônomo do Paraná. A cultivar IPR 100 possui maturação dos frutos tardia, melhor adaptação ao calor, à seca e a solos pobres, alta produtividade e resistência à *M. paranaensis* e a algumas raças de *M. incognita* (IAPAR, 2012).

Fontes de resistência aos nematoides do gênero *Meloidogyne* estão presentes nas espécies diploides do gênero *Coffea*, como *C. canephora*, *C. congensis* e *C. devewrei*. Devido à presença de um sistema radicular mais desenvolvido que o de *C. arabica*, e porque essas apresentam resistência a outros patógenos, incluindo nematoides de outros gêneros, como *Pratylenchus*, essas espécies de cafeeiro são interessantes para programas de melhoramento (Villain *et al.*, 2002; 2004). Estes autores têm reportado resistência em *C. canephora* e *C. congensis* a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*.

Resistência genética a *Meloidogyne* spp. pode ser encontrada em *C. canephora* e em seus híbridos (Silvarolla *et al.*, 1998; Bertrand *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2005; Bertrand & Anthony, 2008), podendo ser incorporada por meio de melhoramento tradicional, cruzamentos e seleção de indivíduos genotipicamente e fenotipicamente interessantes. As cultivares resistentes dessa espécie de cafeeiro também podem ser utilizadas como porta-enxerto para *C. arabica* (Bertrand & Anthony, 2008), um processo rápido e interessante para

introdução de resistência, particularmente para patógenos radiculares como os nematoides das galhas. Como exemplo, tem-se o uso de porta-enxertos multirresistentes como Nemaya (cruzamento entre *C. canephora* clones T3561 e T3751), cultivado na América Central, e Apoatã IAC 2258 (*C. canephora* cv. 2258 da coleção de germoplasma Catie, Turrialba, Costa Rica), usado no Brasil. Ambos foram desenvolvidos para superar os problemas associados com nematoides das galhas nesses dois países produtores (Anzueto *et al.*, 1996; Fazuoli *et al.*, 2002). Enxertar cultivares de *C. arabica* em *C. canephora* cv. Nemaya ou cultivar Apoatã tem sido a única medida de controle viável que permite retorno econômico dos cafeeiros plantados em áreas infestadas com *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. arabicida*.

Bertrand & Anthony (2008) relataram que *C. canephora*, seus híbridos e *C. racemosa* são fontes de resistência a *M. exigua*. A cultivar IAPAR 59 (*C. arabica*), muito usada por sua resistência a *M. exigua*, é resultado do cruzamento de cultivar de *C. arabica* (Villa Sarchi 971/10) com um Híbrido do Timor (832/2) (Sera *et al.*, 1996). Algumas populações derivadas do cruzamento entre o Híbrido do Timor e Catuaí, em gerações F3, F4 e F5, foram homozigotas para resistência a *M. exigua* e apresentaram resistência também à ferrugem (*H. vastatrix*) além de boas características agronômicas (Gonçalves & Pereira, 1998). Cultivares monorresistentes como IAPAR59 e acessos T5296 (Sarchimor) são úteis quando apenas uma única espécie de *Meloidogyne* está presente, como relatado para *M. exigua*. Porém, resistência a *M. exigua* e *M. paranaensis* da Guatemala foi observada no cruzamento dos híbridos F1 T5296 x ET59 e T5296 x ET47 (Bertrand *et al.*, 2008).

Da Mata *et al.* (2000) avaliaram em condição de campo 44 acessos de *C. arabica* de diversas origens, e selecionaram a linhagem IAPAR/LN 94066, resultado do cruzamento entre Catuaí e Icatu (possuidor de genes de *C. canephora*) para plantio em áreas infestadas com *M. paranaensis*, por ser moderadamente resistente a esse nematoide e apresentar alta produtividade. Shigueoka *et al.* (2011) selecionaram 13 materiais da seleção E0616 para

testes, pois estes apresentaram resistência a *M. paranaensis* e potencial para melhor produtividade.

Um gene dominante denominado *Mex-1* herdado da espécie *C. canephora*, o qual confere resistência a *M. exigua*, foi transferido através de cruzamentos para a espécie *C. arabica* (Noir *et al.*, 2003). Acredita-se que a resistência a *M. exigua* é determinada por este gene, cuja dominância foi comprovada por análise de cruzamentos e observação da geração F2. Entretanto, estudos recentes demonstraram que a resistência conferida pelo *Mex-1* pode ser contornada por populações virulentas de *M. exigua* (Muniz *et al.*, 2009).

Ribeiro *et al.* (2005) relataram resistência a *M. exigua* em progênies provenientes de híbridos interespecíficos de *C. canephora* com *C. arabica*, sendo 36 dessas progênies derivadas de diferentes Híbridos do Timor (HT), como os UFV 1986 447-50 Col e UFV 2011 442-50. Porém, foram considerados para programas de melhoramento somente os híbridos imunes, por exemplo UFV 1851 439-02. Pereira *et al.* (2009) avaliaram progênies de Icatu (*C. canephora* x *C. arabica*), e dois genótipos, H504-5-8-2 e H514MS-Resplendor, foram considerados resistentes a *M. exigua*. Silvarolla *et al.* (1998) também encontraram fontes de resistência a *M. exigua* em híbridos interespecíficos provenientes do Icatu. Cultivares altamente resistentes ou resistentes a *M. exigua*, incluem ainda Catucaí 785/15 (Icatu x Catucaí), Acauã (Sarchimor x Mundo Novo), Paraíso (Catucaí Amarelo IAC 30 x Híbrido de Timor UFV 445-46), Catiguá MG3 (Catucaí Amarelo IAC 86 x Híbrido de Timor UFV 440-10), Iapar 59 e Tupi RN IAC 1669/19 (Padilha *et al.*, 2009).

M. incognita possui quatro raças determinadas de acordo com os hospedeiros diferenciadores, e todas estas parasitam o cafeeiro (Krzyzanowski *et al.*, 2001). *Coffea canephora* se mostrou resistente à raça 1, enquanto todos os acessos estudados de *C. arabica* foram suscetíveis (Bertrand & Anthony, 2008). Por outro lado, na avaliação da resistência de 50 acessos de *C. arabica* introduzidos da Etiópia e Sudão, observou-se que 40% dos acessos

foram resistentes a *M. incognita* (Anzueto *et al.*, 2001). No entanto, esses cafeeiros apresentam produções bem inferiores às das cultivares Mundo Novo e Catuaí, além de pouca adaptação às condições brasileiras (Carvalho *et al.*, 1988), embora possam ser utilizados em programas de cruzamentos na introdução de resistência para as cultivares comerciais.

Carneiro (1995) avaliou, em condições de campo, cafeeiros previamente classificados como resistentes, suscetíveis ou tolerantes a *M. incognita* raça 2, e todos reproduziram o nematoide, não sendo recomendados para plantio. Trabalhos com o objetivo de buscar fontes de resistência devem levar em conta não somente as condições controladas de casa de vegetação, como também devem avaliar os genótipos em condições de campo, a fim de garantir com segurança que a classificação da resistência ou imunidade está correta. Um resumo das variedades/cultivares de *C. arabica* e *C. canephora* que apresentaram resistência a espécies de *Meloidogyne* se encontra na Tabela 1.1.

1.4. Conceito de resistência e aspectos relacionados à interação planta-nematoide

Como todos os seres vivos, plantas estão sujeitas à ação de um grande número de microrganismos presentes em seu ambiente, muitos deles patogênicos. Os vegetais possuem mecanismos que impedem a penetração e o desenvolvimento de patógenos em seus tecidos, que levam à resistência local e/ou sistêmica. Resistência é a capacidade morfológica e/ou bioquímica que a planta possui de impedir ou diminuir a penetração, desenvolvimento e/ou reprodução de um patógeno, (Agrios, 1997; Blum, 2002). No caso dos nematoides, a resistência pode ser definida como características da planta que inibem a sua reprodução, e variar de moderada a absoluta (Taylor & Sasser, 1978; Roberts, 2002; Starr & Roberts, 2004). Essa característica ocorre devido a genes específicos que podem ou não segregar dentro da espécie (Roberts, 2002; Starr & Roberts, 2004).

A resistência a patógenos pode ser pré- ou pós-infectiva. A resistência pré-infectiva

Tabela 1.1. Exemplos citados no presente trabalho de acessos/cultivares de *C. arabica* identificadas pela resistência a *Meloidogyne* spp. Todos os cafeeiros apresentados são resultados do melhoramento por meio de cruzamento com *C. canephora* ou *C. liberica*.

Cafeeiro	Espécie(s)	Fonte
Nemaya (T3561 x T3751) (<i>C. canephora</i>)	<i>Meloidogyne</i> spp.	Anzueto <i>et al.</i> , 1996; Fazuoli <i>et al.</i> , 2002
Apoatã IAC 2258 (cv. 2258) –CATIE/ Turrialba, Costa Rica (<i>C. canephora</i>)	<i>Meloidogyne</i> spp.	Anzueto <i>et al.</i> , 1996; Fazuoli <i>et al.</i> , 2002
IAPAR/LN 94066 (Catuaí x Icatu)*	<i>M. paranaensis</i>	Da Mata <i>et al.</i> , 2000
IAPAR 59 (Villa Sarchi 971/10 x HT 832/2)*	<i>M. exigua</i>	Sera <i>et al.</i> , 1996
HT x Catuaí*	<i>M. exigua</i>	Gonçalves & Pereira, 1998
T5296 (Sarchimor) x ET 59*	<i>M. exigua</i> ; <i>M. paranaensis</i>	Bertrand <i>et al.</i> , 2008
T5296 x ET 47*	<i>M. exigua</i> ; <i>M. paranaensis</i>	Bertrand <i>et al.</i> , 2008
UFV 1851 439-02 (Híbrido do Timor)*	<i>M. exigua</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2005
H504-5-8-2 (<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>)*	<i>M. exigua</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2009
H514 MS Resplendor (<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i>)*	<i>M. exigua</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2009
Catuaí 785/15 (Icatu x Catuaí)*	<i>M. exigua</i>	Padilha <i>et al.</i> , 2009
Acauã (Sarchimor x Mundo Novo)*	<i>M. exigua</i>	Padilha <i>et al.</i> , 2009
Paraíso (Catuaí amarelo IAC 30 x HT UFV 445-46)*	<i>M. exigua</i>	Padilha <i>et al.</i> , 2009
Catiguá MG3 (Catuaí amarelo IAC 86 x HT UFV 440-10)*	<i>M. exigua</i>	Padilha <i>et al.</i> , 2009
Tupi RN IAC 1669/19*	<i>M. exigua</i>	Padilha <i>et al.</i> , 2009
IPR 100 (Catuaí x cafeeiro série BA-10)**	<i>M. paranaensis</i> ; <i>M. incognita</i>	IAPAR, 2012

* Genes de *C. canephora*

** Genes de *C. liberica*

corresponde à resistência passiva, associada a exsudados radiculares ou condições físicas da raiz que impedem a entrada do nematoide. Já a resistência pós-infectiva está relacionada aos eventos que impedem o desenvolvimento do nematoide após sua penetração na planta (Williamson & Roberts, 2009). A resistência de plantas a patógenos pode ser também classificada como vertical (qualitativa) ou horizontal (quantitativa).

A resistência vertical é conferida por um ou mais genes, sendo portanto monogênica ou oligogênica. O princípio da resistência vertical foi estabelecido por Flor (1971), com a

hipótese de interação patógeno-hospedeiro gene-a-gene, na qual uma proteína/elicitador Avr do parasita é reconhecida por uma proteína codificada por um gene *R* do hospedeiro. O resultado é uma interação altamente específica em que as proteínas *R* atuam como ‘guardas’ da planta alvo, reconhecendo elicitores e dando início a uma resposta em cascata, que frequentemente culmina em reação de hipersensibilidade (RH) (Williamson, 1999; Abad *et al.*, 2003; Cabrera-Poch *et al.*, 2006; Fuller *et al.*, 2008). Essa detecção feita pela proteína *R* pode se dar de forma direta ou indireta. No primeiro caso, o efetor do patógeno se liga diretamente a região LRR da proteína *R*; já no segundo, a ligação se dá por meio de efetores do hospedeiro ligado à porção N-terminal da proteína *R* (Keen, 1990; Williamson, 1999; Dodds *et al.*, 2006).

No entanto, na teoria gene-a-gene, a resistência condicionada pelos genes *R* não se aplica a todos os patossistemas (Nelson, 1978; Keen, 1990; Matiello *et al.*, 1997). Posteriormente aos primeiros trabalhos de Flor (1946; 1947; 1956) que culminaram na teoria gene-a-gene, Van der Plank (1963) estabeleceu a resistência horizontal ao estudar o patossistema batata/*Phytophthora infestans*; esta resistência foi obtida pela incorporação de vários genes (*R1*, *R2*, *R3* e *R4*) de *Solanum demissum* Lindl. A resistência horizontal se caracteriza por ser poligênica e condicionada por vários genes de pequenos efeitos, apresentando, portanto, uma alta estabilidade (Van der Plank, 1975).

A vantagem da resistência horizontal é que, devido ao seu carácter poligênico, torna-se difícil encontrar um patógeno que consiga romper a resistência mediada por todos os genes que atuam na determinação dessa característica. Isso a torna estável e durável, principalmente se a taxa de recombinação do patógeno for baixa (Van der Plank, 1963; Matiello *et al.*, 1997). No entanto, esse conjunto de genes é mais difícil de ser introduzido na sua totalidade, e por isso a resistência da planta pode não ser plena, apresentando diferentes níveis.

Genes que atuam na resistência têm sido clonados de várias espécies (Williamson,

1999), e genes de resistência associados a nematoides têm se mostrado efetivos a um número limitado de espécies, quando não a uma só (Fuller *et al.*, 2008). No que se refere a *Meloidogyne*, um dos genes mais estudados e o primeiro a ser clonado é o gene *Mi* do tomateiro, que confere resistência a *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*, além de afídeos e a mosca branca (Williamson, 1999; Abad *et al.*, 2003; Williamson & Roberts, 2009).

Estruturalmente, o gene *Mi* codifica uma proteína com regiões ricas em leucina [*nucleotide-binding site leucine-rich repeat* (NBS-LRR)] comuns em muitos outros genes *R* da mesma família ou de outras famílias de genes com a mesma função (Williamson, 1999; Milligan *et al.*, 1998; Dangl & Jones, 2001; McHale *et al.*, 2006). A resistência mediada pelo gene *Mi-1* envolve a ativação intracelular da proteína R pelo patógeno, atuação do óxido nítrico, etileno e ácido salicílico na transdução de sinais e RH como resposta de resistência, dentre outros. Em muitos tomateiros selvagens, foram identificados pelo menos nove genes do grupo *Mi*; todavia, somente o gene *Mi-1* confere resistência em tomateiros cultivados, e os demais genes não foram ainda transferidos dos acessos selvagens para os cultivados com sucesso (Williamson & Roberts, 2009). Outro revés é que o sucesso do gene *Mi* na resistência apresenta limitações geográficas, uma vez que o nematoide quebra a resistência mediada pelo *Mi* em temperaturas acima de 28°C (Fuller *et al.*, 2008).

O reconhecimento específico do patógeno pela planta pode levar a uma reação de resistência conhecida como RH, acompanhada de morte celular rápida em torno do local da infecção inicial (Greenberg, 1997). Respostas de hipersensibilidade precoces têm sido observadas em tomateiro, cuja resistência a *M. incognita* é mediada pelo gene *Mi-1* (Williamson, 1998; 1999); no cafeeiro, cuja resistência a *M. exigua* é mediada pelo gene *Mex-1* (Noir *et al.*, 2003; Anthony *et al.*, 2005); em pimenteira, cuja resistência a *M. incognita* é mediada pelos genes *ME1* e *ME3* (Pegard *et al.*, 2005); e em amendoim silvestre, quando infectado por *M. arenaria* (Proite *et al.*, 2008).

Uma única planta pode ter dezenas de genes de resistência diferentes direcionados para um patógeno em particular, e para que este escape e consiga se desenvolver na hospedeira, o mesmo deve possuir alelos recessivos para todos os genes de avirulência relevantes (Keen, 1990). Isto o tornaria virulento, ou seja, permitiria seu desenvolvimento e reprodução na planta hospedeira. Quando se trata dos nematoides das galhas, as bases genéticas dessa característica se tornam difíceis de ser testadas, devido à reprodução por partenogênese (Abad *et al.*, 2003; Castagnone-Sereno, 2006). A resistência à espécie de *Meloidogyne* não protege a planta da invasão pelo nematoide, mas impede seu estabelecimento, provocando falha na produção de um sítio de alimentação funcional, necessário ao desenvolvimento desse patógeno (Williamson & Kumar, 2006).

1.5. Interação planta-patógeno incompatível: aspectos gerais

O parasitismo consiste em uma relação de dependência, em geral obrigatória por parte do parasita, o qual, para garantir sua sobrevivência e reprodução, se utiliza do metabolismo do hospedeiro, modificando a fisiologia desse último em detrimento do primeiro (Bateman, 1978). A suscetibilidade ocorre quando o patógeno consegue penetrar, se estabelecer e se reproduzir nos tecidos da hospedeira, modificando sua fisiologia e causando severos danos na planta que levam aos sintomas da doença, baixa produção e até mesmo morte (Williamson, 1999). A resistência se ocupa de inibir, restringir ou bloquear a entrada, permanência, estabelecimento e/ou reprodução do patógeno no organismo hospedeiro. A resistência é diferente da tolerância; na primeira, ocorre diminuição da população do patógeno abaixo do nível de dano econômico, no caso de plantas agrícolas, e manutenção da integridade da planta; na segunda, a planta hospedeira segue produzindo, não havendo danos econômicos, mas permite o desenvolvimento e reprodução do patógeno.

Em se tratando de relação planta-patógeno que leva à resistência, o primeiro passo dessa

relação é o reconhecimento. O organismo fitopatogênico necessita reconhecer e diferenciar a planta hospedeira das não hospedeiras, enquanto a planta, por sua vez, precisa reconhecer o patógeno quando este invade seus tecidos (Renelt *et al.*, 1993). Nesse primeiro contato, elicitores do parasita podem ser reconhecidos por receptores da planta, no que chamamos de resistência basal, a qual é inespecífica e serve como a primeira linha de defesa molecular aos patógenos (Truman *et al.*, 2007); ou por elicitores/fatores de avirulência que se ligam a produtos do gene R, o que se denomina resistência específica. As resistências basal e específica podem se sobrepôr, tornando mais rápida e efetiva a ativação das respostas de defesa (Dangl & Jones, 2001). Reconhecer ou não a presença do patógeno em seus tecidos pode desencadear uma série de eventos que resultarão em resistência ou suscetibilidade. No que diz respeito à resistência, a velocidade do reconhecimento, resposta da planta e síntese de supressores são elementos importantes, uma vez que falhas podem levar ao estabelecimento do patógeno e consequente doença da planta hospedeira. Durante sua coevolução, plantas e patógenos têm se envolvido em uma intrincada relação (Ryan, 2000) que resulta em contínua troca de informações moleculares (Benhamou & Nicole, 1999).

De modo geral, são três as etapas que levam à resistência da planta: reconhecimento, transdução de sinais e ativação dos mecanismos que levam à resistência *per se* (Mills *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 1997). A partir do reconhecimento, ocorre uma sequência de reações denominada transdução de sinais, que leva a informação sobre a invasão do patógeno até o núcleo, onde os genes envolvidos na resistência serão ativados (Medeiros *et al.*, 2003) e todo um conjunto de metabólitos será produzido a fim de bloquear, de alguma forma, a ação do fitopatógeno. Os componentes do reconhecimento específico e transdução de sinais são codificados pelos genes de resistência (McCarty & Chory, 2000).

Os genes *R* são os responsáveis pelo reconhecimento dos efetores Avr dos patógenos e também pela cascata de reações que levam a informação resultante da ligação entre esses

efetores e proteínas R até o núcleo celular (Baker *et al.*, 1997; Van der Hoorn *et al.*, 2001). Apesar da ampla gama de patógenos e fatores de patogenicidade, os genes *R* codificam somente cinco classes de proteínas, sendo que as mais numerosas destas são as que contêm os domínios NBS (sítio de ligação ao nucleotídeo) e LRR (sítio rico em repetições de Leucina) (Figura 1.6) (Baker *et al.*, 1997; Dangl & Jones, 2001). Em *Arabidopsis*, aproximadamente 150 sequências com homologia para genes *R* NBS-LRR foram encontradas desigualmente distribuídas nos cromossomos (Dangl & Jones, 2001; Jones, 2001), porém um número limitado de genes *R* parece atuar na resistência a um grande número de patógenos.

No domínio LRR, as repetições de leucina se ajustam e formam uma folha β paralela exposta a um solvente (Kobe & Deisenhofer, 1995). Quando exposta, esta região da proteína R fornece diferentes especificidades de reconhecimento, ou seja, diferentes pontos de interação com elicitores Avr (Parniske *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1999). De fato, essas regiões parecem ter somente dois pontos em comum: sequências repetidas e envolvimento na interação proteína-proteína (Kobe & Deisenhofer, 1995). Van der Hoorn *et al.* (2001) observaram que resíduos presentes em regiões expostas a solvente são todas necessárias ao funcionamento da proteína Cf-4. Ao introduzirem estes resíduos em outra proteína do grupo Cf-x (produtos dos genes *Cf* de tomateiro), denominada Cf-9, essa última passou a não

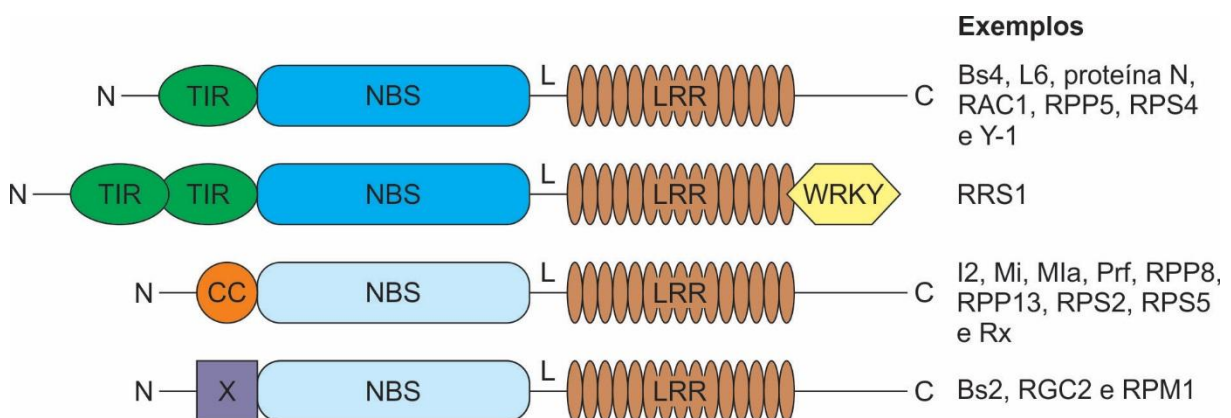


Figura 1.6. Estrutura do domínio NBS-LRR de diferentes proteínas R entre eles a codificada pelo gene *Mi* de tomateiro (McHale *et al.*, 2006).

reconhecer mais o fator de avirulência do patógeno AVR9, e sim o AVR4. Essas proteínas, que apresentam regiões ricas em repetições de leucina, estão também envolvidas na adesão celular, desenvolvimento, reparo do DNA, recombinação, transcrição e processamento do RNA, além de estarem presentes em muitos compartimentos celulares (Kobe & Deisenhofer, 1995). O sítio NBS é bastante conservado em diferentes organismos, de bactérias a plantas, e este domínio é um ponto de intersecção entre proteínas R e alguns efetores de morte celular como APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) e CED4 (*cell death activator 4*) (Van Der Biezen & Jones, 1998; Lam *et al.*, 2000; Kuriyama & Fukuda, 2002).

Fatores de Transcrição WRKY são proteínas *DNA-binding* conhecidas como reguladores de resposta a estresses bióticos e abióticos, ativando ou reprimindo a transcrição (Eulgem, 2006; Schluttenhofer & Yuan, 2014). Previamente, duas cópias do gene que codifica o fator de transcrição WRKY foram obtidas a partir de *C. arabica* (*CaWRKY1a* e *CaWRKY1b*). Ambas as cópias são sequências homólogas originadas de cada uma das espécies que originaram *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Petitot *et al.*, 2008), e se mantiveram funcionais no genoma duplicado do cafeeiro Arábica. Genes que codificam fatores de transcrição da família WRKY foram relacionados à resistência de *C. arabica* a ferrugem e *M. exigua*, bem como a fatores abióticos. No entanto, apesar de haver expressão desses genes em *C. arabica* resistente para ambos os patógenos, esta foi sensivelmente maior para *H. vastatrix* do que para *M. exigua* (Petitot *et al.*, 2008; Ramiro *et al.*, 2010).

No processo de transdução de sinais através do citoplasma pode ocorrer aumento da concentração e fluxo de cálcio, fosforilação enzimática mediada por quinases, reações de oxido-redução, síntese de mensageiros secundários e consequente ativação de fatores de transcrição (Medeiros *et al.*, 2003). Em condições de estresse, como no caso de infecção contra patógenos, ocorre rápido aumento de produção de espécies reativas de oxigênio, como superóxidos, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais OH (Dixon *et al.*, 1994; Inzé & Van

Montagu, 1995; Apel & Hirt, 2004; Torres *et al.*, 2006), um processo denominado explosão oxidativa (*oxidative burst*) (Wojtaszek, 1997; Apel & Hirt, 2004)

O acúmulo de espécies ativas de oxigênio pode ocorrer em interações planta-patógeno compatíveis ou incompatíveis (Lamb *et al.*, 1989; Lamb & Dixon, 1997) e a concentração dessas moléculas aumenta rapidamente após a infecção por patógenos. No entanto, nas interações incompatíveis, a rápida acumulação é seguida de uma explosão de produção de H₂O₂, sendo assim denominada produção bifásica de espécies reativas de oxigênio. Nas interações compatíveis, somente a acumulação inicial ocorre (Apel & Hirt, 2004).

Espécies reativas de oxigênio podem reagir instantaneamente com proteínas, lipídios e DNA, causando rápido dano celular (Inzé & Van Montagu, 1995). No entanto, espécies ativas de oxigênio podem eliminar diretamente o patógeno devido à sua toxicidade. Peróxido de hidrogênio e superóxidos podem atuar ainda como mensageiros secundários na ativação de genes que atuam na defesa, e ambos estão envolvidos na formação de lignina, síntese de fitoalexinas, morte celular, RH e ativação da resistência sistêmica adquirida (Inzé & Van Montagu, 1995; Levine *et al.*, 1996; Pennel & Lamb, 1997; Bowler & Fluhr, 2000).

A explosão oxidativa está relacionada com o fluxo de cálcio livre intracelular, que por sua vez está também envolvido na transdução de sinal (Levine *et al.*, 1996; Scheel, 1998). Numerosos estudos descrevem a importância e relação entre espécies ativas de oxigênio e fluxo de cálcio livre, tanto em estresse biótico como também abiótico, sendo esses dois componentes da sinalização importantes pontos de intersecção entre ambos tipos de estresse (Bolwell, 1999; Bowler & Fluhr, 2000; Mittler *et al.*, 2004).

Cálcio (Ca) é um segundo mensageiro universal que atua como mediador, estimulando a resposta a diversas funções celulares. O aumento e acumulação de Ca²⁺ foi observado durante a RH em plantas resistentes a diferentes patógenos, mas não em plantas suscetíveis (Xu & Healt, 1998; Grant *et al.*, 2000). O aumento da concentração de hormônios vegetais

importantes no que se refere ao estresse, Etileno e ácido abscísico (ABA), está relacionado com o aumento da concentração de Ca^{2+} (Resende *et al.*, 2007; Inácio *et al.*, 2011). Outras moléculas dependentes de cálcio com importância na transdução de sinais da defesa planta-patógeno são as proteínas quinases cálcio dependentes, como a serina quinase e a treonina quinase, cujo silenciamento leva à redução da resposta hipersensível de defesa (Romeis *et al.*, 2001).

Na célula em repouso, o Ca^{2+} é mantido em concentrações baixas devido à sua toxicidade, por isso, tanto o aumento da sua concentração durante o reconhecimento quanto o retorno a níveis basais ocorrem rapidamente (Medeiros *et al.*, 2003). De fato, moléculas que retiram o Ca^{2+} e espécies ativas em oxigênio do plasma celular, como a calmodulina, proteínas ligantes de cálcio, superóxido dismutases e peroxidases, agem na regulação dessas moléculas de forma que elas possam atuar no processo de defesa sem provocar danos extensivos ao organismo. Mudanças na homeostase para espécies oxidantes e cálcio são consequência de estresses biótico e abiótico. No entanto, embora muitas vias de resposta ao estresse sejam conservadas, elas podem ser diferentes dependendo do elicitador. Assim, a produção de Ca^{2+} pode aumentar e a de EAO (espécies ativas de oxigênio, em inglês: *reactive oxygen species* – ROS) diminuir, ou o contrário, ou mesmo ambas podem ter suas concentrações aumentadas ou diminuídas ao mesmo tempo (Inzé & Van Montagu, 1995; Bowler & Fluhr, 2000).

Durante e após o reconhecimento e transdução de sinais, ocorrem mudanças bioquímicas e estruturais na célula, aumento na expressão de genes relacionados à resistência, como os de fitoalexinas e inibidores de protease, acúmulo de calose e lignina na parede celular, alterações celulares que levam à morte e infiltração de compostos fenólicos no sítio de infecção (Benhamou & Nicole, 1999). O ácido protocatecólico e o ácido clorogênico fazem parte da defesa passiva pré-formada e estão presentes em lugares onde potencialmente o patógeno possa infectar, mas não são sintetizados em resposta à presença do mesmo. Os

compostos fenólicos sintetizados na resposta ativa, como a gliceolina, lignina (que aumenta nos tecidos localizados) e o ácido salicílico (AS) são importantes fatores na resposta de hipersensibilidade, reforço da parede celular e resistência sistêmica adquirida (Lo & Nicholson, 2008).

No cafeeiro, o ácido clorogênico foi o principal composto fenólico presente, encontrado nas folhas e grãos (Malta *et al.*, 2001; Salgado, 2009). A quantificação de ácido clorogênico variou entre 5% e 7,5% para *C. arabica* (Illy & Viani, 1995) e 3,3% e 6,3% nos grãos (Aguiar *et al.*, 2005) para diferentes genótipos de *C. canephora*, estando presente em maior quantidade na variedade Apatã (5,99%) e em menor quantidade em Conilon 66 (5,70%) (Aguiar *et al.*, 2005). Mortalidade de juvenis de *M. incognita* foi observada quando esses foram expostos a exsudados de calos de *C. arabica*, onde foram observados níveis consideráveis de ácido clorogênico (Rocha & Campos, 2004). Em batata, a quantidade de ácido clorogênico nos tubérculos não teve relação com a quantidade de juvenis e ovos de *M. javanica* inoculados (Schafer *et al.*, 2014).

Lignina é um importante componente na defesa contra patógenos em geral. Consiste em uma molécula formada pela polimerização de álcoois, muito abundante na natureza por ser um dos principais componentes da célula vegetal (Lebo *et al.*, 2001). Essa macromolécula é formada na via dos fenilpropanóides a partir de dois aminoácidos, tirosina e fenilalanina, e sua síntese é regulada principalmente pela enzima fenilalanina amônia liase, considerada chave nesse processo (Medeiros *et al.*, 2003). Falando especificamente de interação planta-patógeno, a lignina não somente atua na resistência física como também fornece moléculas importantes na defesa química, através do seu catabolismo, o qual gera compostos fenólicos que têm papel chave na defesa. Ao avaliar o papel dos fenóis na defesa contra *Radopholus similis* em bananeiras resistentes, observou-se que estes compostos se acumularam e infiltraram em áreas adjacentes ao patógeno, aumentando o nível de lignificação dos tecidos

vasculares e conseqüentemente alterando o padrão de ultraestrutura do nematoide e causando baixa produção de ovos nos indivíduos resistentes (Benhamou & Nicole 1999).

As peroxidases são enzimas que catalisam reações de oxidação usando H_2O_2 como aceptor de elétrons e atuam em vários processos, como eliminação de espécies ativas de oxigênio, juntamente com a catalase, e lignificação (Walter, 1992; Medeiros *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2010). Isoperoxidasas foram detectadas em tomateiros resistentes e suscetíveis, infectados ou não por *Meloidogyne*, embora induzidas de forma diferente, dependendo do genótipo da hospedeira. Na planta resistente, a atividade da peroxidase foi maior na parede celular, sendo associada ao último passo de deposição de lignina na célula, enquanto na planta suscetível sua atividade foi maior no citoplasma, onde ela atuou na produção de etileno (Molinari, 1991).

Mudanças na atividade da peroxidase foram observadas durante a infecção por *M. incognita* em tomateiros, onde houve ligeiro aumento na atividade dessa enzima nos genótipos suscetíveis, enquanto nos genótipos resistentes a atividade dobrou, particularmente da peroxidase aniônica envolvida na lignificação (Zacheo *et al.*, 1993). Em tomateiros portadores do gene *Mi*, a atividade da peroxidase está intimamente relacionada com a temperatura; temperaturas maiores que 28°C inativam gradualmente o gene, e com isso há uma redução da atividade dessa enzima, da lignificação e da resposta de hipersensibilidade. O gene *Shpx6b* foi o primeiro gene identificado que codifica peroxidases em plantas, e demonstrou ser induzido tanto por agentes patogênicos (fungo) quanto pelo e metiljasmonato (MeJA) (Curtis *et al.*, 1997).

Os eventos relacionados à resistência da planta poderão atingir tecidos além do sítio de infecção, protegendo-a como um todo contra futuros ataques de organismos fitopatogênicos, em um processo denominado resistência sistêmica (Ryals *et al.*, 1996). A resistência sistêmica adquirida pode ser comparada à imunização em animais, embora os mecanismos sejam

diferentes. Os sinais produzidos no sítio de infecção irão para outras partes da planta a fim de imunizá-la.

Diversos componentes bioquímicos e moleculares que atuam no processo de resistência, local ou sistêmica, a fitopatógenos (estresse biótico) também fazem parte das vias metabólicas que protegem a planta contra estresses abióticos, como a deficiência hídrica. Temos como exemplo fatores de transcrição (Glombitza *et al.*, 2004; Schluttenhofer & Yuan, 2014) e fito-hormônios, como o ácido jasmônico e o etileno (Apel & Hirt, 2004; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Santino *et al.*, 2013), o H₂O₂, enzimas envolvidas na produção e degradação de espécies reativas de oxigênio e quinases (Apel & Hirt, 2004). O ABA é um fito-hormônio relacionado ao estresse hídrico, mas as vias relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio atuam como ponto de conexão entre as vias de proteção a estresse biótico e abiótico mediadas por ABA (Apel & Hirt, 2004). Além disso, o ABA pode atuar positivamente ou mesmo aumentar a suscetibilidade da planta a patógenos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Um resumo dos eventos bioquímicos relacionados à resposta que leva à resistência, particularmente a fitonematoides, se encontra na Figura 1.7.

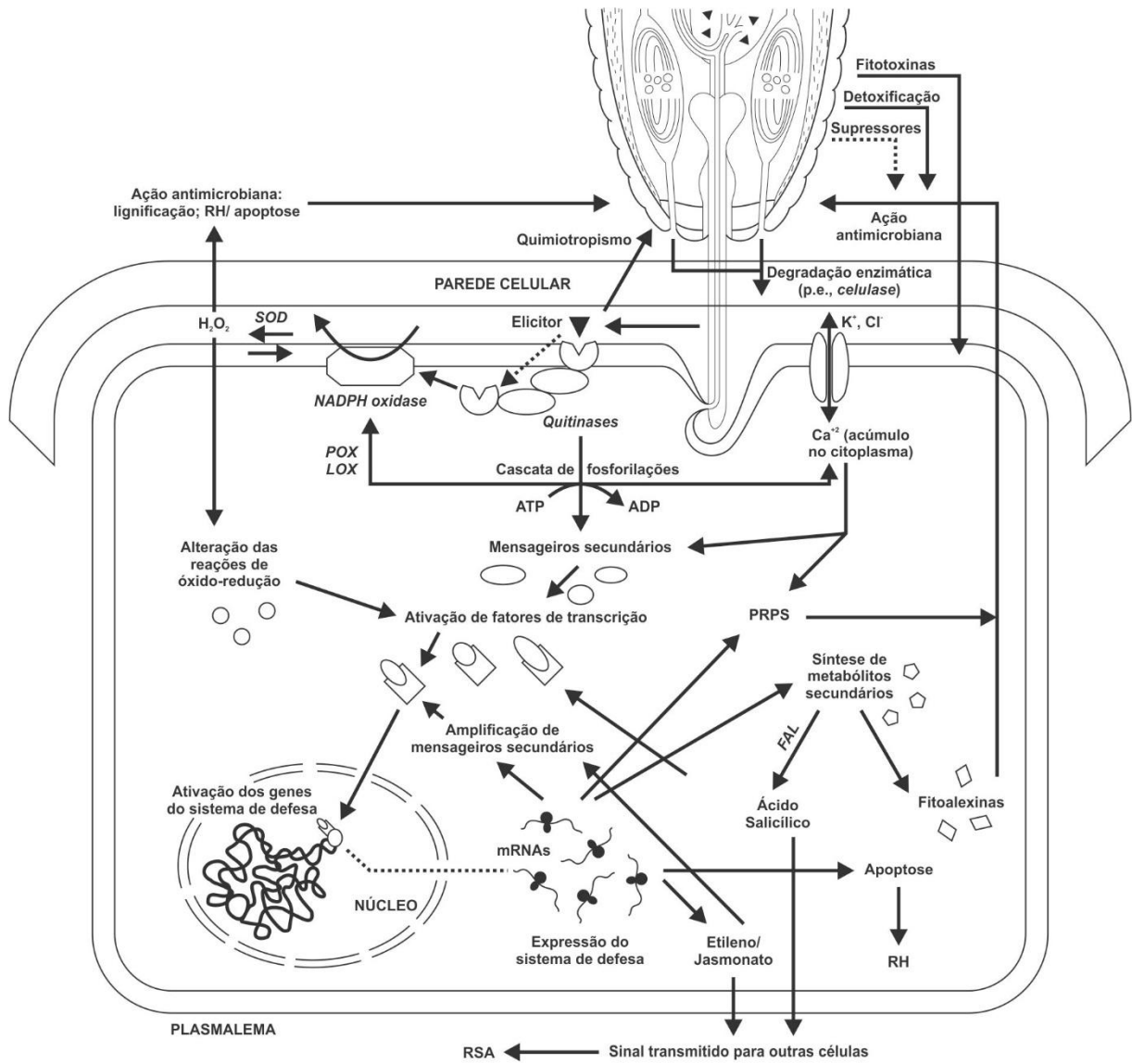


Figura 1.7. Eventos bioquímicos que ocorrem dentro e ao redor da célula infectada por fitonematóides (modificado de Medeiros *et al.*, 2003).

Capítulo 2 – Resistência genética de genótipos de cafeeiro *C. canephora* Conilon a *Meloidogyne* spp.

2.1. Introdução

Nematoides das galhas, *Meloidogyne* spp., tornaram-se uma grande ameaça para a maioria das áreas de cultivo de café em todo o mundo. Entre as espécies mais prejudiciais, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis*, constituem uma restrição agrônômica grave devido aos danos causados e ampla distribuição na América Central e América do Sul (Gonçalves *et al.*, 2004; Campos & Villain, 2005; Ito *et al.*, 2009). O manejo adequado, a fim de controlar essas espécies de nematoides, tem se mostrado eficiente em muitas culturas, no entanto, sendo o cafeeiro uma planta perene, muitas dessas estratégias podem não funcionar, permitindo a reprodução e disseminação do patógeno (Ito *et al.*, 2009). Além disso, o uso de nematicidas, assim como de outros agrotóxicos, vem intensificando problemas relacionados com a saúde humana e ao meio ambiente como um todo (Alves Filho, 2002).

Controle baseado na resistência genética dos nematoides das galhas é um componente essencial para uma estratégia de manejo integrado de pragas, uma vez que o uso de cultivares resistentes ou porta-enxertos constitui um método eficaz, barato, e não poluente de controle (Gonçalves *et al.*, 1998; Bertrand & Anthony, 2008). Muitos são os estudos com o intuito de identificar plantas resistentes a *Meloidogyne* spp. A resistência a *M. exigua* foi procurada no germoplasma de café de vários países (Brasil, Colômbia e América Central). Não foi encontrada resistência a este nematoide em cultivares de *C. arabica* comumente usados como Caturra, Catuaí, Mundo Novo, dentre outros, nem em cafeeiros silvestres recolhidos na Etiópia (Arango *et al.*, 1982; Bertrand *et al.*, 1995). Em contraste, vários acessos resistentes foram identificados em *C. canephora* e em alguns híbridos interespecíficos resultantes de cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora* (Curi *et al.*, 1970; Bertrand *et al.*, 1995, 1997; Gonçalves & Pereira, 1998; Silvarolla *et al.*, 1998; Anthony *et al.*, 2003). Considerando

apenas *C. arabica*, todas as cultivares foram consideradas suscetíveis a *M. incognita* (Gonçalves & Ferraz, 1987) e *M. paranaensis* (Anzueto *et al.*, 1991, 2001), enquanto numerosos cafeeiros selvagens da Etiópia foram considerados resistentes a *M. paranaensis* (Anzueto *et al.*, 1991, 2001; Boisseau *et al.*, 2009).

Quanto a *C. canephora*, essa espécie de cafeeiro tem se mostrado como promissora fonte de resistência a *Meloidogyne* spp. Como exemplo, tem-se o uso de porta-enxertos multirresistentes como Nemaya (cruzamento entre *C. canephora* clones T3561 e T3751), cultivado na América Central, e Aboatã IAC 2258 (*C. canephora* cv 2258 da coleção de germoplasma Catie, Turrialba, Costa Rica) usado no Brasil. Ambos foram desenvolvidos para superar o principal problema associado com nematoide das galhas nesses dois países produtores (Anzueto *et al.*, 1996; Fazuoli *et al.*, 2002). Enxertar cultivares de *C. arabica* em “Nemaya” ou “Aboatã” tem sido a única medida de controle viável que permite retorno econômico dos cafeeiros plantados em áreas infestadas com *M. incognita*, *M. paranaensis* e *M. arabicida*. No entanto, os porta-enxertos Aboatã e Nemaya mostraram intolerância à seca em condições de campo*, o que pode ser um problema, principalmente no Brasil, onde as condições ambientais para o cultivo do cafeeiro são diversas e a deficiência hídrica é o principal fator limitante à produção (Silva *et al.*, 2010). Esforços devem ser feitos a fim de buscar o melhoramento do cafeeiro para multirresistência a patógenos e tolerância à escassez de água.

2.2. Objetivos

Identificar clones de *C. canephora* com resistência múltipla a *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* visando à produção de sementes de porta enxertos resistentes para cultivares de *C. arabica*, assim como, no plantio como pés-francos de *C. canephora* em áreas infestadas por *Meloidogyne* spp. e aptas ao cultivo desse cafeeiro.

*W. Gonçalves, IAC, São Paulo, Brasil (comunicação pessoal)

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Clones de *C. canephora* usados nos ensaios de seleção para a resistência a

***Meloidogyne* spp.**

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Foram realizados dois ensaios: No primeiro foi utilizada a variedade clonal Vitória- INCAPER 8142, lançada em 2004 onde estão incluídos 13 clones superiores, selecionados entre os materiais genéticos considerados elite pelo programa de melhoramento genético do Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural (INCAPER) (clones 1V, 2V, 3V, 4V, 5V, 6V, 7V, 8V, 9V, 10V, 11V, 12V E 13V) (Fonseca *et al.*, 2004a, 2004b; Ferrão *et al.*, 2005). Os outros 13 materiais utilizados no segundo estudo (ESN2010-01, ESN2010-02, ESN2010-03, ESN2010-04, ESN2010-05, ESN2010-06, ESN2010-07, ESN2010-08, ESN2010-09, ESN2010-10, ESN2010-11, ESN2010-12 e ESN2010-13') também são genótipos que apresentaram características agrônômicas superiores em programas de melhoramento do INCAPER e são promissores para programas de melhoramento de variedades, incluindo resistência à ferrugem. Os clones 14 e 120 foram selecionados pela tolerância à seca, enquanto clones 109A e 22 são sensíveis à seca (DaMatta *et al.*, 2000; DaMatta *et al.*, 2003; Ferrão *et al.*, 2009). A cultivar Catuaí Vermelho IAC 81 foi utilizada como controle suscetível à *Meloidogyne* spp. (Ribeiro *et al.*, 2005; Sera *et al.*, 2007)

2.3.2. Populações de *Meloidogyne* spp.

Cinco populações de *Meloidogyne* spp. do Brasil e uma população proveniente da Costa Rica foram utilizados nesta pesquisa. As espécies foram identificadas utilizando os fenótipos de esterase (EST) (Carneiro & Almeida, 2001) e SCAR-PCR (Randig *et al.*, 2002). Raças de *M. incognita* foram caracterizadas de acordo com Hartman & Sasser (1985). Essas populações foram multiplicadas em casa de vegetação em tomateiros e cafeeiros para evitar uma eventual

erosão da patogenicidade sobre café (Carneiro & Jorge, 2001). As populações utilizadas e seus respectivos fenótipos de esterase foram: *Meloidogyne paranaensis* (Est P1) de Apucarana-PR; *M. incognita* raça 1 (Est I1) de Avilândia-SP; *M. incognita* raça 3 (Est I2) de Londrina-PR; *M. exigua* população virulenta (Est E1) de Bom Jesus de Itabapoana-RJ; *M. exigua* população avirulenta (Est E2) de Lavras-MG; e *M. arabicida* (Est AR2) Turrialba, Costa Rica. Para trabalhar com esta última espécie, foram observados todos os cuidados relacionados à inoculação e descarte de raízes, de acordo com as normas da Embrapa-Cenargen e com a devida autorização do Ministério da Agricultura. A população virulenta de *M. exigua* é capaz de quebrar a resistência da cultivar IAPAR 59.

2.3.3. Inoculação

Antes da inoculação, as populações de *Meloidogyne* foram multiplicadas em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara), durante três meses em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos a partir de raízes infectadas (Hussey & Barker, 1973), utilizando 0,5% de hipoclorito de sódio e um liquidificador. A contagem dos ovos foi feita sob microscópio de luz, usando câmara de Peters. A concentração da suspensão de ovos foi determinada por contagem de três alíquotas de 1mL. Quando as plantas estavam com seis pares de folhas ou mais, foram inoculadas com suspensão de 10.000 ovos/planta.

As plantas (mudas) de cada acesso foram cultivadas em vasos de 3 L preenchidos com uma mistura (1:1) de solo autoclavado e composto Plantimax[®] em casa de vegetação. Os ensaios de avaliação da resistência foram realizados, em dois experimentos separados. A cultivar de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho IAC 81 foi usada como testemunha suscetível, em todos os ensaios. No primeiro ensaio, foram testados os clones: INCAPER 8142 (V1 a V13), 14 (tolerante à seca) e 22 (suscetível à seca). No segundo ensaio foram incluídos os clones ESN2010-01 a ESN2010-13 e também, os genótipos 109A e 120.

Mudas de cafeeiro, com cerca de 20-25cm de altura, 4-6 pares de folhas, foram inoculadas com 10.000 ovos de *Meloidogyne* spp., pipetando a suspensão de nematoides (entre 2-5ml) em torno da base do caule. As plantas de cafeeiro inoculadas foram dispostas em um delineamento experimental, inteiramente casualizado, com 96 tratamentos (16 genótipos de café x 6 populações de *Meloidogyne* spp.) e seis repetições e foram mantidos em casa de vegetação em temperatura entre 25-30°C, com a rega, adubação e pulverizações conforme necessário. No terceiro ensaio foram repetidas as variedades clonais (14, 22) e a testemunha (IAC 81) em relação a *M. paranaensis* e *M. incognita*, usando o mesmo delineamento dos estudos anteriores. No quinto ensaio, as variedades clonais 14 e 22 e a testemunha (IAC 81) foram testadas quanto à reação a *M. arabicida*.

2.3.4. Avaliação da resistência aos nematoides em condições controladas

Oito meses após a inoculação, os sistemas radiculares foram lavados com água e pesados. As raízes foram coradas com floxina B e observadas para serem avaliados o número de galhas e de massa de ovos de acordo com a escala de Taylor & Sasser (1978) de 0-5 onde, 0 = nenhuma galha ou massa de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; e nota 5 acima de 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular.

Os ovos foram extraídos usando a mesma metodologia da inoculação, onde as raízes foram batidas em liquidificador por 1min com solução de hipoclorito de sódio (agora a 1%). Após o processamento, a suspensão foi passada em um conjunto de três peneiras de 45, 200 e 500 mesh e, lavada com água corrente. Na última peneira (500 mesh), onde ficam retidos os ovos, a suspensão foi recolhida em alíquotas de 100mL por planta extraída. Três alíquotas de 1mL de cada suspensão foram retiradas e colocadas em lâmina de Peters para quantificação dos ovos.

O fator de reprodução (FR) foi calculado pela fórmula $FR = PF/PI$, onde PF = população final de nematoides e PI = população inicial de nematoides (PI = 10.000). As médias dos FRs foram transformadas em $\log(x + 1)$, submetidas às análises de variância e as médias separadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). De acordo com as análises estatísticas e os critérios de Sasser *et al.* (1984) acessos para os quais $FR = 0$ e $FR < 1$ foram considerados imunes e altamente resistentes (AR) respectivamente, enquanto aqueles para os quais $FR \geq 1$ foram considerados moderadamente resistente (MR) ou suscetíveis (S).

2.3.5. Ensaio para avaliar presença de *Meloidogyne* no solo

Genótipos previamente selecionados de cafeeiro Conilon, clones 14 e 22, e o cafeeiro Catuaí IAC 81 foram inoculados com 10.000 ovos/planta. Oito meses após a inoculação, o sistema radicular foi lavado com água da torneira e, por meio do método de Hussey & Barker (1973) para extração dos ovos, substituindo a agitação manual por liquidificador e utilizando hipoclorito de sódio a 1%. Para extração de nematoides do solo foi empregada a metodologia descrita por Jenkins (1964) que é uma combinação do método de flutuação peneiramento e em centrífuga.

Foram retiradas amostras de 250cm³ de solo que foram processadas de acordo com a metodologia acima citada. Primeiramente, as alíquotas de solo obtidas das amostras bem homogêneas e depois lavadas sobre peneira de 20 *mesh* com o uso de um balde de 10 litros até completar a metade de sua capacidade. Após, a mistura água e solo foi deixada em repouso por 30 s. Verteu-se o sobrenadante em peneira de 500 *mesh* e o que foi retido foi transferido para um béquer e depois a suspensão foi distribuída em tubos de 50mL. As suspensões foram centrifugadas por 5min. a 360g. Em seguida à centrifugação, descartou-se o líquido sobrenadante, limpou-se a parede do tubo próximo à borda para eliminar possíveis partículas orgânicas e adicionou-se, em cada tubo, solução de sacarose com densidade=1,18

(475 gramas de sacarose por litro de solução) até que os pesos dos tubos estivessem balanceados. Misturou-se, então sedimento e solução de sacarose até que estivesse homogêneo e a suspensão foi novamente centrifugada por 1min. Em seguida, o líquido sobrenadante passou novamente pela peneira de 500 *mesh* e a solução de açúcar foi lavada em água corrente. O material retido pela peneira de 500 *mesh* foi colhido e armazenado a 4°C para observação e contagem dos juvenis de *Meloidogyne*.

2.4. Resultados

A resistência foi avaliada com base em três critérios: índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO) e fator de reprodução (FR). Como esperado, a cultivar suscetível ‘Catuaí cv IAC 81’ exibiu altos índice de galhas e de massa de ovos e, também, alto valor de fator reprodução do nematoide (FR). Pela interpretação estatística verificou-se que IG e IMO foram correlacionados com infecção no cafeeiro (FR) para *M. exigua* ($r = 0,58-0,71$; $0,35-0,78$, respectivamente), mas, algumas vezes, com baixo coeficiente de correlação de Pearson. Para *M. incognita* e *M. paranaensis*, os IGs e IMOs não foram significativamente correlacionados com os FRs.

No primeiro ensaio, os clones INCAPER-Vitória 2V, 3V, 6V, 7V, 13V e clone 14 foram altamente resistentes (AR) à *M. paranaensis* – fator de reprodução (FR) < 1, enquanto os clones 1V, 4V, 5V, 10V, 12V e clone 22 foram suscetíveis (FR ≥ 1) (Tabela 2.1). Considerando-se a análise estatística, os clones 8V, 9V e 11V foram considerados moderadamente resistentes (MR) para esse nematoide.

Considerando-se a reação de genótipos de cafeeiro para *M. incognita*, o clone 14 foi o único resistente a ambas as raças testadas (raças 1 e 3), enquanto que os clones 2V, 3V, 6V, 8V e 13V foram AR a *M. incognita* raça 1 (Tabela 2.2). Os resultados demonstram que *M. incognita* raça 3 foi mais agressivo para genótipos de cafeeiro que *M. incognita* raça 1. Além

Tabela 2.1. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *Meloidogyne paranaensis* sob condições controladas.

Genótipo	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuaí cv IAC 81*	23,0	3,5	4,43	29,33a	S
1V	32,43	4,25	5,00	15,45a	S
2V	22,37	2,5	0,0	0,25d	AR
3V	21,69	2,75	0,125	0,6d	AR
4V	28,0	3,75	4,0	7,96b	S
5V	41,75	3,75	3,25	8,23b	S
6V	18,68	2,62	0,125	0,20d	AR
7V	20,81	2,87	2,25	0,61d	AR
8V	48,87	3,37	0,125	2,3c	MR
9V	30,12	3,12	2,125	1,35c	MR
10V	30,25	4,37	4,0	8,41b	S
11V	29,44	3,5	3,0	1,53c	MR
12V	32,93	3,5	4,625	7,38b	S
13V	18,09	2,37	1,875	0,35d	AR
Clone 14	16,25	3,0	0,0	0,51d	AR
Clone 22	32,5	12,5	3,5	15,06a	S

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 22%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

disso, os clones de 6V e 8V foram AR e MR para *M. incognita* raças 1 e 3, respectivamente, enquanto os clones 3V e 13V foram considerados AR para *M. incognita* raça 1 e suscetíveis (S) para a raça 3 (Tabela 2.2).

A população de *M. exigua* avirulenta teve uma taxa de reprodução baixa na maioria dos clones (FR < 1) e quase todos os clones foram considerados AR (Tabela 2.3). Os clones 10V e 13V foram considerados MR em relação à população avirulenta de *M. exigua*. Quanto à

Tabela 2.2. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3 sob condições controladas.

Genótipo	<i>M. incognita</i> raça 3					<i>M. incognita</i> raça 1				
	MFR (g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c	MFR (g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuaí cv IAC 81*	42,43	1,88	4,87	111,8a	S	45,75	4,87	5,0	30,83a	S
1V	52,56	3,13	5,0	34a	S	23,44	4,0	4,25	13,8b	S
2V	27,87	2,75	4,25	4,08b	S	38,81	1,75	2,62	0,68d	AR
3V	42,93	2,5	2,62	6,35b	S	54,50	2,75	0,37	0,78d	AR
4V	36,06	2,0	4,37	10,01b	S	20,94	2,87	3,87	11,18b	S
5V	14,31	3,0	4,87	6,31b	S	55,56	2,62	4,0	2,38c	S
6V	24,12	2,75	1,75	2,0c	MR	14,12	1,87	0,5	0,01d	AR
7V	45,43	3,5	5,0	10,61b	S	24,12	2,75	3,12	1,01c	S
8V	71,37	3,13	1,5	2,48c	MR	33,12	2,62	0,0	0,28d	AR
9V	51,75	3,25	3,75	5,76b	S	46,12	3,75	3,5	2,35c	S
10V	43,56	3,63	4,12	9,95b	S	14,37	3,12	3,75	4,88b	S
11V	66,00	3,38	3,87	7,73b	S	59,64	3,12	4,25	5,1b	S
12V	72,18	1,63	5,0	16,28a	S	39,12	2,87	4,0	1,53c	S
13V	45,57	2,0	4,0	6,20b	S	16,69	2,5	2,25	0,71d	AR
Clone 14	20,26	2,2	0,5	0,26d	AR	43,00	2,16	0,0	0,04d	AR
Clone 22	58,81	3,38	3,87	5,10b	S	23,64	3,29	4,71	12,05b	S

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 28%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

população virulenta de *M. exigua*, os genótipos 1V, 2V, 4V, 5V, 7V, 9V, 11V, 12V e clone 14 foram AR (FR < 1) (Tabela 2.3). Os outros clones, 3V, 6V, 8V, 10V, 13V e 22, mostraram $FR \geq 1$ e foram considerados S ou MR.

No segundo ensaio, além do controle “Catuaí cv IAC 81”, os genótipos clone 109A, clone 120, clones ES N2010-06, 07, 08, 09, 10 e 12 foram suscetíveis a *M. paranaensis*. Os clones ES N2010-01, 02, 03, 05 e 11 foram classificadas como MR, enquanto os genótipos

Tabela 2.3. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com populações virulentas e avirulentas de *Meloidogyne exigua* sob condições controladas.

Genótipo	<i>M. exigua</i> virulenta					<i>M. exigua</i> avirulenta				
	MFR (g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c	MFR (g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuai cv IAC 81*	47,44	4,88	3,88	78,92a	S	59,37	5,0	4,5	53,4a	S
1V	34,71	4,29	3,29	0,84c	AR	48,07	0,29	0,57	0,82c	R
2V	20,75	2,13	0,0	0,02d	AR	46,94	0,0	0,0	0,0c	I
3V	42,61	4,78	2,78	20,93b	S	62,94	1,88	0,38	0,08c	R
4V	43,0	3,5	0,33	0,02d	AR	38,44	0,25	0,13	0,07c	R
5V	32,21	3,86	0,57	0,02d	AR	37,62	0,0	1,0	0,05c	R
6V	25,69	2,88	1,0	10,7b	S	37,69	0,0	0,0	0,0c	I
7V	51,56	3,63	0,0	0,0d	I	35,25	1,88	0,0	0,0c	I
8V	60,94	3,88	1,5	1,07c	MR	62,0	0,0	0,25	0,03c	R
9V	59,31	2,75	0,38	0,02d	AR	56,0	0,0	0,0	0,06c	R
10V	45,0	3,86	1,71	7,05b	S	41,18	0,38	3,38	3,82b	MR
11V	48,94	3,88	0,13	0,05d	AR	33,25	1,63	0,75	0,18c	R
12V	45,75	1,83	0,0	0,84d	AR	62,87	0,0	1,38	0,4c	R
13V	25,5	2,25	2,20	2,45c	MR	39,72	0,78	1,56	1,44b	MR
Clone 14	38,92	2,83	0,0	0,04d	AR	47,33	0,0	0,0	0,0c	I
Clone 22	21,69	4,25	3,38	7,9b	S	40,18	0,5	1,5	0,08c	R

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 32%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

ES N2010-04 e ES N2010-13 foram AR para *M. paranaensis* (Tabela 2.4). Quanto a *M. incognita* raça 3, a maioria dos genótipos testados foi classificada como suscetível, exceto ES N2010-04, classificado como MR. No que se refere a *M. incognita* raça 1, o clone ES N2010-04 foi classificado como AR e os clones ES N2010-03 e ES N2010-13 como MR. Os genótipos 109A, 120 e ES N2010-01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 e 12 foram todos suscetíveis para essa população do nematoide (Tabela 2.5).

Tabela 2.4. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *Meloidogyne paranaensis* sob condições controladas.

Genótipo	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuaí cv IAC 81*	29,58	4,17	4,33	11,66a	S
Clone 109 A	136,83	5,0	5,0	16,64a	S
Clone 120	100,0	4,8	3,8	4,13b	S
ES N2010-01	158,83	3,33	3,0	2,19c	MR
ES N2010-02	120,67	4,83	4,5	1,91c	MR
ES N2010-03	134,08	3,83	2,67	2,19c	MR
ES N2010-04	64,08	2,0	0,17	0,0d	I
ES N2010-05	70,67	3,83	3,0	2,32c	MR
ES N2010-06	230,33	3,67	3,5	3,85b	S
ES N2010-07	145,83	4,83	4,5	5,88b	S
ES N2010-08	174,25	5,0	4,33	11,88a	S
ES N2010-09	119,5	4,83	4,67	11,75a	S
ES N2010-10	99,67	5,0	4,83	8,47a	S
ES N2010-11	123,5	3,83	3,83	2,04c	MR
ES N2010-12	120,92	4,67	4,67	13,96a	S
ES N2010-13	108,83	3,0	2,67	0,39d	AR

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 29%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

Para a população avirulenta de *M. exigua*, a maioria dos genótipos foi AR (clones 109A e 120, ES N2010-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12 e 13). Apenas o controle Catuaí cv. IAC 81 e os genótipos ES N2010-09 permitiram uma alta e mediana reprodução da população avirulenta de *M. exigua* respectivamente. Os genótipos inoculados com *M. exigua* população virulenta (clones 109A e 120, ES N2010-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12 e 13) foram todos AR ou I, com exceção do genótipo ES N2010-09 comportou-se como MR

Tabela 2.5. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3 sob condições controladas.

Genótipo	<i>M. incognita</i> raça 3					<i>M. incognita</i> raça 1				
	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuai cv IAC 81*	98,0	5,0	5,0	190,3a	S	64,83	4,0	4,67	44,62a	S
Clone 109 A	140,92	5,0	5,0	35,76b	S	178,17	5,0	5,0	39,66a	S
Clone 120	79,7	5,0	5,0	16,32c	S	99,75	5,0	5,0	16,0b	S
ES N2010-01	111,25	5,0	5,0	21,35c	S	168,8	5,0	5,0	9,81b	S
ES N2010-02	104,75	5,0	5,0	13,5c	S	120,58	5,0	5,0	13,19b	S
ES N2010-03	19,06	5,0	5,0	37,16b	S	159,0	4,83	4,5	4,60c	MR
ES N2010-04	150,08	4,83	3,83	2,29d	MR	123,0	1,17	0,0	0,0d	I
ES N2010-05	27,6	4,4	3,8	6,91c	S	76,9	3,67	3,67	11,29b	S
ES N2010-06	141,92	5,0	5,0	12,65c	S	201,83	5,0	5,0	38,82a	S
ES N2010-07	191,17	5,0	5,0	49,96b	S	122,92	5,0	5,0	16,51b	S
ES N2010-08	214,2	5,0	5,0	50,52b	S	201,33	5,0	5,0	37,16a	S
ES N2010-09	126,67	5,0	5,0	27,36b	S	112,5	5,0	5,0	31,1a	S
ES N2010-10	64,33	5,0	5,0	10,84c	S	103,83	5,0	5,0	47,83a	S
ES N2010-11	151,42	5,0	5,0	50,83b	S	170,42	5,0	5,0	59,24a	S
ES N2010-12	105,67	5,0	5,0	38,71b	S	83,83	5,0	5,0	22,67a	S
ES N2010-13	105,4	4,83	4,67	17,38c	S	105,42	4,83	4,83	4,84c	MR

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10,000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 35%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

(Tabela 2.6).

Os clones 14 (AR) e o clone 22 (S) foram novamente testados para corroborar a resistência observada contra *M. incognita* raça 3 e *M. paranaensis*, e a respectiva resistência e suscetibilidade de ambos os genótipos foram confirmados neste terceiro ensaio (Tabela 2.7). Com o intuito de observar o comportamento dos clones 14 e 22 frente a uma espécie exótica de *Meloidogyne*, realizou-se um quarto ensaio onde esses clones foram inoculados com *M.*

Tabela 2.6. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com populações virulentas e avirulentas de *Meloidogyne exigua* sob condições controladas.

Genótipo	<i>M. exigua</i> virulenta					<i>M. exigua</i> avirulenta				
	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuai cv IAC 81*	155,92	5,0	4,67	125,6a	S	118,92	3,83	1,17	17,89a	S
Clone 109 A	179,78	0,18	0,0	0,02c	AR	211,17	0,0	0,0	0,01b	AR
Clone 120	106,83	0,0	0,0	0,04c	AR	77,67	0,0	0,0	0,01b	AR
ES N2010-01	160,33	1,33	0,33	0,02c	AR	147,25	0,17	0,0	0,0b	I
ES N2010-02	92,42	1,33	0,0	0,04c	AR	114,25	0,0	0,0	0,01b	AR
ES N2010-03	108,5	0,0	0,0	0,02c	AR	187,9	0,0	0,0	0,0b	I
ES N2010-04	125,6	0,2	0,0	0,02c	AR	109,4	0,0	0,0	0,0b	I
ES N2010-05	88,9	0,2	0,0	0,27c	AR	45,5	0,0	0,0	0,0b	I
ES N2010-06	254,08	0,0	0,0	0,0c	I	187,17	0,0	0,0	0,03b	AR
ES N2010-07	158,83	0,0	0,0	0,0c	I	117,42	0,0	0,0	0,01b	AR
ES N2010-08	183,08	2,33	1,83	0,08c	AR	272,42	0,0	0,0	0,03b	AR
ES N2010-09	200,92	4,17	3,0	5,13b	MR	194,8	4,33	3,83	23,73a	S
ES N2010-10	130,5	1,33	0,66	0,26c	AR	223,5	0,0	0,0	0,11b	AR
ES N2010-11	86,67	0,67	0,33	0,01c	AR	125,67	0,0	0,0	0,03b	AR
ES N2010-12	63,42	1,0	0,5	0,15c	AR	66,5	0,0	0,0	0,01b	AR
ES N2010-13	119,5	0,33	0,17	0,0c	I	151,0	0,0	0,0	0,0b	I

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10,000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 27%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

Tabela 2.7. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. paranaensis* sob condições controladas.

Genótipo	<i>M. incognita</i> raça 3					<i>M. paranaensis</i>				
	MFR(g)	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c	MFR	IG ^a	IMO ^a	FR ^b	R ^c
Catuai cv IAC 81*	44,3	4,9	4,8	36,2 a	S	46,2	4,5	5,0	32,5	S
Clone 14	40,6	2,2	0,5	0,28 c	R	43,0	2,2	0,0	0,35	R
Clone 22	56,1	3,4	4,7	8,4 b	S	38,4	3,28	4,71	18,05	S

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou

massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. paranaensis*), transformados para $\log(x+1)$. Valores seguidos de letras diferentes na coluna são significativamente de acordo com o teste Scott-Knott ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 21%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade.

arabica, uma espécie proveniente da Costa Rica. Como resultado, ambos os clones foram R a esse patógeno, ao contrário do controle Catuaí cv IAC 81, que foi S (Tabela 2.8).

Com o intuito de observar a influência da avaliação do número de J2 no solo no cálculo do FR, realizou-se o quinto ensaio. O acréscimo do número de J2 no cálculo dos valores de FR não interferiu de maneira significativa no resultado final para ambos os clones. (Tabela 2.9). Dessa maneira, pode-se concluir que, apenas a avaliação do número total de ovos no sistema radicular é essencial para o cálculo dos FRs.

2.5. Discussão

A identificação e seleção de clones de *C. canephora* combinando tolerância à seca com outras características agronômicas (produtividade e vigor) e de resistência múltipla aos nematoides das galhas é de particular interesse para gerar novas cultivares melhores adaptadas às mudanças climáticas e aos estresses bióticos (Fonseca *et al.*, 2004a; Ferrão *et al.*, 2010). O problema da falta de água é uma realidade no Brasil, não somente nas áreas onde tradicionalmente ocorriam estiagens periódicas, mas também em áreas do Sudeste brasileiro, onde se encontram as maiores áreas de cultivo do cafeeiro. Associar tolerância a seca à resistência a patógenos em plantas de interesse econômico é indiscutivelmente importante na atual conjectura de mudanças que vem ocorrendo no ambiente.

Não houve diferenças entre as populações de nematoides e genótipos de café testados

Tabela 2.8. Reação de genótipos de cafeeiro, oito meses após inoculação com *Meloidogyne arabicida* sob condições controladas.

Genótipo	MFR(g)	IMO ^a	IG ^a	FR ^b	R ^c
Catuai cv IAC 81	179,33	5	5	36,62a	S
Clone 22	202,83	1,83	0,33	0,15b	R
Clone 14	188,08	0	0	0,07b	R

^a Valores (n = 8) de massa fresca de raiz (MFR), índices de galha (IG) e massa de ovos (IMO) definidos em escala de 0-5: 0 = ausência de galhas ou massas de ovos; 1 = 1-2 galhas ou massas de ovos; 2 = 3-10 galhas ou massas de ovos; 3 = 11-30 galhas ou massas de ovos; 4 = 31-100 galhas ou massas de ovos; 5 = acima de 100 galhas ou massas de ovos (Taylor & Sasser, 1978).

^b Valores (n = 8) de fator de reprodução (FR = população final/10.000 ovos de *M. arabicida*), transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes nas colunas são significativamente diferentes, de acordo com o teste Scott-Knot ($P < 0.05$). Coeficiente de variação (CV) = 28%.

^c Reação de genótipos de café inoculados: S = suscetível; AR = altamente resistente; MR = moderadamente resistente, I = imune.

* Padrão de suscetibilidade

Tabela 2.9. Reação de genótipos de café, oito meses após inoculação com *M. incognita* em condições controladas.

Genótipo	MFR(g)	NTO	NTJ2	NTO + NTJ2	FR (Ovos)	FR (ovos + J2)
Clone 22	191,06	91.703,7	620,49	92.324,19	9,17a	9,23a
Clone 14	198,59	4.119,05	90,52	4.209,57	0,41b	0,42b

Valores (n = 8) Médias de massa fresca de raiz (MFR), número total de ovos/raiz (NTO), número total de J2s em 250cm³ de solo (NTJ2) e de fatores de reprodução (FR = população final/10.000 ovos), estas últimas transformados para log(x+1). Valores seguidos de letras diferentes nas colunas são significativamente diferentes, de acordo com o teste Scott-Knot ($P < 0,05$). Coeficiente de variação (CV) = 22%.

para os aspectos vegetativos, ou seja, as plantas não apresentaram sintomas na parte aéreas relacionados à infecção por *Meloidogyne*. Este fato ocorreu devido, provavelmente ao manejo de adubação praticado durante os oito meses de ensaio. O IG (índice de galhas) e o IMO (índice de massa de ovos) (Tabelas 2.1-2.8) foram, às vezes, parâmetros subjetivos, porque algumas espécies, como *M. exigua*, formam galhas típicas e outras não, como *M. paranaensis* e *M. incognita*. Em alguns casos, em raízes de cafeeiro, as massas de ovos não se estendem além do córtex da raiz e em outros, as massas de ovos emergem para fora das raízes e, por isso, puderam ser coradas com Floxina B. Devido a esses aspectos, estes dois parâmetros (IG

e IMO) são úteis para descrever os sintomas e sinais, mas não para avaliar o grau de infecção causado por nematoides. Dessa maneira, pode-se concluir que, a avaliação da infecção por esses dois nematoides, usando IGs e IMOs, não foi precisa e não deve ser usada em ensaios de resistência genética. Com base nestes resultados, as variáveis mais pertinentes para avaliar reação a *Meloidogyne* spp. em germoplasma de cafeeiros são: o número total de ovos, ovos por grama de raiz e o fator de reprodução (FR).

Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por Muniz *et al.*(2009) para *Coffea arabica* e são discordantes com as conclusões obtidas por Hernandez *et al.* (2004b), que consideraram os índices de galhas e massas de ovos como bons indicadores da taxa de multiplicação dos nematoides para diferentes espécies de *Meloidogyne* do cafeeiro. Considerando-se esses resultados contraditórios, foram incluídos como parâmetros no presente trabalho os índices de galhas e massas de ovos. Hussey & Boerma (1981) recomendaram um teste preliminar para determinar se há uma forte correlação entre IG, IMO e a reprodução do nematoide das galhas para diferentes culturas.

Todos os trinta genótipos de *C. canephora* estudados neste trabalho nunca haviam sido testados em relação a populações de *Meloidogyne* spp. Resultados com FRs pouco contrastantes foram obtidos por Contarato *et al.* (2009), que avaliaram os 13 clones da variedade Vitória, 180 dias após a inoculação (DAI) somente para *M. exigua*, sendo que, quatro clones, 3, 5, 8 e 13 foram classificados como moderadamente resistentes, o que difere dos resultados do presente trabalho, em que, grande parte dos clones dessa variedade foram resistentes. O critério de Moura & Regis (1987), não deve ser usado quando os FRs da testemunha são baixos e diferem pouco dos materiais testados, o que inviabilizam os resultados, pois materiais resistentes podem vir a ser considerados suscetíveis e vice-versa.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o clone 14 apresentou alta resistência múltipla a *M. exigua*, *M. incognita* raças 1 e 3, *M. paranaensis* e também a *M.*

arabica. Em contraste, o clone 22 foi suscetível a essas mesmas três espécies/populações, sendo classificado como resistente somente a *M. arabica*. Dessa maneira, conclui-se que o clone 14 foi resistente também a essa última espécie testada o que atesta a multirresistência a quatro espécies de *Meloidogyne*. Destaca-se, também, a boa resposta de alguns clones como o ES N2010-04 que apresentou resistência moderada a *M. incognita* raça 3.

Resistência específica a *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis* ou *Meloidogyne* spp. foi encontrada em algumas linhagens de germoplasma do cafeeiro, como revisto por Campos & Villain (2005) e Bertrand & Anthony (2008). No entanto, a resistência não é geralmente múltipla, isto é, restrito a uma ou duas espécies de *Meloidogyne*. Este foi o caso do deste estudo, em que alguns genótipos foram resistentes ou moderadamente resistentes a um ou duas espécies de *Meloidogyne*. A resistência múltipla em cafeeiro, quando observada, ocorre muitas vezes em relação a um, dois ou três tipos de patógenos diferentes, ou patógenos e pragas.

Campos & Villain (2005) observaram resistência em todos os 10 híbridos testados de Arabusta (Catuaí Vermelho X *C. canephora* cv. Robusta ou Guarini) a *M. exigua* e *Hemilea vastatrix*. Kanayama *et al.* (2009) avaliaram nove cultivares do IAPAR em relação à reação aos nematoides *M. paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2 e encontraram resistência em duas cultivares originadas de Sachimor e uma cultivar originada de Catucaí (proveniente do Icatu Vermelho), parcialmente resistentes a *M. incognita* raça 1. As demais cultivares foram suscetíveis às três populações de *Meloidogyne* estudadas. Resistência múltipla a *M. incognita* raça 1 e 2 e a *M. paranaensis* também foi observada por Sera *et al.* (2005, 2006) ao avaliarem progênies de *C. canephora*, população robusta, com a finalidade de selecionar os melhores porta-enxertos. No entanto, as plantas resistentes não responderam da mesma forma aos três nematoides testados, variando de resistente a moderadamente resistente.

Cabos *et al.* (2010) observaram que *C. canephora* “Nemaya” apresentou

desenvolvimento vigoroso e baixa reprodução de dois nematoides das galhas, *M. hapla* e *M. konaensis* no Havaí. Mas, a resistência variou de indivíduo para indivíduo testado devido à segregação dessa espécie de cafeeiro. “Nemaya” (cruzamento entre os clones de *C. canephora* ‘T3561’ e ‘T3751’) é usado como porta-enxerto para controlar os principais nematoides das galhas na América Central (Bertrand *et al.*, 2000b; Anzueto *et al.*, 2001) e foi propagada na forma de jardins clonais. A respeito dessa cultivar, a técnica de embriogênese somática foi usada para acelerar a propagação das plantas mãe (Bertrand *et al.*, 2002).

A distribuição generalizada e agressividade de *Meloidogyne* spp. no Brasil e na América Central levou nematologistas a procurarem alternativas ao controle químico (Ferraz, 2008; Villain *et al.*, 2008, 2013). Por exemplo, um acesso de *C. canephora* ‘2258’ da coleção de germoplasma do Catie na Costa Rica mostrou alta resistência a *M. exigua* e resistência e/ou tolerância a populações de *M. incognita* (Fazuoli, 1986). O mesmo acesso foi posteriormente relatado como resistente a *M. incognita* raças 1, 2 e 3 (Gonçalves *et al.*, 1996a, b) e *M. paranaensis*. Inicialmente o acesso ‘2258’ apresentou um nível de resistência em torno de 70%, mas esse nível foi aumentado consideravelmente por seleção posterior em áreas infestadas por *M. incognita*. Esse material foi melhorado posteriormente, tendo sido lançado como ‘Apoatã’, um porta-enxerto resistente a *Meloidogyne* spp. (Fazuoli *et al.*, 2002).

Infelizmente, no Brasil e na América Central “Apoatã” e “Nemaya” encontraram graves reduções em crescimento e produção relacionadas com a sensibilidade à seca e baixas temperaturas* (Bertrand *et al.*, 2001). Como consequência do aquecimento global, longos períodos de seca e aumento nas populações de nematoides são fatores-chave que afetam o desenvolvimento e produção das plantas de café (Da Matta & Ramalho, 2006).

Fazuoli *et al.* (2005) observaram resistência múltipla a *M. exigua* e *H. vastatrix* em 10 genótipos de Arabusta, um híbrido de *C. arabica* com *C. canephora* que possui características agronômicas e qualidade da bebida próximas de *C. canephora*. Sera *et al.* (2005)

identificaram 37 plantas híbridos F1 com múltipla resistência a ferrugem, bicho mineiro e *M. exigua*, sendo que muitos desses genótipos resultaram de cruzamentos com a cultivar IAPAR 59.

A resistência pode variar de planta para planta e pode estar relacionada também a fatores ambientais, como temperatura, que podem alterar a resistência da planta, ou a fatores inerentes ao patógeno, como virulência (Keen, 1990). Comparado com vírus, bactérias ou fungos, os nematoides das galhas são caracterizados por baixa dispersão natural, fluxo gênico e diversidade genética entre as populações (Trudgill & Blok, 2001). Em geral, genes de resistência relacionados a nematoides têm se mostrados efetivos e duradouros, mas a um número limitado de espécies/populações quando não a uma espécie somente. No ambiente agrícola, as plantas podem ser expostas a várias espécies de parasitas (Fuller *et al.*, 2008) o que justificaria o interesse naquelas que apresentam multirresistência, especialmente contra patógenos de importância econômica.

Encontrar genótipos de cafeeiro que apresentem características como resistência e produtividade, dentre outras agronomicamente desejáveis pode ser um trabalho difícil. Da Mata *et al.* (2000) observaram uma linhagem híbrida resistente a *M. paranaensis* e produtiva ao mesmo tempo, porém esse genótipo foi suscetível à ferrugem. Os programas tradicionais de melhoramento, geralmente, contam com espécies diploides de *C. canephora* ou *C. racemosa* relacionadas como fontes de resistência aos nematoides das galhas (Maluf, 2008). No entanto, as limitações do uso dessa estratégia demandam elevados custos e investimentos de longo prazo (Grundler, 1996) para desenvolver novas cultivares de café que combinem boa qualidade da bebida e resistência a parasitas. Assim mesmo, os métodos tradicionais constituem uma estratégia importante em culturas de alto valor econômico (Roberts, 1992).

Outra estratégia de introdução da resistência em plantas suscetíveis consiste em utilizar clones selecionados de *C. canephora* como porta-enxertos resistentes. Na Costa Rica,

* W. Gonçalves, IAC, São Paulo, Brasil (comunicação pessoal).

Guatemala e Brasil o uso de em porta-enxertos de robusta é muito eficaz no campo, sendo a produtividade das plantas enxertadas quatro vezes superior às plantas não enxertadas (Villain *et al.*, 2000). O uso de porta-enxertos resistentes constitui um método de controle eficiente, não poluente e de baixo custo. As variedades de Robusta, no entanto, são muito melhores como porta-enxerto que as de Conilon, devido ao seu maior volume radicular (Sera *et al.*, 2005), o que não significa que o uso de Conilon não possa ser feito. O uso de biotecnologia também representa uma alternativa aos métodos tradicionais de melhoramento e diversas técnicas têm se desenvolvido com essa finalidade (Grundler, 1996). No entanto, elas não têm se mostrado ainda, eficientes com relação a nematoides e sofrem sanções ou rejeições por parte de muitos setores sociais brasileiros e em nível mundial.

2.6. Conclusões

Este trabalho demonstrou que há fontes de resistência a *M. incognita* raça 1 e 3, *M. exigua* e *M. paranaensis* entre os clones produzidos pelo INCAPER. O clone 14 de *C. canephora* Conilon foi resistente a seis populações de *Meloidogyne* spp., incluindo uma população da Costa Rica, *M. arabicida*. Dessa forma, verificou-se no clone 14 de *C. canephora* cv. Conilon a presença de resistência múltipla a *Meloidogyne* spp.

2.7. Perspectiva

Os resultados apresentados neste capítulo são importantes pois, fornecem informações que podem ser futuramente utilizadas nas etapas seguintes dos programas de melhoramento do cafeeiro.

Capítulo 3 – Histopatologia comparada de *Coffea canephora*, clones 14 (resistente) e 22 (suscetível) infectados com *Meloidogyne* spp.

3.1. Introdução

Os fitonematoides são parasitas obrigatórios que se alimentam exclusivamente dos compostos citoplasmáticos de células hospedeiras vivas. As interações incompatíveis com os nematoides de galhas podem ser caracterizadas por morte celular rápida e localizada nos tecidos invadidos, que são sintomas típicos de RH, como em soja (Dropkin, 1960), pimentão (Pegard *et al.*, 2005) e cafeeiro (Anthony *et al.*, 2005).

Permanece obscura a questão sobre se a resposta RH é causa ou consequência da resistência aos nematoides (Williamson & Kumar, 2006). Quando precoce, a RH previne a penetração ou migração do juvenil como descrito para o tomateiro (Williamson, 1999). Quando tardia, a RH causa e inibe o desenvolvimento das células gigantes e suprime o desenvolvimento e a multiplicação do parasita, como no caso de amendoineiro *Arachis* sp. (Proite *et al.*, 2008). Entretanto, pode haver resistência aos nematoides das galhas sem RH, como no trabalho com *Vigna unguiculata* (L.) Walp e que demonstra a ausência de RH típica em relação a plantas contendo o gene *Rk* (Das *et al.*, 2008). Araçazeiros resistentes, *Psidium cattleianum* Afzel. Ex Sabine e *P. friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. também apresentaram ausência de RH quando parasitados por *Meloidogyne enterolobii* e formação de células gigantes que se degeneram ao longo do parasitismo (Freitas *et al.*, 2014).

Diversos autores demonstraram que, no local da RH são produzidas ou liberadas enzimas associadas a espécies reativas de oxigênio (Levine *et al.*, 1994, Melillo *et al.*, 2006), ácido jasmônico (Yoon *et al.*, 2009), óxido nítrico (Ahlfors *et al.*, 2009), compostos fenólicos (Bajaj & Mahajan, 1977; Pegard *et al.*, 2005), fito-hormônios (Gutierrez *et al.*, 2009) e outros compostos envolvidos na transdução de sinais da resistência. Existem evidências da ligação direta entre o “*oxidative burst*” e a resistência observada em interações planta-nematoide (De

Gara *et al.*, 2003). Os sintomas de RH e a produção de H₂O₂ foram documentados na interação incompatível entre *Arabidopsis* e o nematoide do cisto *Heterodera glycines* (Waetzig *et al.*, 1999). A modulação da atividade de enzimas envolvidas na produção ou na neutralização de ROS foi relacionada com a RH presente na interação de tomateiro contendo o gene *Mi* com *Meloidogyne incognita* (Zacheo & Bleve-Zacheo, 1988; Zacheo *et al.*, 1993). Posteriormente, o trabalho de Melillo *et al.* (2006) forneceu as evidências da geração de sinais e a expressão espaço-temporal ligados às ROS (espécies reativas de oxigênio) nas interações tomateiro-nematoide das galhas.

Dos trabalhos com cafeeiro, o primeiro relato de resposta do tipo RH foi em Catimor (Híbrido de Timor x *Coffea arabica* var. Caturra) no sexto dia após infecção por *Meloidogyne* (Rodrigues *et al.*, 2000). As plantas resistentes à infecção de *M. exigua* e *M. megadora* mostraram reação precoce, que foi detectada nas células onde os nematoides tentaram estabelecer sítio de nutrição. Os estudos ultraestruturais dessa interação incompatível mostraram a reação das células selecionadas pelo nematoide para a indução de células gigantes. São descritas poucas mudanças citoplasmáticas, condensação da cromatina, metabolismo de carboidratos alterado, desenvolvimento de lisossomos e vacúolos autofágicos.

A resposta do tipo RH foi associada ao gene *Mex-1* de resistência a *M. exigua* no genótipo de *C. arabica* cv. IAPAR59 (Anthony *et al.*, 2005) e na cultivar ‘UFV 408-28’ associada a *M. incognita* (Albuquerque *et al.*, 2010). Nesses estudos, os cortes histológicos das raízes resistentes infectadas foram corados com azul de toluidina. Os resultados revelaram: coloração azul-escuro ou verde-azulado dos compostos das células responsivas, sugerindo o acúmulo de compostos fenólicos; coloração rosa do material fibroso intercelular, indicando grandes quantidades de pectina (Anthony *et al.*, 2005). Fluorescência e observações ao microscópio mostraram células das raízes ao redor de *M. incognita* exibindo RH, com

acúmulo de compostos fenólicos e aspecto necrótico das células (Albuquerque *et al.*, 2010). Outra observação interessante é que ocorreu formação de alguns sítios de alimentação pouco desenvolvidos, que foram relacionados a nematoides *M. exigua* colapsados, sugerindo uma ativação tardia da RH (Anthony *et al.*, 2005).

3.2. Objetivos

Caracterizar histologicamente o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resistência do clone 14 de *C. canephora* a *M. paranaensis* e compará-lo(s) aos do clone 22, o qual permite o estabelecimento e reprodução do nematoide.

3.3. Material e métodos

Os genótipos de cafeeiro foram escolhidos de acordo com a resposta dos mesmos no ensaio anterior. Com isso, escolheu-se o clone 14 pois foi resistente a seis populações de *Meloidogyne* testadas anteriormente e o clone 22, por sua suscetibilidade a cinco populações e o padrão de suscetibilidade Catuaí IAC 81. As mudas de *C. canephora* foram cultivadas em vasos (3L), contendo areia lavada, esterilizada e semanalmente fertilizada. As mudas foram inoculadas com 10.000 J2 de *M. incognita* ou *M. paranaensis*/planta. Três mudas de plantas, resistente e susceptível, foram cuidadosamente retiradas dos vasos aos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 32, 38, 45 e 50 dias após inoculação (DAI), e as raízes lavadas em água corrente. Partes das raízes das plantas suscetíveis e resistentes foram coradas com fucsina ácida para observação da penetração, da localização dos J2, e posterior desenvolvimento dentro das raízes. Após a coloração, os segmentos radiculares foram observados em microscópio estereoscópico e as partes que apresentaram a infecção por nematoides foram montados em lâminas para observação ao microscópio de luz (Axiophoto Zeiss) (Byrd *et al.*, 1983).

Subamostras de raízes foram incluídas em resina para produzir seções finas. Fragmentos

de raiz mostrando engrossamentos ou sem sintomas foram excisadas sob um microscópio estereoscópico, fixados, e incluídos em resina epóxi Technovit 7100 (Kulzer Friedrichsdorf) como descrito por Pegard *et al.* (2005) e de acordo com as recomendações do fabricante. Seções de raiz não coradas foram montadas em lâminas de vidro onde a fluorescência foi observada após excitação UV (conjunto de filtros UV A2 Zeiss 02; 488002-0000). As mesmas seções foram subsequentemente coradas (1min a 60°C) com 0,5% de azul de toluidina, em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,5 e observadas em microscópio de luz (ML).

Neste ensaio, aproximadamente 10.000 seções radiculares foram observadas nos genótipos suscetível (Figura 3.1) e resistente (Figura 3.2) de *C. canephora* e *C. arabica* inoculados com *M. incognita* raça 3 e *M. paranaensis*. Além disso, as raízes infectadas com os nematoides foram comparadas com raízes não inoculados dos mesmos genótipos, a fim de evitar qualquer erro de observação (dados não apresentados). O cafeeiro *C. canephora* suscetível, clone 22, foi escolhido para as observações histopatológicas da interação compatível pois não houve diferenças de desenvolvimento dos patógenos nos tecidos radiculares desse genótipo e o padrão de suscetibilidade Catuaí IAC 81. A reação histopatológica devido à infecção por *M. incognita* raça 3 e *M. paranaensis* foi semelhante, por isso, apenas os resultados para a inoculação com *M. paranaensis* foram apresentados neste trabalho. Foi dada preferência a essa espécie devido aos poucos estudos relacionados com a mesma em cafeeiros, quando comparamos com *M. incognita* e *M. exigua*, e por ser um nematoide que vem se tornando muito importante economicamente no Brasil (Campos & Villain, 2005) e na América Central (Lopez-Lima *et al.*, 2014).

3.4. Resultados

Observações de raízes do clone 22 de *C. canephora* Conilon suscetível a *Meloidogyne*

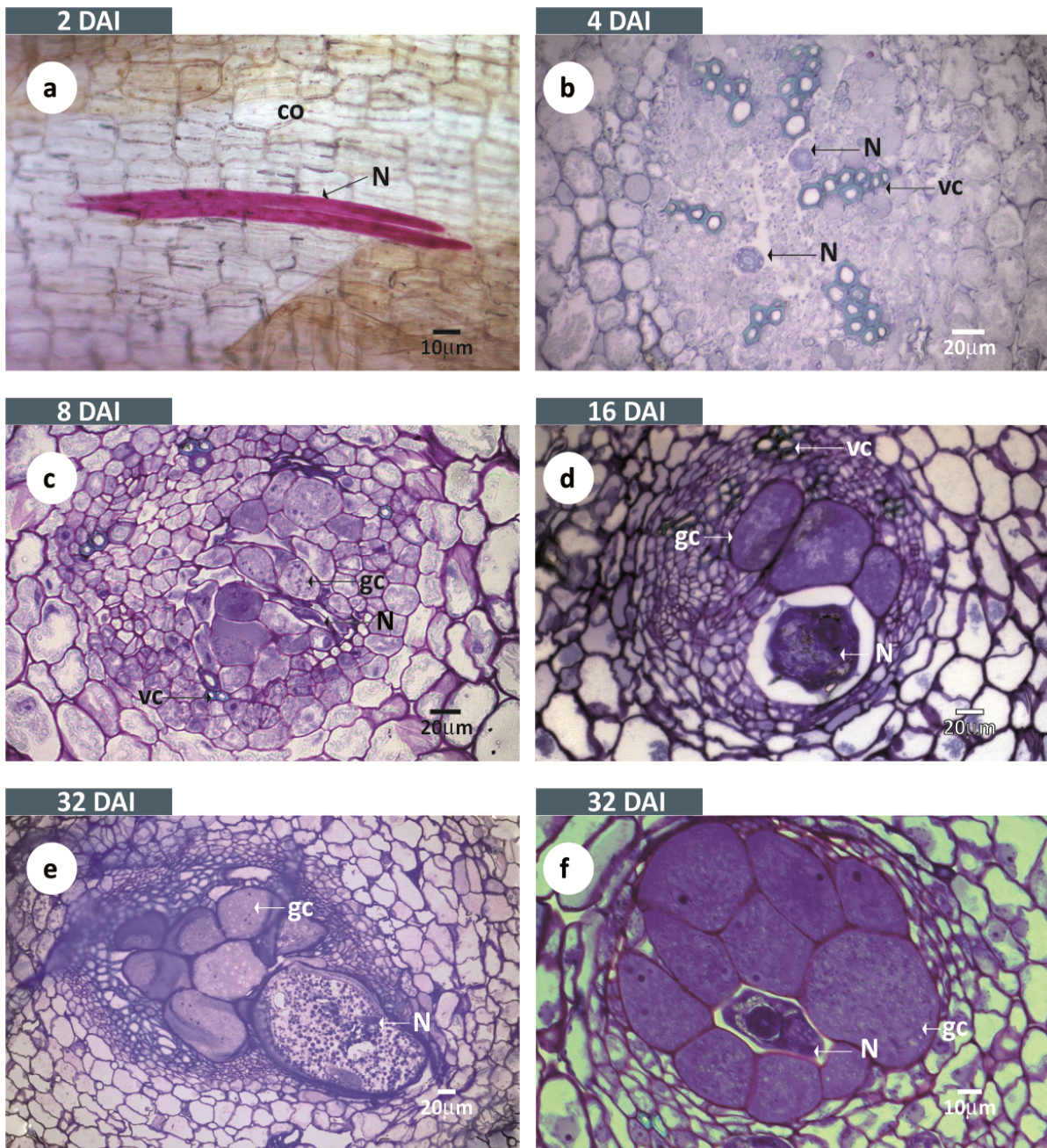


Figura 3.1. Seções de raízes do clone 22 de *Coffea canephora* Conilon (controle suscetível) infectadas com *Meloidogyne paranaensis*. (a) coloração com fucsina ácida: nematoides do segundo estágio juvenil (J2) localizados no córtex da raiz dois dias após a inoculação (DAI). b-f: coloração com azul de toluidina; (b) localização intercelular de um J2 no cilindro central; (c) J2/J3 ao lado de células gigantes no cilindro central; (d, e, f) J4 ou fêmeas ao lado de células gigantes que exibem citoplasma denso, vacúolos e paredes celulares bem demarcadas. N = nematoide, gc = células gigantes, co = córtex, vc = cilindro vascular.

spp. coradas com fucsina ácida e seções coradas com azul de toluidina mostraram que os J2s foram capazes de penetrar as extremidades das raízes, migrar entre os condutores do xilema e

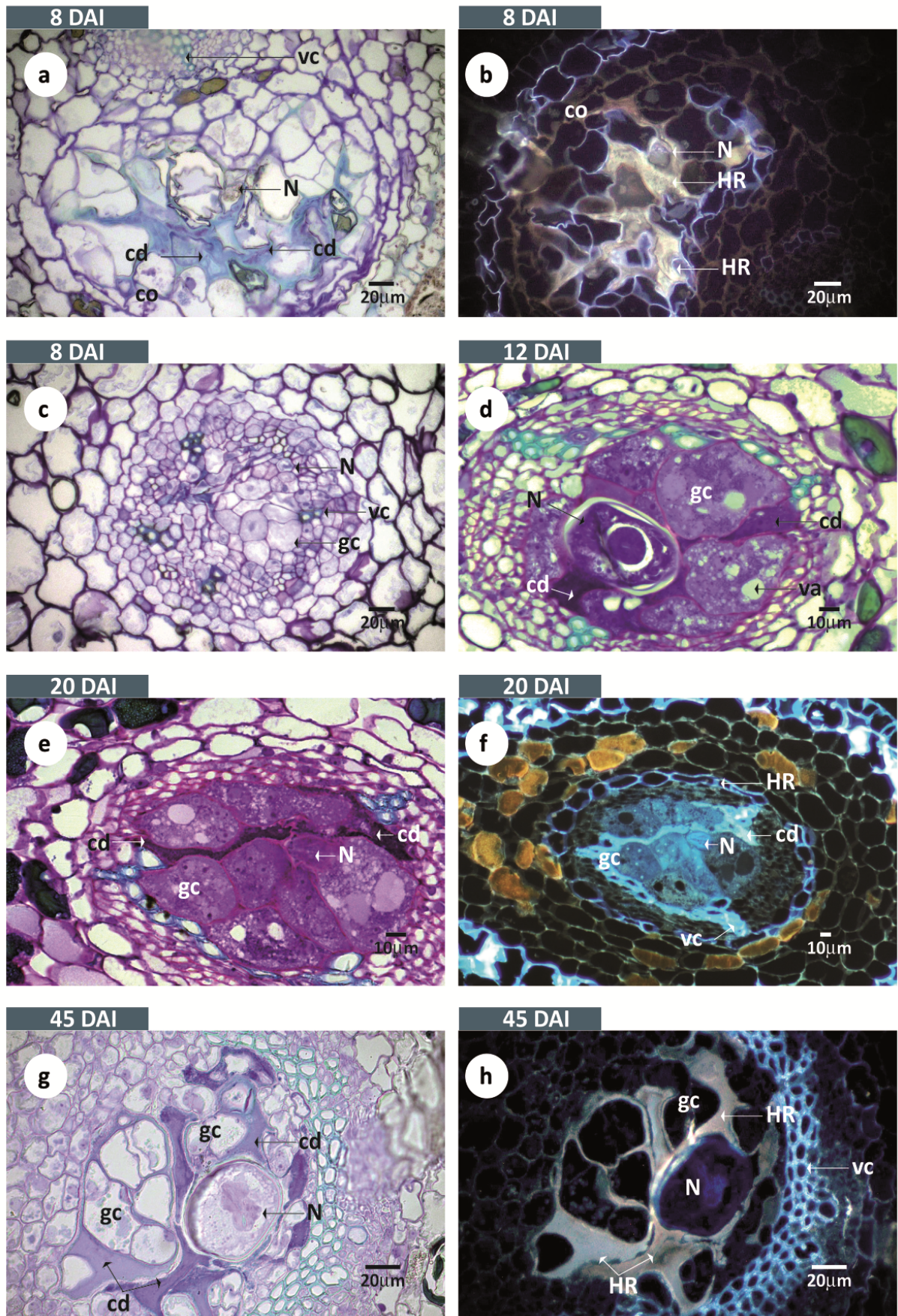


Figura 3.2. Seções de raízes do clone 14 (resistente) de *Coffea canephora* Conilon infectadas com *Meloidogyne*

paranaensis. a, c, d, e, g: coloração com azul de toluidina; b, f, h: fluorescência com incitação UV. (a, b) J2 localizado no córtex da raiz e rodeado por células degradadas coradas em azul claro (a) e que apresentam uma fluorescência acinzentada sob iluminação UV (b); (c, d, e, f, g, h): nematoides no cilindro vascular; células gigantes podem ser observadas 8 DAI associadas com a presença de nematoides (c) . A fluorescência azul-cinzenta é vista em células próximas do nematoide e em paredes dos vasos (f, h); As células (d, e, g, h) do parênquima ao lado dos nematoides e células gigantes exibem um material manchado-escuro que sugere alteração grave do citoplasma; (e, g) células gigantes mostram citoplasma retraído e às vezes numerosos vacúolos. N = nematoide, RH = reação de hipersensibilidade indicando morte celular (cd), co = córtex, gc = células gigantes, vc = cilindro vascular, va = vacúolo. Secções visualizados sob luz UV (b, f, h) e, após coloração com fucsina ácida (a, c, d, g).

se desenvolver normalmente, depois de iniciada a diferenciação dos sítios de alimentação (Figura 3.1a-f). Dois DAI, foram observados numerosos J2s no meristema subapical das raízes (Figura 3.1a). Aos 4 DAI, alguns J2s foram observados no córtex da raiz, provavelmente migrando para o cilindro vascular, causando, assim, danos na parede celular. Aos 4-8 DAI, observaram-se numerosos J2s dentro do cilindro vascular (Figura 3.1b, c), e, aos 8 DAI, nematoides foram observados no interior do cilindro vascular, ao lado de células gigantes em formação (Figura 3.1a-c). Entre os 16-32 DAI, numerosos J3/J4 tinham estabelecido sítios de alimentação, com 10-12 células gigantes bem diferenciadas e associadas a cada nematoide (Figura 3.1d-f). As células gigantes apresentavam-se em forma oval, bem hipertrofiadas, com paredes bem definidas e com citoplasma denso multinucleado (Figura 3.1e, f). Neste momento, a ampliação da região do cilindro vascular ocorreu, e pequenos engrossamentos foram observados. Aos 32 DAI, foram observadas fêmeas adultas, associadas a injurias e rompimento do córtex da raiz. Aos 45 DAI, massas de ovos foram observados no interior e na superfície da raiz.

O clone 14 foi usado como variedade clonal não compatível a *M. paranaensis*. Observações microscópicas realizadas a partir de 2-6 DAI, em raízes clareadas e coradas com fucsina ácida revelaram um número menor de J2s na região subapical, em comparação com a distribuição de nematoides em raízes suscetíveis infectadas. Aos 4 DAI, as observações

microscópicas de amostras infectadas mostraram que os nematoides foram capazes de atingir o cilindro vascular; no entanto, não foi observada a indução de células gigantes nesse momento. Além disso, apenas J2s foram detectados até 6 DAI, o que indica que alguns nematoides invasores não foram capazes de avançar para outros estádios mais avançados de seu ciclo de vida nas raízes resistentes. Usando, primeiramente, microscopia de fluorescência, através da luz UV, para observação de cortes de raízes retiradas aos 8 DAI, observou-se uma forte autofluorescência acinzentada no tecido do córtex em torno dos nematoides (Figura 3.2b).

O mesmo corte visualizado sob microscopia de campo claro, após coloração com azul de toluidina, mostrou uma região densamente corada em azul, indicando morte celular e lesões compatíveis com a RH circundantes ao patógeno (Figura 3.2a, b) Esta reação ocorreu quando o nematoide estava migrando através do córtex, na fase inicial da infecção. Aos 8 DAI, um pequeno número de nematoides foram vistos perto de primórdios de sítios de alimentação, em que as células gigantes em formação exibiram características semelhantes às de raízes suscetíveis (**Figura 3.2c**). A segunda diferença pós-infecção evidente, observada através da microscopia, entre o cafeeiro clone 22 suscetível e o clone 14 resistente foi detectada aos 12-20 DAI. Neste momento, J3/J4 estavam presentes no cilindro vascular (Figura 3.2c-f) ao lado de células gigantes nas raízes resistentes, apresentando vacúolos de diversos tamanhos, que, por vezes ocupavam quase a totalidade do volume das células, um claro sinal de degeneração celular.

Em comparação, as células gigantes na raiz suscetível apresentaram citoplasma uniformemente denso, com menor vacuolização (Figura 3.1d). Entre 32-45 DAI, fêmeas jovens aparecem nas raízes e uma degeneração completa de células gigantes foi observada (Figura 3.2g, h). Microscopia de fluorescência aos 20-45 DAI, usando excitação UV de seções de raiz coletadas nesses momentos, mostraram uma forte autofluorescência azul ou

cinza, em torno dos nematoides e células gigantes, em todos os locais da infecção analisados (Figura 3h). A mesma seção visualizadas sob campo claro após coloração com azul de toluidina revelou regiões azuis escuras indicando grandes alterações de células (morte celular) em contato com nematoides e em torno das células gigantes com sinais de degeneração (Figura 3.2g). Algumas fêmeas jovens observadas apresentaram estágios iniciais de desenvolvimento de ovários (Figura 3.2g) porém, não se observou nenhuma formação de ovos nas raízes analisadas dos 32 aos 50 DAI.

Observações externas das raízes em 45-50 DAI revelaram grande e bem desenvolvido espessamento ou pequenas galhas nas raízes suscetíveis, enquanto que nas raízes resistentes apenas leves engrossamentos foram observados. Raízes coradas com fucsina ácida aos 45-50 DAI mostraram que no clone suscetível 22, as fêmeas atingiram a maturidade reprodutiva culminando com a produção de ovos, o mesmo não ocorrendo nas raízes resistentes, onde fêmeas se apresentaram jovens e não mostraram sinais de produção de ovos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos a partir de inoculações dos clones 14 e 22 (Capítulo 2, Tabelas 2.1-2.7) ou seja, o clone 14 mostrou mecanismos de resistência a *M. paranaensis*, além dos outros nematoides do gênero *Meloidogyne* testados, e o clone 22 foi suscetível permitindo, assim, que o nematoide completasse seu ciclo.

3.5. Discussão

No presente estudo, a resistência de *C. canephora* clone 14 a *Meloidogyne* spp. foi confirmada e caracterizada no nível histológico. Três mecanismos de resistência foram observados para *M. paranaensis*: I) menor quantidade de J2s que penetraram nas raízes do genótipo resistente; II) sinais de RH e morte celular detectadas nos dias iniciais de infecção durante a migração do nematoide através córtex das raízes resistentes; e III) degradação das células dos sítios de alimentação, no início, e mesmo após sua formação, acompanhada de RH

envolvendo as células gigantes e o nematoide e, a consequente degeneração de ambos.

A redução da penetração dos J2s no clone 14 pode indicar a presença de barreiras físicas e/ou químicas no sistema radicular da planta. Tais barreiras foram sugeridas em trabalhos anteriores para outras hospedeiras como, por exemplo, os porta enxertos resistentes de videira a *M. arenaria* (Ferris *et al.*, 1982; Anwar & McKenry, 2000), *M. incognita* em algodoeiro, gergelim e *Crotalaria* sp. (Anwar *et al.*, 1994), *M. incognita* em cultivar de soja 256 (Dropkin & Nelson, 1960), *Meloidogyne* spp. em pimentão (Pegard *et al.*, 2005), *M. exigua* em cafeeiro arábica IAPAR 59 e (Anthony *et al.*, 2005), *M. arenaria* raça 1 em amendoim (Proite *et al.*, 2008) e *M. exigua* em *C. canephora* Apoatã IAC 2258 (Silva *et al.*, 2013).

Ao comparar a penetração dos juvenis de duas populações de *M. exigua* em raízes de cafeeiro coradas com fucsina ácida de duas cultivares, um de *C. arabica* (Catuaí Vermelho IAC 44) e outro de *C. canephora* (Apoatã), Silva *et al.* (2013), observaram que a penetração de juvenis na cultivar de Apoatã foi menor que na “IAC 144” e que poucos J2 migraram e chegaram ao cilindro central no genótipo resistente, indicando a presença de barreiras pré e pós-infeccionais. No clone 14 de *C. canephora*, esses dois mecanismos estão envolvidos na expressão de resistência. Um ocorre dificultando a penetração, em torno de 2-4 DAI e outro aos 8 DAI, que bloqueia o nematoide impedindo sua migração através do tecido cortical e chegada ao cilindro central e conseqüentemente, o seu desenvolvimento. Durante a migração, os J2 podem ficar retidos devido à morte das células circundantes e a RH (Anthony *et al.*, 2005), o que já foi observado anteriormente em cafeeiro.

Uma triagem inicial realizada em casa de vegetação mostrou que os acessos de *C. arabica*, genótipo ‘UFV 408-28’, foram identificados como moderadamente resistentes a três raças de *M. incognita* (Albuquerque *et al.*, 2010). Observações histológicas mostraram que a infecção causada pelo nematoide pode ser bloqueada durante a penetração e mesmo durante a migração para o cilindro central aos 6-8 DAI. Observações em microscopia de luz e

fluorescente mostraram que as células adjacentes ao nematoide apresentaram sintomas de RH, células com aspecto necrótico e acúmulo de compostos fenólicos. Na cultivar suscetível IAC 15, raízes com 6 DAI já mostravam sítios de alimentação contendo células gigantes com citoplasma adensado (Albuquerque *et al.*, 2010).

Células deformadas, necrose, condensação do citoplasma e sinal de RH também foram relatados por Silva *et al.* (2013), entre 2-6 DAI, em Apotã inoculado com *M. exigua*. No presente trabalho, a análise histológica mostrou que a necrose das células vegetais em contato com juvenis durante a penetração ou migração aos 6-8 DAI resultou na retenção do nematoide. Esta reação de defesa no início do ciclo de infecção foi concomitante com as observações de respostas envolvidas na resistência a *Meloidogyne* spp. em uma série de outras espécies de plantas como, por exemplo, o algodão (Mota *et al.*, 2013), o amendoim (Proite *et al.*, 2008) e pimentão (Pegard *et al.*, 2005). As áreas com RH em células corticais infectadas exibem uma autofluorescência cinza-azul sob luz UV, indicando a presença e acúmulo de compostos fenólicos que podem atuar na defesa da planta (Anthony *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2010). O estudo de Pegard *et al.* (2005) revelou associação entre compostos fenólicos presentes nas células e nos espaços extracelulares próximos ao nematoide e resistência aos mesmos, sendo que um dos mais importantes é o ácido clorogênico.

Khallouk *et al.* (2011) avaliaram, através da histopatologia, raízes de cerejeira (*Prunus* sp.) resistente ao nematoide das galhas, que possui o gene *Ma*, que confere resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. enterolobii*, e raízes da planta suscetível a *M. incognita*. Nesse trabalho, observou-se que poucos nematoides penetraram o sistema radicular da cerejeira resistente e RH e necrose foram observadas em volta do nematoide e não houve desenvolvimento além da fase de J3, e desenvolvimento de galhas.

O terceiro mecanismo de defesa no clone 14 ocorreu aos 20-45 DAI e impediu o desenvolvimento do nematoide em fêmeas adultas. Até 20 DAI, células gigantes no clone

resistente foram facilmente reconhecidos por seu aumento de tamanho, presença de alguns núcleos e pequenos vacúolos, além da presença de algumas células mortas. Após este tempo, entre 32-45 DAI, ocorreu forte degradação citoplasma das células gigantes, circundadas por material fortemente corado em azul, sugerindo morte celular das células que compunham o sítio de alimentação; RH e acúmulo de compostos fenólicos, ao lado das fêmeas jovens que também pareciam estar colapsadas devido ao seu aspecto geral, com presença de áreas degradadas, o que não foi observado em fêmeas que se desenvolveram no genótipo suscetível. Estes resultados sugerem que houve uma resposta tardia de defesa, em raízes do clone 14 de *C. canephora*, após os 20 DAI e bem perceptível após os 32 DAI. Anthony *et al.*, (2005) também observaram colapso celular associado a RH no sítio de alimentação em raízes de *C. arabica* IAPAR 59, infectado com *M. exigua*, entre os 10-14 DAI no cilindro central e também, no início do ciclo de infecção, no córtex. A resistência do cafeeiro IAPAR 59 é conferida pelo gene *Mex-1* proveniente do genoma de *C. canephora* e, no que se refere a *M. exigua*, está fortemente associada à morte celular e RH (Noir *et al.*, 2003; Anthony *et al.*, 2005). Respostas semelhantes foram observadas, no presente trabalho, no clone 14 porém, ocorreram também mais tardiamente e, de acordo com as observações em microscopia de campo claro e UV, foi bem mais intensa.

No cafeeiro, a RH nas células da raiz de clone 14 desencadeada devido à infecção a *M. paranaensis* e *M. incognita* pode ser indicativo de uma interação específica. Isto sugeriria que a resistência a *Meloidogyne* spp. no clone 14 é provavelmente controlada por mais de um gene de resistência, que pode ser utilizado para produzir novas variedades de café resistentes aos nematoides de galhas (NG). A resistência pode ocorrer de forma global, ou seja, contra vários tipos de fatores bióticos ou abióticos o que resultaria em reação semelhante das plantas a diferentes elicitores de forma inespecífica. As respostas específicas podem ocorrer gene a gene, se restringindo a um tipo de patógeno, podendo esta variar quando o mesmo varia.

Segundo Flor (1971), após o reconhecimento do elicitor Avr por parte do gene *R* específico do hospedeiro, uma cascata de eventos moleculares ocorre culminando na RH. A RH é um aspecto marcante no processo de resistência aos nematoides das galhas e é uma reação típica nas interações gene-a-gene, sendo muitas vezes, uma característica marcante. No entanto, a RH não é onipresente em todos os processos relacionados com a resistência (Levine *et al.*, 1996). O desenvolvimento não satisfatório de *M. incognita* em soja coincidiu com a presença de células gigantes vacuolizadas, menores e com parede mais fina que as células gigantes presentes nas plantas suscetíveis (Dropkin & Nelson, 1960). Das *et al.* (2008) relataram degradação celular, caracterizada por vacuolização e colapso das células gigantes, na interação incompatível entre *M. incognita* raça 3 com feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) porém, não houve RH nem interferência na penetração dos J2s. Resposta semelhante ocorreu na relação entre araçazeiros e *M. enterolobii* (Freitas *et al.*, 2014).

Quando se trata de histopatologia, a presença de compostos fenólicos associada ao espessamento da parede celular devido à deposição de lignina e calose são eventos observados pela microscopia sem que haja avaliação bioquímica. São muitos os trabalhos que associam os compostos fenólicos à resistência, tanto a nematoides, quanto a outros patógenos em geral. No entanto, Mazzafera *et al.* (1989) não observaram diferença de concentração de fenóis entre as plantas inoculadas ou não inoculadas com *M. incognita* em ambos os genótipos, resistente (Apoatã de *C. canephora*) e suscetível (*C. arabica* cv. Mundo Novo) e o conteúdo de fenóis foi maior no genótipo suscetível porém, a atividade de peroxidase e polifenoloxidase foi maior no genótipo resistente.

No presente estudo o clone resistente 14 respondeu, para ambas espécies *M. paranaensis* e *M. incognita*, de forma semelhante quanto aos mecanismos de defesa observados através da histopatologia. Apesar da especificidade gene-a-gene apresentada na relação patógeno-hospedeiro, muito há de comum entre os diferentes tipos de relação, ao

mesmo tempo em que cada uma delas apresenta suas particularidades que não foram observadas no âmbito da histopatologia, mas que devem ser investigadas ao nível bioquímico e genético. O mais importante é que, estudar e entender profundamente os mecanismos que levam à resistência pode permitir o desenvolvimento de ferramentas importantes no melhoramento genético e seleção de genótipos com valor agrônômico e econômico.

3.6. Conclusões

No presente trabalho, três mecanismos que atuam na resistência do clone 14 a *Meloidogyne* spp. foram apresentados. O primeiro, pré-infeccional e ainda não identificado, diminui a entrada do nematoide na hospedeira. Conclui-se isso pelo número baixo de juvenis no clone 14 de *C. canephora*, quando comparados com o clone 22 e o cafeeiro “Catuaí”. O segundo mecanismo impediu o estabelecimento do J2, retendo-o ainda na fase de migração e o terceiro impediu a reprodução do nematoide, mesmo quando o mesmo conseguiu se desenvolver. Essas duas estratégias, pós infectivas, envolveram morte celular e RH que ocorreram em células distintas e, pelas observações feitas, com diferentes intensidades no início e final do ciclo. Desencadear RH e morte celular no final do ciclo mostrou-se uma estratégia eficaz para assegurar a resistência do genótipo estudado. Mesmo aqueles juvenis que conseguiram penetrar, migrar e estimular o desenvolvimento do sítio de alimentação, tiveram o seu ciclo abortado pelo segundo conjunto RH e morte celular. Em plantas perenes, como o caso do cafeeiro, este conjunto de mecanismos/estratégias pode assegurar a manutenção da resistência em condições de campo por muito tempo. Por meio da histopatologia foi possível determinar que *Meloidogyne* spp. pode completar o seu ciclo de vida no cafeeiro entre 45-50 dias após a inoculação.

Capítulo 4 – Identificação de genes candidatos associados à resistência do clone 14 de *C. canephora* a *Meloidogyne paranaensis*.

4.1. Introdução

Meloidogyne paranaensis é uma espécie de nematoide das galhas que vem dizimando lavouras de café em algumas regiões do Brasil (Carneiro *et al.*, 1996). Apesar de não ter larga distribuição como *M. exigua*, sua importância para o cultivo do cafeeiro tem sido foco de preocupação, devido ao aumento da sua disseminação e por causa dos danos provocados por esse nematoide. *Meloidogyne paranaensis* causa extensos danos radiculares que podem culminar com a morte da planta. O manejo baseado em plantas resistentes é o método mais promissor para controlar várias espécies de nematoides deste gênero (Carneiro *et al.*, 1996; Roberts, 2002), e muitos são os estudos com o objetivo de identificar genótipos com essa característica. No entanto, ainda se tem muito a saber a respeito da interação nematoide das galhas-hospedeiro e os aspectos fisiológicos do parasitismo, bem como quais são os genes que podem estar envolvidos, direta ou indiretamente, na resistência.

O café é uma das principais *commodities* do mundo e uma importante fonte de renda para os países produtores (Fassio & Silva, 2010). No entanto, os estresses bióticos e abióticos são fatores limitantes ao seu desenvolvimento e produção (DaMatta *et al.*, 2003; Campos & Villain, 2005). Apesar de ser a espécie de cafeeiro mais cultivada e apreciada ao redor do mundo, *C. arabica* tem se mostrado pouco resistente aos nematoides das galhas. As fontes de resistência a *Meloidogyne* spp. são provenientes de espécies diploides de *Coffea* como *C. liberica* e *C. canephora* – esta última, a segunda espécie de cafeeiro mais cultivada no mundo (Campos & Villain, 2005; Bertrand & Anthony, 2008, Lashermes *et al.*, 2008).

O único gene de resistência a *Meloidogyne* descrito é o *Mex-1*, presente na cultivar IAPAR59. Este confere resistência somente a *M. exigua* (Noir *et al.*, 2003; Bertrand & Anthony, 2008; Muniz *et al.*, 2009). No entanto, quando comparado com o gene *Mi* (*Mi-1.2*

nº de acesso GenBank NM_001247134.1) de *Solanum lycopersicum*, tem-se pouca informação a respeito da localização e modo de atuação desse gene.

Por meio do projeto Genoma Café, 17.982 contigs e 32.155 *singletons* foram gerados e agrupados em 37 bibliotecas de cDNA de *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*, o que permitiu um melhor conhecimento a respeito da genômica funcional do cafeeiro (Vieira *et al.*, 2006). Dentre essas bibliotecas, a biblioteca NS1 contém 569 *reads* que representam os transcritos de raízes após a infecção com nematoide. Análises *in silico* das ESTs de *C. arabica* infectado por *M. paranaensis* permitiram observar aquelas possivelmente envolvidas no processo de interação planta-nematoide. Porém, não foi possível detectar expressão diferencial das ESTs (Albuquerque *et al.*, 2007), e a quantidade de informações providas sobre esse importante problema biológico foi limitada.

ESTs diferencialmente expressas durante interação incompatível *C. arabica*-*H. vastatrix* já foram previamente identificadas, bem como os genes expressos no período inicial do processo de infecção pelo fungo (Fernandez *et al.*, 2004). Expressão diferencial após infecção por fitonematoides, dentre eles do gênero *Meloidogyne*, foi observada em tomate, pimentão (Castagnone-Sereno *et al.*, 1992; Neveu *et al.*, 2003), *Arabidopsis* (Fuller *et al.*, 2007), e amendoim (Tirumalaraju *et al.*, 2011).

Comparando-se a antiga geração de sequenciamento de DNA (Sanger) às novas tecnologias, pode-se destacar o avanço na velocidade de obtenção dos dados, maior cobertura e menor custo. Sendo assim, um grande volume de informações genéticas é processado por meio dessas tecnologias, o que permite a obtenção de resultados em larga escala. Dentre os sistemas de sequenciamento de DNA de nova geração disponíveis, os mais utilizados atualmente são Pirosequenciamento 454 (Roche), Solexa (Illumina) e SOLID (Life Technologies) (Schuster, 2008; Mardis, 2008; Quail *et al.*, 2008).

Estas novas plataformas de sequenciamento permitiram ainda mais o avanço no estudo

genômico do cafeeiro, como atestam Denoeud *et al.* (2014), que sequenciaram o genoma completo de *C. canephora*. O genoma inclui várias expansões da família de genes específicos da espécie, entre eles N-metiltransferases (STA) envolvidas na produção de cafeína, genes relacionados com a defesa e de enzimas envolvidas na síntese de compostos secundários. Neste trabalho, no que concerne a funções de resposta de defesa, há uma clara expansão de genes NBS (*nucleotide binding*) no genoma de *C. canephora*, sendo que estes genes estão geralmente associados à resistência a fitopatógenos.

4.2. Objetivos

Considerando os resultados obtidos no capítulo 3, onde foram observadas diferenças histopatológicas entre os clones 14 e 22 de *C. canephora*, respectivamente identificados como resistente e suscetível a *M. paranaensis*, objetivou-se no presente trabalho a caracterização do(s) possível(eis) mecanismo(s) molecular(es) relacionado(s) à resistência em *C. canephora* a *M. paranaensis*.

4.3. Material e Métodos

4.3.1. Material vegetal e espécie de *Meloidogyne*.

Para este ensaio, escolheu-se os mesmos genótipos testados por meio de histopatologia (Capítulo 3), ou seja, o clone 14 de *C. canephora* Conilon, resistente a *M. paranaensis*, e o clone 22, suscetível a essa espécie. As estacas dos clones foram produzidas pelo INCAPER. Os cafeeiros, com 130 dias, foram cultivados primeiramente em mistura estéril de solo, areia e composto na proporção para aclimação, e em seguida foram transferidas para areia estéril com adubação semanal (Osmocote Plus NPK 15-9-12) e irrigação diária em casa de vegetação, a temperaturas entre 25-28°C.

O experimento constou de seis avaliações (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI) e foram separadas

quatro plantas para cada dia de avaliação, sendo três delas para inoculação e uma não inoculada (controle negativo). Três dias após o transplante na areia, cada planta foi inoculada com 10.000 J2 (juvenis de segundo estágio) de *M. paranaensis* coletados por meio de funil de Baermann modificado. Aos 4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI, as três repetições mais o controle foram retiradas da areia. As raízes foram lavadas rapidamente e em seguida retirou-se a parte aérea. Estas raízes foram, então, rapidamente introduzidas em tubo Falcon de 50mL e congeladas em nitrogênio líquido. Os tubos imersos em nitrogênio líquido foram armazenados a -80°C para as etapas seguintes.

Para cada dia de avaliação, as raízes dos clones 14 e 22 inoculadas com 3 repetições biológicas e as não inoculadas foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo, e separadas em tubos de 1,5mL, totalizando 48 amostras. Dessa forma, as amostras coletadas foram:

- Clone 14: 18 amostras inoculadas – 3 amostras para cada dia testado (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI);
- Clone 14: 6 amostras controle/não inoculadas para cada dia testado;
- Clone 22: 18 amostras inoculadas – 3 amostras para cada dia testado (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI);
- Clone 22: 6 amostras controle/não inoculadas para cada dia testado.

4.3.2. Extração de RNA de raízes de cafeeiro

A extração de RNA ocorreu usando o protocolo de extração com fenol e precipitação com cloreto de lítio, conforme descrito a seguir: 1-2mL de material macerado foi colocado em tubo Falcon de 15mL, imerso em nitrogênio líquido. Adicionou-se 2mL de tampão de guanidina ou tampão NTES. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de

um vórtex e colocadas no gelo seguido da adição de 2mL de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e posterior homogeneização com auxílio de vórtex em intervalos de 5 min, alternando com gelo, por um período de 20min. As amostras foram, então, centrifugadas por 30min, a 4°C e 8228g. Em seguida, coletou-se a fase aquosa, e essa foi transferida para um novo tubo Falcon de 15mL. Adicionou-se então, 1:10 do volume inicial de Acetato de Sódio 3 M e 2,5X de etanol 100%, gelado (-20°C). As amostras foram postas para precipitar por 2h a -20°C. Após este tempo, houve nova centrifugação (8228g/4°C/30min).

O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet formado, ressuspenso em 1mL de água MilliQ autoclavada. Adicionou-se, então, 1mL de cloreto de lítio (LiCl) 4M, armazenado a 4°C e, finalmente, as amostras foram postas em geladeira (4°C) overnight para nova precipitação. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (8228g/4°C/40min.). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 500µL de água MilliQ autoclavada. Para cada amostra, adicionou-se 50µL de acetato de sódio 3M e 1250µL de etanol 100% gelado. As amostras foram, novamente, incubadas a -20°C por 2h seguido de centrifugação por 40min a 4°C, 8228g e, em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O pellet foi lavado com 500µL de etanol 75%, gelado (-20°C) seguido de centrifugação (8228g, 4°C por 15min). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o tubo contendo o pellet colocado para secar na câmara de fluxo. Em seguida, o pellet foi ressuspendido em 60µL de água MilliQ autoclavada. As amostras foram quantificadas por meio do Nanovue Plus (GE) e depois armazenadas a -20°C.

4.3.3. Tratamento dos RNAs com DNase para sequenciamento e qPCR

Após extração e quantificação, as amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando o kit RQ1 RNase-FREE DNase (PROMEGA), a fim de eliminar DNA contaminante das amostras. Estas amostras foram novamente avaliadas quanto à qualidade

por meio do Bioanalyzer. Duas amostras analisadas apresentaram resultado negativo (14I/4DAI e 14I/8DAI), sendo que as mesmas não foram lidas pelo Bioanalyzer. Entretanto, uma observação por meio de gel de agarose foi realizada para certificar a qualidade do RNA (Figura 4.1). Após a quantificação, foi feita uma amostra única de RNA dos tratamentos inoculados, composta de 2µg de cada repetição biológica. Essa mistura equimolar de amostras inoculadas foi dividida em duas subamostras, armazenadas a -20°C.

Uma subamostra do RNA (3µg) foi enviada para a *High-Throughput Sequencing and Genotyping Unit*, do Centro de Biotecnologia da Universidade de Illinois, Estados Unidos, para ser sequenciada por meio da técnica Illumina (HiSeq 2000). Para o estudo de RNAseq, foram construídas 24 bibliotecas *paired-end* (6 coletas x 2 clones x inoculada e não inoculada), e o sequenciamento foi realizado com quatro bibliotecas por canaleta (HiSeq 2000). O RNA foi fragmentado por processo físico (micro-ondas) em fragmentos de tamanho entre 80 e 700pb.

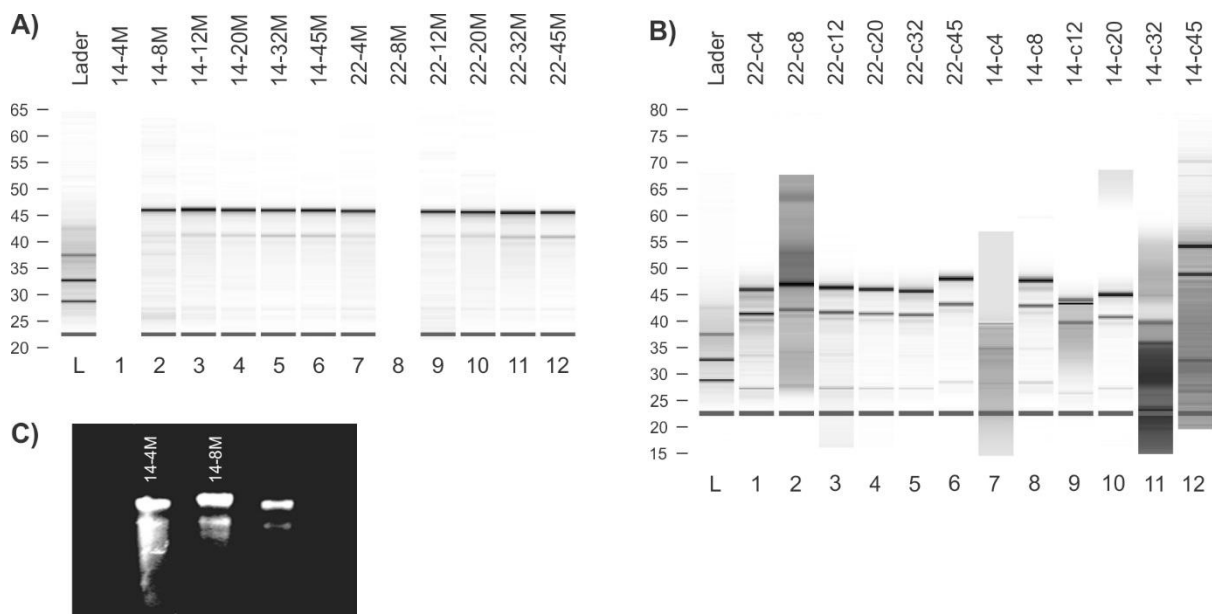


Figura 4.1. A-B) Gel virtual criado pelo Bioanalyzer após análise da qualidade das amostras de RNA extraídas enviadas para sequenciamento e usadas nos ensaios de qPCR. C) As amostras que não foram lidas pelo programa Bioanalyzer.

4.3.4. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A segunda subamostra foi tratada com RT-Improm-II reverse transcriptase (Promega) para produzir cDNAs que foram utilizados nos ensaios de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Para a síntese de cDNA, 1µg de RNA total foi tratado com o kit da Promega de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de PCR foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ-Research), usando o kit GoTaq DNA polimerase (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação – 94°C a 2min; anelamento (40 ciclos) – 94°C a 30 s, 55°C a 30 s e 73°C a 3min; e extensão – 72°C em 6min.

Após a síntese dos cDNAs, estes foram diluídos em 1:10, 1:20 e 1:40, a fim de ser testados para escolha da melhor diluição para qPCR. Utilizando o protocolo recomendado para o Fast 7500 Real Time PCP Systems (Applied Biosystems), a diluição que teve melhor resultado no teste inicial foi a de 1:10. Os *primers* foram desenhados utilizando-se o software *Primer Express* (Applied Biosystems), e após a síntese, foram inicialmente testados com um *mix* de cDNAs de raízes dos clones 14 e 22 inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis*.

Os *primers* escolhidos para um primeiro ensaio de qPCR (Tabela 4.1) foram selecionados a partir dos estudos prévios de Vieira (2015). Neste estudo, a expressão de *no hits*, genes de função desconhecida, foi analisada e alguns destes apresentaram perfis diferenciais de expressão em raízes de cafeeiro inoculadas com *M. incognita*. O segundo grupo de *primers* foi escolhido a partir do trabalho de Lepelley *et al.* (2012), que estudaram genes com expressão diferencial em *C. canephora* potencialmente relacionados com processos fisiológicos importantes, como a morte celular programada. Em todas as reações de qPCR, o gene codificando para a Ubiquitina (*CcUBQ10*) foi escolhido como controle endógeno. O calibrador interno no primeiro ensaio foi o clone 14 controle sem o patógeno. Nos ensaios que utilizaram os clones 14 e 22 inoculados em dias

Tabela 4.1. *Primers* testados no ensaio de PCR em Tempo Real (Vieira, 2012; Lepelley *et al.*, 2012)

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')
11524F	GGCGGTTGTCATGGATACG
11524R	TTTGGCTCACCAGCATATGTG
18112F	TGTGAACTGCCATCCCAAGA
18112R	AAGACTACCATGTCCAACAACCTTCAG
25639F	CGAGGAAGCTGAAGGAAAGGA
25639R	TCCGACTGGCCTAACAAGGT
30926F	AGGCTACGGAGGAGGCCAT
30926R	CCGTGTCCATAACCACCATGT
32791F	CCGAGCACCATTTCCAACAC
32791R	CCTTCTTCCTTTCTGGCTTCAA
33590F	CACCACCACCTCCAGTGCATAT
33590R	GTGGTGGTGGTGAAGTATACTTGTAAG
33656F	CTATGGTGGTGGTGGCTGGCTA
33656R	CTTCACCAAGGTGCTCAAGATTT
42747F	CGGAGGAGGCCATGGAGGT
42747R	CCCGTATCCACCACCATGG
CPI4F	TGTTTATGGTGTGGCTTTTCAGTTT
CPI4R	CGTAGGGAGACGTATGCATGAC
CP1F	ACACAGACCTCTTGATACCAAAACAT
CP1R	TCTTCCAAGAGCAAACCACCTT
CP4F	CAGGATGCAACGTGGTGTGG
CP4R	CCTCCATTGCTATCCCACAAA
CPI1F	TGTTTGGGAGATCTAATCTGATGATT
CPI1R	AAACCGAACACTTAACAGCAAAGA
42816F	GCCTGAAAGAGGTCCAACCA
42816R	CTCCGAACCTTGAAAACAGAAGA

separados, o calibrador interno foi o clone 14(4DAI).

Para cada reação de qPCR foi utilizado 1µL de cDNA diluído, 0,2µL do *primer forward* e 0,2µL do *primer reverse* a 10mM cada, 5µL do fluorocromo Platinum SyBRGreen qPCR MIX-UDG with ROX (Invitrogen) e 3,6µL de água MilliQ autoclavada, totalizando um volume final de 10µL por reação. Todas as reações foram feitas em triplicata. Com o propósito de detectar a presença de contaminação, foi feito um controle negativo para cada *primer*, denominado NTC (*no template control*), sem o cDNA. As reações foram incubadas

por 2min a 50°C, 5min a 95°C, 40 ciclos de amplificação de 3s a 95°C e 30s a 60°C, utilizando-se o Real Time 7500 Fast. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o software SDS 2.1 (Applied Biosystems).

A especificidade do *primer* foi verificada por meio do tempo médio de dissociação dos produtos amplificados, e a eficiência foi calculada utilizando os dados de fluorescência absoluta obtidos durante a fase exponencial da amplificação de cada reação. O nível de expressão do gene é calculado por meio da equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Quantificação Relativa) onde:

$$\Delta C_T (\text{amostra}) = C_T (\text{gene alvo}) - C_T (\text{controle endógeno})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{amostra}) - \Delta C_T (\text{calibrador interno})$$

4.3.5. Bioinformática

Para cada biblioteca, os resultados de RNAseq foram avaliados por meio do software Qseq, versão 7.0, pertencente ao pacote DNASTAR (Lasergene). Os valores foram normalizados por RPKM (*reads per kilobases per million*). Um duplo haploide de *C. canephora* foi usado como genoma de referência.

Os dados também foram analisados por meio do Excel, no qual foi possível calcular o Fator de Indução do clone 14 e do clone 22 (FIclone = genótipo inoculado/genótipo controle) e observar o quanto um determinado gene expressou mais no clone inoculado em relação ao clone controle por cromossomo. Calculou-se também o Q ($Q = FI14/FI22$), a fim de identificar quais genes e o quanto esses genes se expressaram mais no clone resistente a *M. paranaensis* em relação ao clone suscetível por cromossomo. *Coffea canephora* possui número haploide de 11 cromossomos, porém, um cromossomo extra foi gerado no ensaio *in silico*, denominado cromossomo 0, a partir de *reads* que não foram mapeados em nenhum dos 11 cromossomos.

Ao final, foi feita uma busca pela expressão basal dos genes selecionados em raiz de *C. canephora* no website coffee-genome.org (Coffee-Hub) (Figura 4.2). Este contém os dados resultantes do sequenciamento total desse cafeeiro divulgados por Denoeud *et al.* (2014). O website permite o acesso a informações como a estrutura e sequência do gene, proteína putativa, sequência da proteína, *locus* do gene, etc.

4.4. Resultados

4.4.1. Estudo da expressão genica por RNAseq.

Após as análises utilizando o software QSeq, foram obtidos os valores quantitativos de expressão para cada gene do transcriptoma de referência (25.574 genes), para cada uma das 24 bibliotecas analisadas. Foram gerados, em média, 40.000.000 de *reads* por biblioteca

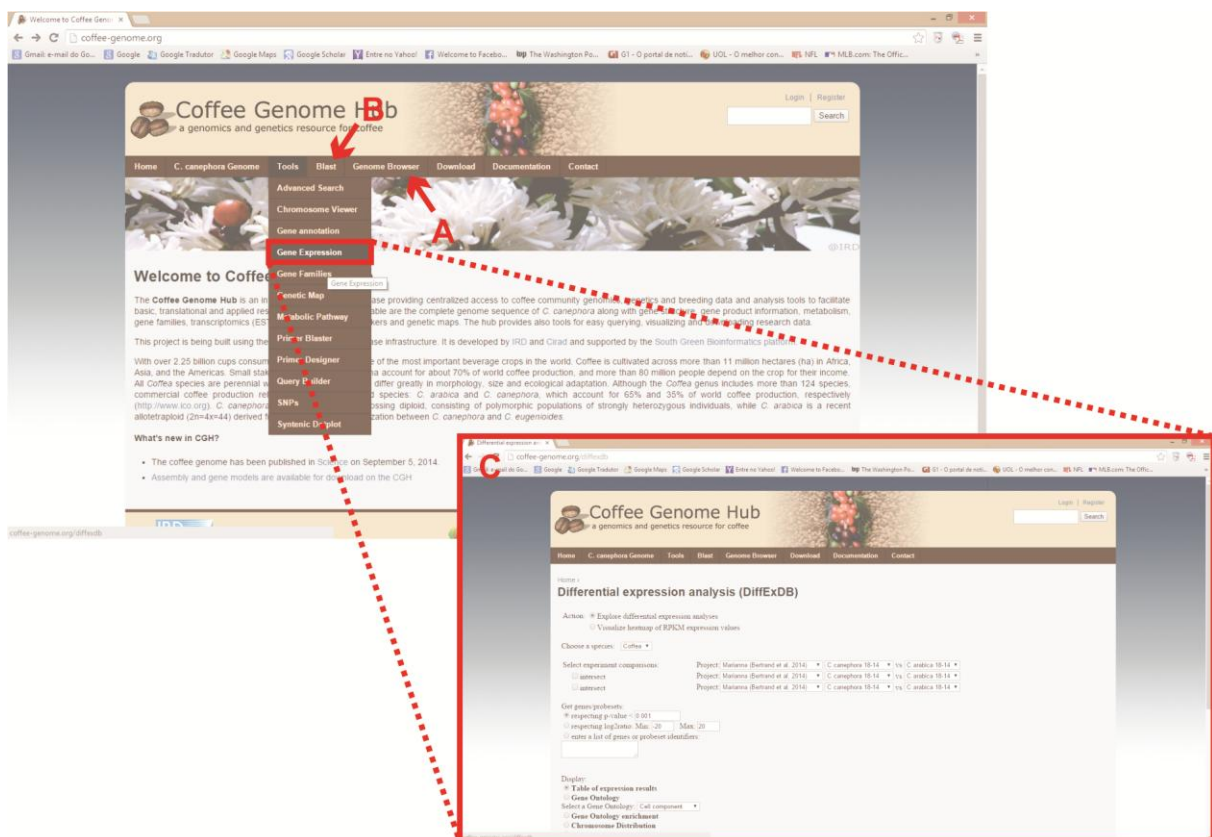


Figura 4.2. Ferramentas da plataforma “Coffee Genome HUB” (www.coffee-genome.org) utilizadas para análises dos dados obtidos *in silico* a partir de RNA de raízes inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis*. A) Genome Browser; B) Blast; e C) Análise da Expressão Diferencial.

totalizando 2.000.574.216 *reads* oriundos de raízes inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis* (Tabela 4.2).

Por meio desses dados, observou-se primeiramente uma maior dispersão de genes de resistência entre os clones 14 e 22 (antes e depois da inoculação) do que entre o clone 14 ou o clone 22 nas diferentes condições (inoculada/controle) (Figura 4.3). Em uma segunda observação do conjunto total de genes por meio do software QSeq, foi observado que nas amostras 14I (8DAI) e 22I (20DAI) houve uma queda geral da expressão dos genes. (Figura 4.4).

Também com os dados obtidos por meio do QSeq, foram calculados os valores de QC, que correspondem ao quociente entre os valores de expressão para cada amostra, para cada DAI e para cada gene nas condições controle (ex: $QC_{4\ DAI} = 14C_{4\ DAI} / 22C_{4\ DAI}$). Também foram calculados os valores de FI (fator de indução) de cada amostra, para cada DAI e para

Tabela 4.2. Bibliotecas geradas e número total de *reads* produzidos por meio do sequenciamento por Illumina (HiSec 2000) de raízes dos clones 14 e 22 de *Coffea canephora* inoculadas (I) e não inoculadas (C) com *Meloidogyne paranaensis*. Não foi obtido o número de *reads* referente ao nematoide presente nas raízes infectadas.

Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads
22-C-4	43.505.229	22-I-8	43.928.311	22-C-20	38.236.209	22-I-32	39.883.430
14-C-4	41.579.878	14-I-8	40.166.360	14-C-20	41.627.956	14-I-32	36.480.218
22-I-4	52.983.526	22-C-12	32.334.626	22-I-20	46.349.288	22-C-45	39.859.919
14-I-4	48.637.742	14-C-12	42.685.241	14-I-20	39.637.808	14-C-45	34.687.270
22-C-8	42.305.791	22-I-12	43.303.216	22-C-32	42.032.227	22-I-45	49.815.585
14-C-8	46.240.336	14-I-12	36.301.015	14-C-32	34.194.393	14-I-45	43.511.534
TOTAL de reads: 2.000.574.216							

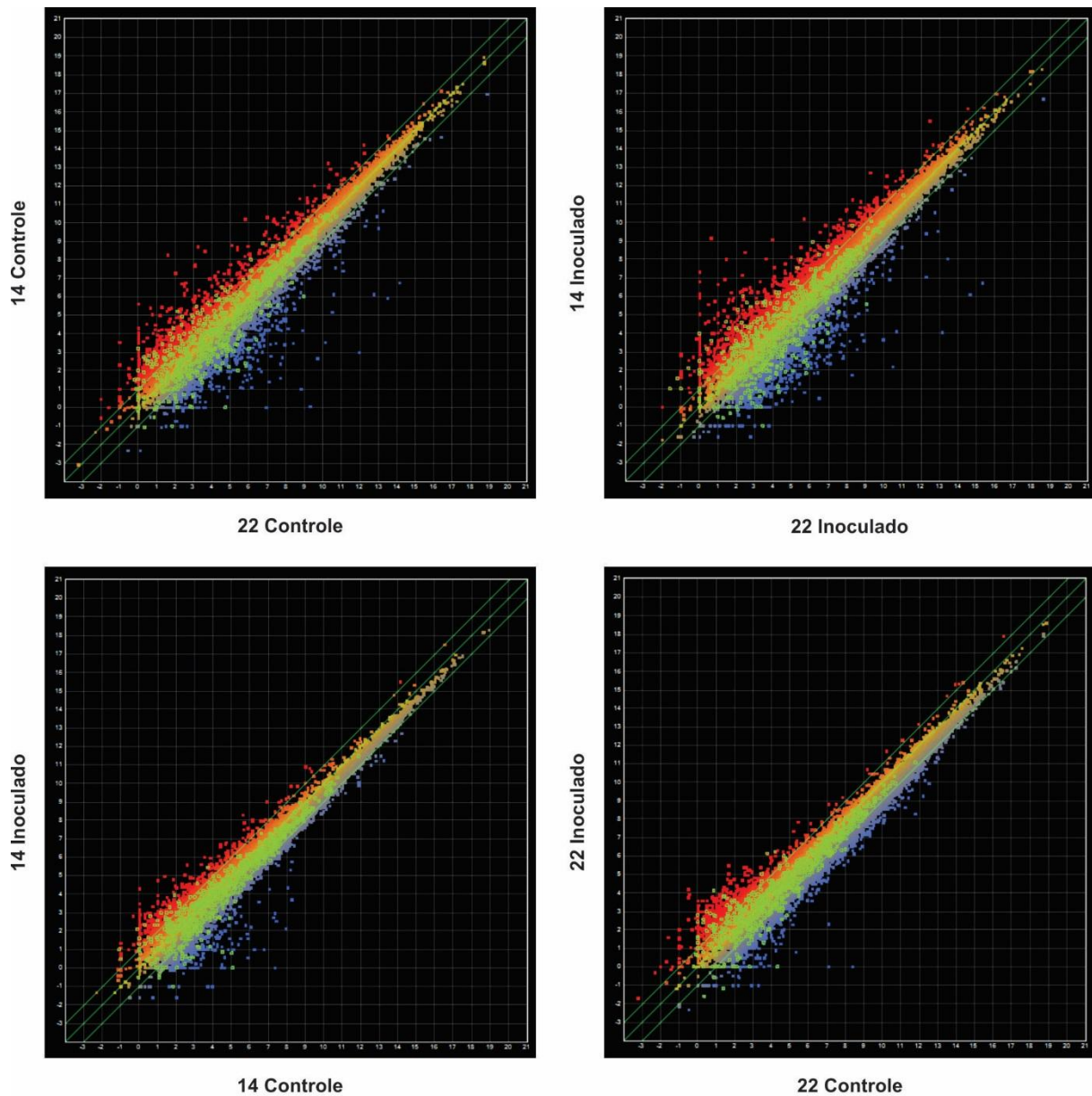


Figura 4.3. Dispersão dos genes de resistência (verde) nos clones 14 e 22 de *C. canephora*, em condições não inoculada (controle) e inoculado com *M. paranaensis*.

cada gene (ex: $FI_{14\ 4\ DAI} = 14I_{4\ DAI} / 14C_{4\ DAI}$). Por fim, foram calculados os valores de Q também para cada clone, para cada DAI e para cada gene ($Q = FI_{14} / FI_{22}$). Os valores de QC, FI e Q foram plotados por cromossomo, conforme a localização dos genes no genoma de referência de *C. canephora*. Vale ressaltar que segundo Denoud *et al.* (2014), o cromossomo 0 contém *contigs* que não puderam ser ligados ao mapa genético de *C. canephora*, e portanto a ordem dos genes não pode ser confirmada.

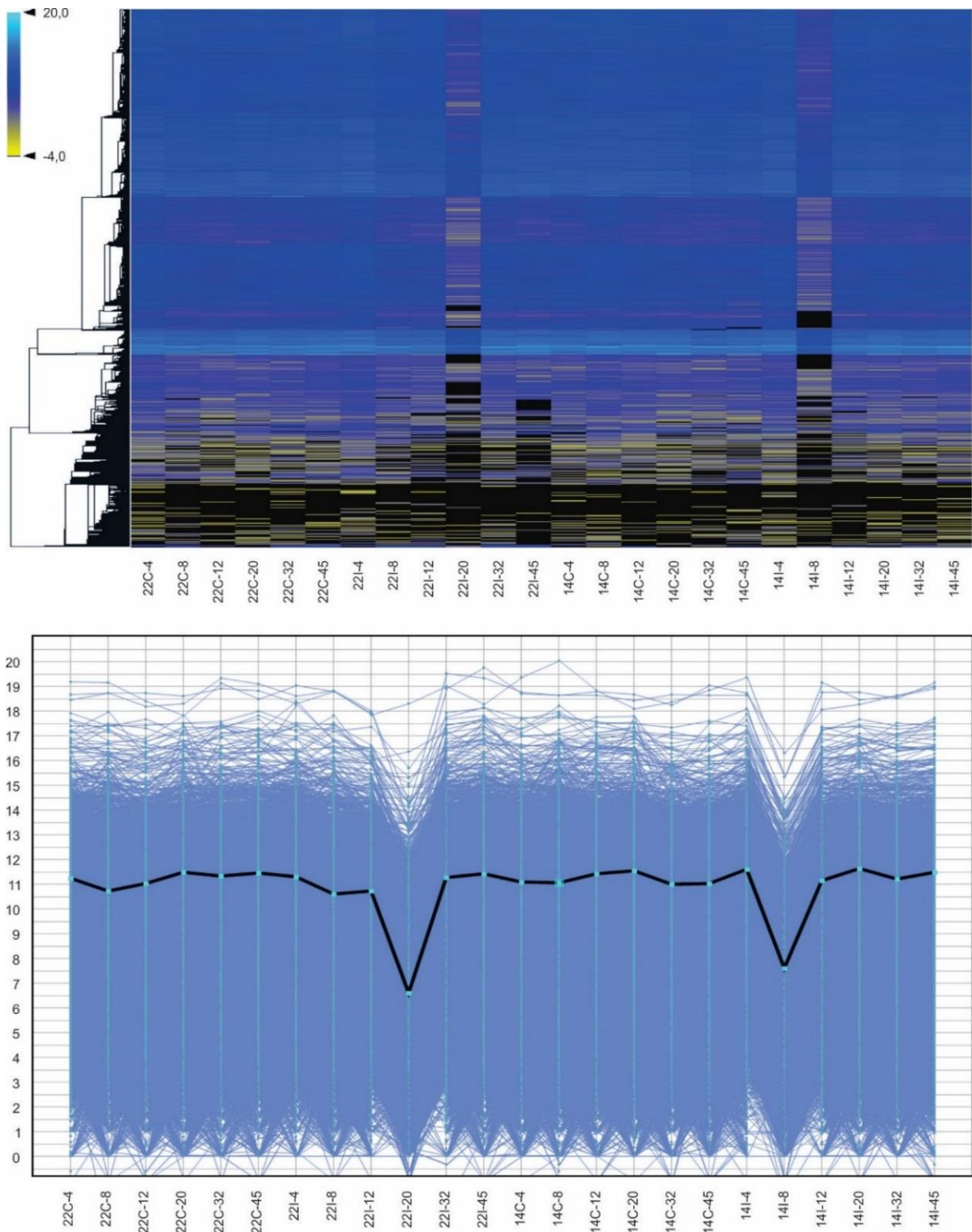


Figura 4.4. Expressão global dos genes de *C. canephora* nos clones 14 e 22, nas condições controle e inoculado com *M. paranaensis* em diferentes dias após a inoculação (DAI). Tanto no diagrama quanto no gráfico é possível observar o declínio na expressão global de genes aos 8 DAI (clone 14 inoculado) e 20 DAI (clone 22 inoculado).

Nas tabelas 4.3 a 4.8 estão apresentados os genes que foram mais expressos no clone 14 em relação ao clone 22 antes da inoculação (controle); os genes mais expressos no clone

14 inoculado em relação ao clone 14 não inoculado (controle); e os genes mais expressos no clone 14 em relação ao clone 22 após a inoculação. Todos esses genes apresentados pertencem ao conjunto de aproximadamente 25.000 genes que foram analisados por meio dos estudos de RNASeq de raízes dos clones 14 e 22 de *C. canephora*, inoculados e não inoculados com *M. paranaensis*.

Tabela 4.3. QC = 14C/22C – genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle.

Gene	Nome	Cromossomo	QC (14C/22C)*
GSCOCT00012545001	Hidroxicinnamoyl CoA	0	303,00
GSCOCT00012796001	Root hair defect 3 GTP-binding	0	185,00
GSCOCT00000828001	Hypothetical protein	0	180,00
GSCOCT00010407001	UDP-glucose glucosyltransferase	0	145,00
GSCOCT00007267001	<i>No hit</i>	0	99,00
GSCOCT00001556001	Occinol O-methyltransferase	0	80,00
GSCOCT00023914001	16KDa Membrane Protein	1	550,00
GSCOCT00030022001	Unknow	1	269,00
GSCOCT00030022001	Unknow	1	184,00
GSCOCT00024094001	Pred. Histone H2B	1	101,00
GSCOCT00023906001	Short chain alcohol dehydrogenase	1	55,00
GSCOCT00042816001	<i>No hit</i>	2	215,00
GSCOCT00025216001	<i>No hit</i>	2	112,00
GSCOCT00027634001	Predict Protein	2	75,00
GSCOCT00013917001	Dicer-like protein	2	71,00
GSCOCT00028767001	<i>No hit</i>	2	65,00
GSCOCT00042733001	Pred. Carboxypeptidase	3	79,00
GSCOCT00026671001	Uncharacterized protein	3	69,00
GSCOCT00030936001	<i>No hit</i>	3	60,37
GSCOCT00026135001	Conserved Hypothetical protein	3	43,00
GSCOCT00037300001	<i>No hit</i>	4	148,33
GSCOCT00035743001	Flavonol 4 sulfotransferase	4	63,60
GSCOCT00042096001	Unknown protein	5	305,00
GSCOCT00016841001	Predict protein	5	71,25
GSCOCT00035011001	Vacuolar Amino acid	5	60,00
GSCOCT00042185001	Predict protein	5	54,50
GSCOCT00023747001	Predict protein	6	65,93
GSCOCT00023747001	Predict protein	6	58,37

Tabela 4.3 (continuação). QC = 14C/22C – genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle.

Gene	Nome	Cromossomo	QC (14C/22C)*
GSCOCT00023747001	Predict protein	6	46,33
GSCOCT00033902001	No hit	7	498,50
GSCOCT00033902001	No hit	7	219,13
GSCOCT00033902001	No hit	7	197,33
GSCOCT00037494001	Predict protein	7	51,00
GSCOCT00042499001	Pred. gibberellin	8	76,14
GSCOCT00025282001	5EAS_CAPAN	8	68,00
GSCOCT00025232001	No hit	8	52,00
GSCOCT00023118001	Cholorophyll A/B binding protein	9	346,00
GSCOCT00011295001	CYP92B3	9	219,00
GSCOCT00020817001	Putative photosystem I reaction	9	198,67
GSCOCT00041100001	Uncharacterized protein	9	154,20
GSCOCT00033386001	Unnamed protein product	9	145,00
GSCOCT00034934001	Patatin T5 precursor	10	95,00
GSCOCT00033634001	Putative auxin	10	64,00
GSCOCT00024538001	No hit	10	57,67
GSCOCT00020506001	Light inducible protein	11	812,00
GSCOCT00004222001	G3PA tobac gliceraldeide-3	11	157,00
GSCOCT00032131001	Unnamed protein product	11	93,00

*- Valores de QC correspondem ao quanto o gene expressou mais no clone resistente controle em relação ao clone suscetível controle.

Tabela 4.4. QC = 14C/22C – genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle (somente genes de resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromossomo	QC(14C/22C)*
GSCOCT00010033001	NBS-LRR RP	0	34,50
GSCOCT00009259001	Disease resistance like protein	0	34,00
GSCOCT00010033001	NBS-LRR RP	0	30,00
GSCOCT00008874001	CC-NBS-LRR RP	0	20,00
GSCOCT00003819001	CC-NBS-LRR RP	0	14,50
GSCOCT00005539001	CC-NBS-LRR RP	1	18,00
GSCOCT00015471001	Disease resistance protein	1	16,71
GSCOCT00009723001	Disease resistance like protein	1	14,00
GSCOCT00009723001	Disease resistance like protein	1	8,00
GSCOCT00006332001	CC-NBS-LRR RP	2	10,00
GSCOCT00016739001	Disease response protein	2	6,87

Tabela 4.4 (continuação). QC = 14C/22C– genes que expressaram mais no ‘Clone 14’ controle em relação ao ‘Clone 22’ controle (somente de resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromossomo	QC(14C/22C)*
GSCOCT00001239001	CC-NBS-LRR RP	2	6,60
GSCOCT00015184001	CC-NBS-LRR RP	3	10,80
GSCOCT00026674001	CC-NBS-LRR RP	3	8,00
GSCOCT00015167001	CC-NBS-LRR RP	3	7,50
GSCOCT00031058001	Late blight RP	3	7,50
GSCOCT00012779001	Pred. disease resistance protein	4	19,00
GSCOCT00035968001	NBS-LRR RP	4	9,23
GSCOCT00035968001	NBS-LRR RP	4	7,58
GSCOCT00003013001	NBS-LRR RP	5	44,00
GSCOCT00009655001	NBS-LRR RP	5	19,00
GSCOCT00010974001	CC-NBS-LRR RP	5	9,33
GSCOCT00030724001	Disease resistance protein RPP1	6	3,89
GSCOCT00030728001	Disease resistance protein RPP1	6	2,85
GSCOCT00011165001	CC-NBS-LRR	7	13,00
GSCOCT00027223001	Disease resistance protein	7	10,50
GSCOCT00027223001	Disease resistance protein	7	9,80
GSCOCT00037649001	NBS-LRR	8	11,29
GSCOCT00037646001	Disease resistance like protein	8	10,00
GSCOCT00037649001	NBS-LRR	8	10,00
GSCOCT00034146001	NBS resistance protein	8	9,00
GSCOCT00034157001	Disease resistance protein	8	8,80
GSCOCT00017766001	Multi drug resistance pump.	9	9,00
GSCOCT00020826001	Pred. disease resistance protein	9	4,17
GSCOCT00020825001	NBS-LRR RP	9	3,50
GSCOCT00001425001	NBS-LRR RP	10	1,86
GSCOCT00031847001	Verticillium wilt disease resistance	10	1,58
GSCOCT00033041001	Disease resistance protein RPP1	11	24,00
GSCOCT00033035001	Disease resistance protein RPP1	11	17,00
GSCOCT00025510001	Disease resistance protein RPP1	11	14,40
GSCOCT00033035001	Disease resistance protein RPP1	11	11,67
GSCOCT00033048001	Disease resistance protein RPP1	11	11,00

*- Valores de QC correspondem ao quanto o gene expressou mais no clone resistente controle em relação ao clone suscetível controle.

Tabela 4.5. FI = 14I/14C – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com *Meloidogyne paranaensis* em relação ao ‘Clone 14’ controle.

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	FI14 (14I/14C)*
GSCOCT00008376001	<i>no hit</i>	0	45	1583,50
GSCOCT00005885001	cysteine protease	0	45	291
GSCOCT00012388001	organ specific protein	0	20	246
GSCOCT00012078001	chitinase-like xylanase inhibitor	0	20	219,25
GSCOCT00009210001	conserved hypothetical protein	0	32	214,86
GSCOCT00027441001	Pred. serine carboxipeptidase	1	45	289,50
GSCOCT00016386001	conserved hypothetical protein	1	20	144
GSCOCT00016240001	GRAS transcrip. Factor	1	45	89
GSCOCT00023941001	uncharacterized protein	1	4	86
GSCOCT00024119001	bHLH transcrip. Protein	1	32	64
GSCOCT00013913001	predicted protein	2	45	1966,50
GSCOCT00024961001	Os0700573400	2	45	524
GSCOCT00000727001	subtilisin-like protein	2	45	371,67
GSCOCT00024960001	conserved hypothetical protein	2	45	370,50
GSCOCT00028619001	classe III chitinase	2	45	215,00
GSCOCT00031729001	Probable polygalacturase	3	20	397
GSCOCT00031783001	Nucleic acid binding	3	45	138
GSCOCT00026796001	predict protein	3	45	79
GSCOCT00015223001	chitinase 2-like	3	45	71,43
GSCOCT00030936001	<i>no hit</i>	3	45	63,79
GSCOCT00022107001	predicted protein	4	45	146
GSCOCT00005311001	hipothetical protein	4	45	68,18
GSCOCT00003258001	U-box domain...	4	32	49
GSCOCT00042615001	Cytochrome	4	45	46,50
GSCOCT00037300001	<i>no hit</i>	4	45	42,28
GSCOCT00042172001	unnamed protein	5	45	196
GSCOCT00018255001	predicted protein	5	20	81,50
GSCOCT00021536001	<i>no hit</i>	5	8	43
GSCOCT00033505001	endoglucanase	5	32	34
GSCOCT00021087001	ABC transporter B	5	45	33,5
GSCOCT00004135001	Cysteine protease	6	45	952,33
GSCOCT00004136001	Cysteine protease	6	45	348
GSCOCT00040494001	organ-specific protein S2	6	20	260,10
GSCOCT00023747001	predicted protein	6	45	84,2
GSCOCT00004130001	Cysteine protease	6	45	73,61
GSCOCT00037058001	Predict proteinThiosulfato	7	45	135,77
GSCOCT00018784001	Predicted protein	7	45	85,19

Tabela 4.5 (continuação). FI = 14I/14C – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com *Meloidogyne paranaensis* em relação ao ‘Clone 14’ controle.

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	FI14 (14I/14C)*
GSCOCT00018792001	Predicted protein	7	45	81,38
GSCOCT00036833001	Gluthathiose-s-transferase	7	45	51,70
GSCOCT00037058001	Thiosulfate	7	32	33,19
GSCOCT00034192001	Cytochrome	8	45	234
GSCOCT00030328001	Predicted protein	8	45	101,63
GSCOCT00037738001	uncharacterized protein	8	45	76,50
GSCOCT00009056001	Unnamed protein product	8	45	59,10
GSCOCT00035586001	Uncharacterized protein	8	32	32,50
GSCOCT00004100001	<i>no hit</i>	9	20	322,81
GSCOCT00017411001	unnamed protein products	9	45	89
GSCOCT00011304001	CYP92Bv1	9	45	88
GSCOCT00020771001	<i>no hit</i>	9	45	46
GSCOCT00004100001	<i>no hit</i>	9	8	43,9
GSCOCT00006182001	predicted protein	10	45	161
GSCOCT00007300001	Miraculin-like protein	10	45	81
GSCOCT00033804001	eukaryotic translation	10	20	65
GSCOCT00016629001	Hypothetical protein	10	45	33,38
GSCOCT00012023001	Hypothetical protein	10	45	29
GSCOCT00020606001	<i>no hit</i>	11	45	474,28
GSCOCT00020621001	coniferyl alcohol 5 hidroxilase	11	8	98
GSCOCT00042913001	non cell autonomous protein	11	32	56
GSCOCT00032914001	unnamed protein products	11	45	51
GSCOCT00018107001	Rec. name full lignin-forming	11	32	45

*- FI corresponde ao quanto o ‘Clone 14’ inoculado expressa mais do que o ‘Clone 14’ controle.

Tabela 4.6. FI = 14I/14C – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com *Meloidogyne paranaensis* em relação ao ‘Clone 14’ controle (somente genes de resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromosomo	DAI	FI14(14I/14C)*
GSCOCT00019006001	Putative Disease Resistance Protein RPP8	0	8	28,18
GSCOCT00000801001	Putative Disease Resistance Protein RPM1	0	45	15,00
GSCOCT00000023001	Putative Disease Resistance Protein RGA4	0	4	12,00
GSCOCT00013683001	Putative Disease Resistance Protein RPM1	0	32	10,50
GSCOCT00005762001	Putative Disease Resistance Protein RGA2	0	8	9,50
GSCOCT00011031001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	1	45	14,00
GSCOCT00019293001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	1	45	12,00

Tabela 4.6 (continuação). FI = 14I/14C– genes que mais expressaram no ‘Clone 14’ inoculado com *Meloidogyne paranaensis* em relação ao ‘Clone 14’ controle (somente genes diretamente relacionados à resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromosomo	DAI	FI14(14I/14C)*
GSCOCT00033153001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	1	8	10,00
GSCOCT00011041001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	1	20	10,00
GSCOCT00011037001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	1	45	5,75
GSCOCT00006332001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	2	45	20,00
GSCOCT00038876001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	2	4	7
GSCOCT00015155001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	3	8	14,00
GSCOCT00026416001	Pred. oxidation resistance p.	3	4	8,00
GSCOCT00043214001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	3	20	7,00
GSCOCT00037420001	Disease Resistance Protein	4	20	14,00
GSCOCT00000794001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	5	45	15,50
GSCOCT00010974001	CC-NBS-LRR Resistance Protein	5	20	6,83
GSCOCT00034079001	Disease Resistance Protein	6	4	6,00
GSCOCT00030725001	NBS-LRR Resistance Protein	6	4	3,75
GSCOCT00030726001	Disease Resistance Protein	6	20	3,63
GSCOCT00033894001	Disease Resistance-Responsive	7	12	4,50
GSCOCT00034157001	Pred. resistance protein	8	45	22,50
GSCOCT00025229001	Nematode resistance like-protein	8	45	13,00
GSCOCT00038390001	Disease Resistance Protein	8	45	12,00
GSCOCT00023073001	Putative NBS domain resistance protein	9	45	3,71
GSCOCT00001425001	NBS-LRR Resistance Protein	10	4	5,60
GSCOCT00033032001	Disease Resistance Protein RPP1	11	4	24,00
GSCOCT00032130001	TMV Resistance Protein	11	20	13,00

*- FI corresponde ao quanto o ‘Clone 14’ inoculado expressa mais do que o ‘Clone 14’ controle.

Tabela 4.7. Relação Q = FI14/FI22 – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’.

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	Q(FI14/FI22)*
GSCOCT00008376001	<i>no hit</i>	0	45	3426,45
GSCOCT00005885001	cysteine protease	0	45	3243,93
GSCOCT00010430001	cinamyl alcohol dehydrogenase	0	20	1062,96
GSCOCT00007149001	Pred. Bark Storage Protein	0	45	821,54
GSCOCT00001290001	Low quality protein	0	45	773,80
GSCOCT00027441001	Pred. serine carboxipeptidase	1	45	1560,31
GSCOCT00030116001	DELLA protein RGL2	1	20	377,98
GSCOCT00024197001	hypothetical protein	1	20	334,45

Tabela 4.7 (continuação). Relação Q = FI14/FI22 – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’.

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	Q(FI14/FI22)*
GSCOCT00024141001	serine carboxipeptidase	1	20	294,32
GSCOCT00016210001	AP2/ERF domain-containing trans.	1	32	262,50
GSCOCT00013913001	Predict protein	2	45	6098,98
GSCOCT00000727001	Pred. Subtilisin-like protein	2	45	2880,91
GSCOCT00024960001	Conserved hypothetical protein	2	45	2757,38
GSCOCT00024961001	Os07g0573400	2	45	2669,13
GSCOCT00028619001	Class III chitinase	2	45	2396,62
GSCOCT00031783001	Nucleic acid binding protein *	3	45	801,57
GSCOCT00026453001	Predict protein	3	20	711,05
GSCOCT00042041001	CYP71AU1	3	20	434,05
GSCOCT00031037001	ATP binding protein	3	20	380,23
GSCOCT00026230001	Hypothetical protein	3	20	349,95
GSCOCT00042664001	Receptor-like protein kinase	4	20	579,84
GSCOCT00035750001	Pred. probable calcium...	4	20	472,69
GSCOCT00021802001	Nuclear transcription factor	4	20	324,41
GSCOCT00005311001	Hypothetical protein	4	45	254,02
GSCOCT00021937001	Pred. ABC transporter G	4	20	205,56
GSCOCT00042172001	Unnamed protein product	5	45	1241,33
GSCOCT00038604001	Predict protein	5	20	406,93
GSCOCT00021502001	Predict protein	5	20	391,01
GSCOCT00021494001	Gluthatione-s-transferase	5	20	387,56
GSCOCT00021259001	3-hydroxybutyryl-CoA	5	20	359,07
GSCOCT00004135001	Cysteine protease	6	45	3118,39
GSCOCT00004136001	Cysteine protease	6	45	2110,84
GSCOCT00017141001	Unnamed protein product	6	20	555,84
GSCOCT00017142001	Unnamed protein product	6	20	503,65
GSCOCT00040431001	beta 1,3-glucanase	6	20	462,65
GSCOCT00036833001	Gluthatione s-transferase	7	20	2407,76
GSCOCT00037577001	ABC transporter F...	7	20	622,26
GSCOCT00018623001	SAUR family protein	7	20	535,24
GSCOCT00033902001	<i>no hit</i>	7	20	522,00
GSCOCT00037634001	Cytochrome P450	7	20	427,46
GSCOCT00030554001	auto inhibited H ⁺ ATPse	8	45	2529,60
GSCOCT00034192001	Pred. cytochrome P450*	8	45	2002,00
GSCOCT00035448001	Pred. uncharacterized protein	8	20	652,17
GSCOCT00038398001	Predicted protein	8	20	479,52
GSCOCT00038403001	Serine-threonine protein kinase	8	20	478,08

Tabela 4.7 (continuação). Relação $Q = FI14/FI22$ – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’.

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	$Q(FI14/FI22)^*$
GSCOCT00017411001	unnamed protein product	9	45	3560,00
GSCOCT00041040001	Predict protein	9	20	1047,00
GSCOCT00017935001	Conserved hypothetical protein	9	20	226,93
GSCOCT00017678001	ANK63969.1	9	45	191,92
GSCOCT00011304001	CYP92B2v1	9	45	176,00
GSCOCT00006182001	Predicted protein *	10	45	842,97
GSCOCT00024784001	Hipothetical protein	10	20	631,75
GSCOCT00034980001	DCL protein	10	20	444,83
GSCOCT00031547001	NTGP4	10	20	314,77
GSCOCT00033725001	no hits	10	20	294,52
GSCOCT00018107001	Lignin-forming	11	32	6210,00
GSCOCT00032817001	Predict protein	11	20	752,19
GSCOCT00019652001	Predict protein	11	20	669,64
GSCOCT00032490001	Conserved Hypothetical Protein	11	20	516,95
GSCOCT00034052001	Pred. G patch domain...	11	20	455,62

*- Valores de Q correspondem ao quanto o gene expressou mais no clone resistente em relação ao clone suscetível.

Tabela 4.8. Relação $Q = FI14/FI22$ – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’ (somente genes de resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	$Q(FI14/FI22)^*$
GSCOCT00012294001	Pred. disease resistance protein	0	20	94,63
GSCOCT00001853001	BED finger-NBS-LRR resistance protein	0	20	88,75
GSCOCT00008619001	Pred. disease resistance protein	0	20	83,19
GSCOCT00000981001	Disease resistance protein	0	20	82,24
GSCOCT00000618001	NBS-LRR resistance protein	0	20	78,50
GSCOCT00033153001	CC-NBS-LRR resistance protein	1	8	160,00
GSCOCT00038876001	Disease resistance protein 3a-like...	2	4	28,00
GSCOCT00006332001	CC-NBS-LRR resistance protein	2	45	20,00
GSCOCT00018396001	Pred. disease resistance	2	20	18,09
GSCOCT00014325001	multidrug resistance	2	20	6,46
GSCOCT00015151001	CC-NBS-LRR resistance protein	3	20	109,25
GSCOCT00035963001	CC-NBS-LRR resistance protein	4	20	75,50
GSCOCT00035924001	CC-NBS-LRR resistance protein	4	20	49,82
GSCOCT00012776001	CC-NBS-LRR resistance protein	4	20	33,98

Tabela 4.8 (continuação). Relação $Q = FI14/FI22$ – genes que mais expressaram no ‘Clone 14’, em comparação ao ‘Clone 22’ (somente genes diretamente relacionados à resistência a patógenos).

Gene	Nome	Cromossomo	DAI	Q(FI14/FI22)*
GSCOCT00035090001	Disease resistance protein	5	20	44,71
GSCOCT00000794001	CC-NBS-LRR resistance protein	5	45	34,99
GSCOCT00016835001	CC-NBS-LRR resistance protein	5	20	30,79
GSCOCT00021086001	Non race specific disease resistance	5	20	20,91
GSCOCT00030728001	Disease resistance protein	6	20	33,47
GSCOCT00022972001	NBS-LRR resistance protein	6	20	24,99
GSCOCT00041780001	Disease resistance protein	6	20	21,15
GSCOCT00018839001	Disease resistance protein	7	20	19,05
GSCOCT00037658001	NBS-LRR resistance protein	8	45	70,00
GSCOCT00034240001	NBS-LRR resistance protein	8	20	41,75
GSCOCT00023073001	NBS domain resistance protein	9	4	3,77
GSCOCT00001439001	Disease resistance protein	10	20	9,30
GSCOCT00031847001	Verticillium wilt disease resistance	10	20	6,90
GSCOCT00025510001	Disease resistance protein	11	20	137,49
GSCOCT00033046001	Disease resistance protein	11	20	50,73
GSCOCT00033035001	Disease resistance protein	11	20	45,82

*- Valores de Q correspondem ao quanto o gene expressou mais no clone resistente em relação ao clone suscetível.

Ao analisar os dados de QC ($QC=14C/22C$), apresentados nas tabelas 4.3 e 4.4, pode-se observar que vários dos genes apresentam expressão diferencial entre os clones, mesmo nas condições controle. Conseqüentemente, genes no clone 14 que codificam proteínas possivelmente associadas à defesa contra patógenos podem ser identificados, uma vez que apresentam níveis mais altos de expressão antes mesmo da presença do patógeno. Como exemplos, é possível citar os genes GSCOCT00012545001, que codifica uma proteína Hidroxicinnamoyl-CoA ($QC = 303$) (tabela 4.3), e os genes GSCOCT00010033001, GSCOCT00009259001 e GSCOCT00010033001, que codificam proteínas de resistência a fitopatógenos ($QC > 30$) (tabela 4.4).

Quanto à relação entre os clones antes e depois da inoculação, a expressão dos genes GSCOCT00031847001 e GSCOCT00030728001, ambos codificando proteínas de resistência

a patógenos, foi baixa (1,58 e 2,85 respectivamente) (Tabela 4.4), porém, aumentou na presença do patógeno ($Q = 6,90$ e $33,47$) (Tabela 4.8). Observou-se que o gene GSCOCT00037300001 (*no hit*) teve a expressão no clone 14 controle 148,33 vezes maior que no clone 22 controle (Tabela 4.3). No entanto, o FI no clone 14 deste gene foi de 42,28 (tabela 4.5), ou seja, a sua expressão diminuiu no clone resistente inoculado. O gene GSCOCT00034157001 (proteína de resistência) apresentou $QC = 8,80$, menor que o seu FI de 22,50, aos 45 DAI.

O gene GSCOCT00001425001 (proteína de resistência NBS-LRR) obteve $QC = 1,86$ e $FI = 5,60$ no 4º DAI, e o gene GSCOCT00010974001 (proteína de resistência NBS-LRR) mostrou uma relação 14C/22C (QC) 9,33 vezes maior que 14I/14C ($FI = 6,83$) aos 20 DAI (Tabelas 4.4 e 4.6). Na Figura 4.5, é possível visualizar a expressão dos genes de *C. canephora* antes e depois da infecção por *M. paranaensis*. Finalmente, o gene GSCOCT6332001 (proteína de resistência NBS-LRR), na ausência do patógeno, apresentou um $QC = 10,00$. Com a inoculação, o clone 14 apresentou expressão 20 vezes maior que o clone 22. O clone 14 inoculado também apresentou expressão 20 vezes maior que o clone 14 não inoculado para este gene. Em ambas as relações (Q e FI) do gene GSCOCT00006332001, o pico de expressão foi aos 45 DAI.

Com o objetivo de identificar os genes que se expressaram mais no clone 14 inoculado com *M. paranaensis* em relação ao clone 14 controle, foi calculada a diferença de expressão por meio do fator de indução ($FI=14I/14C$). Calculou-se o FI para o conjunto total de genes (Tabela 4.5) e somente para os genes diretamente relacionados com a resistência (Tabela 4.6). Destacam-se quanto ao FI do clone 14 genes que codificam cisteína protease (CP) (GSCOCT00005885001, GSCOCT00004135001, GSCOCT00004136001) serina carboxipeptidase (GSCOCT00027441001), citocromo P450 (GSCOCT00034192001), proteínas de resistência (GSCOCT00019006001, GSCOCT00006332001,

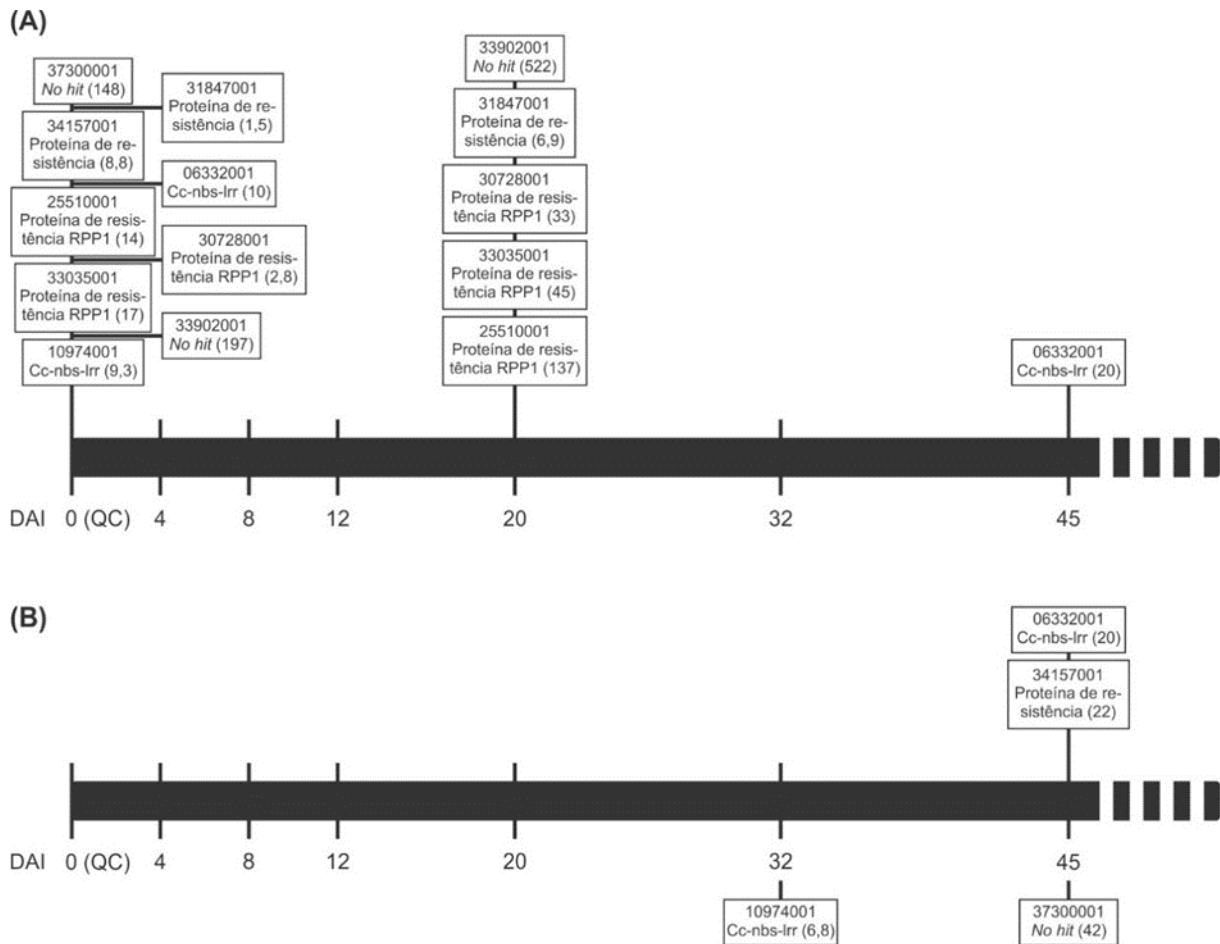


Figura 4.5. Genes de resistência que mais se destacaram antes (QC) e após a infecção por *M. paranaensis*, quanto ao Q (A) e o FI (B) em diferentes tempos. A escala de tempo em dias após a inoculação (DAI) e representada abaixo de cada gráfico. Os genes que estão acima da barra do gráfico tiveram sua expressão aumentada em relação ao tempo zero (QC) e o que se encontra abaixo da barra a expressão diminuiu. O número entre parênteses que acompanha cada gene representa o valor da expressão.

GSCOCT00034157001), *no hits* (GSCOCT00008376001, GSCOCT00020606001), etc.

Nas tabelas 4.7 e 4.8 estão apresentados os valores de expressão ($Q=FI_{14}/FI_{22}$), para cada tempo de coleta (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI), representando quantitativamente a diferença de expressão gênica entre os clones 14 e 22 em resposta à infecção por *M. paranaensis*. Analizando-se esses dados, verifica-se que, dentre os genes que mais se expressaram no clone 14 em relação ao clone 22 (Q) em função da infecção por nematoide, se destacam os que codificam cisteína proteases (GSCOCT00005885001, GSCOCT00004135001 e GSCOCT00004136001), alguns dos quais tiveram expressão de até 3.243 vezes maior que o

clone 22 (GSCOCT00005885001). O gene codificando para uma proteína envolvida na formação de lignina, *Lignin-forming* (GSCOCT0008107001), foi expresso 6.210 vezes mais no clone 14 que no clone 22 em resposta à infecção com nematoide.

Outros genes que apresentaram expressão diferencial entre os clones, em resposta à infecção com nematoide, apresentando maiores valores de Q no clone 14 do que no clone 22, encontram-se destacados (em verde) na tabela 4.7, como por exemplo o que codifica uma proteína de classe III quitinase (GSCOCT00028619001), localizado no cromossomo 2, e outro que codifica uma proteína, Citocromo P450 (CSCOCT00034192001), localizado no cromossomo 8, com diferencial de 2396 e 2002 vezes, respectivamente, maior no clone resistente (14) que no suscetível (22). Os dados apresentados na Figura 4.6A, também nos permitem concluir que os maiores valores de Q, representando a resposta diferencial na expressão genica em raízes na presença de nematoides, do clone 14 quando comparado ao clone 22, foram observados nos estágios finais do ciclo de infecção do nematoide (entre 20 DAI e 45DAI). Na Figura 4.6 (A e B), é possível comparar os valores de expressão dos genes que se destacaram quanto ao Q e FI do clone 14 durante o período de infecção (4 a 45 DAI).

Na tabela 4.8 estão apresentados os valores de Q, especificamente para genes de café, com similaridade a genes de resistência à fitopatógenos (ex: NBS-LRR), já descritos na literatura. Os genes que apresentaram os maiores valores de Q estão destacados em azul. Os dados apresentados na citada Tabela nos permitem concluir que vários genes de café com similaridade a genes R (resistência à fitopatógenos), apresentaram expressão diferencial entre os clones 14 e 22, em resposta à infecção pelo nematoide. Como por exemplo o gene GSCOCT00033153001, localizado no cromossomo 1 e o gene GSCOCT00015151001 localizado no cromossomo 3, cujos valores de Q foram iguais a aproximadamente 160 e 109, respectivamente. Outro gene com expressão aproximadamente 137 vezes maior no clone 14 que no clone 22 é o que codifica, também, uma proteína de resistência a doenças

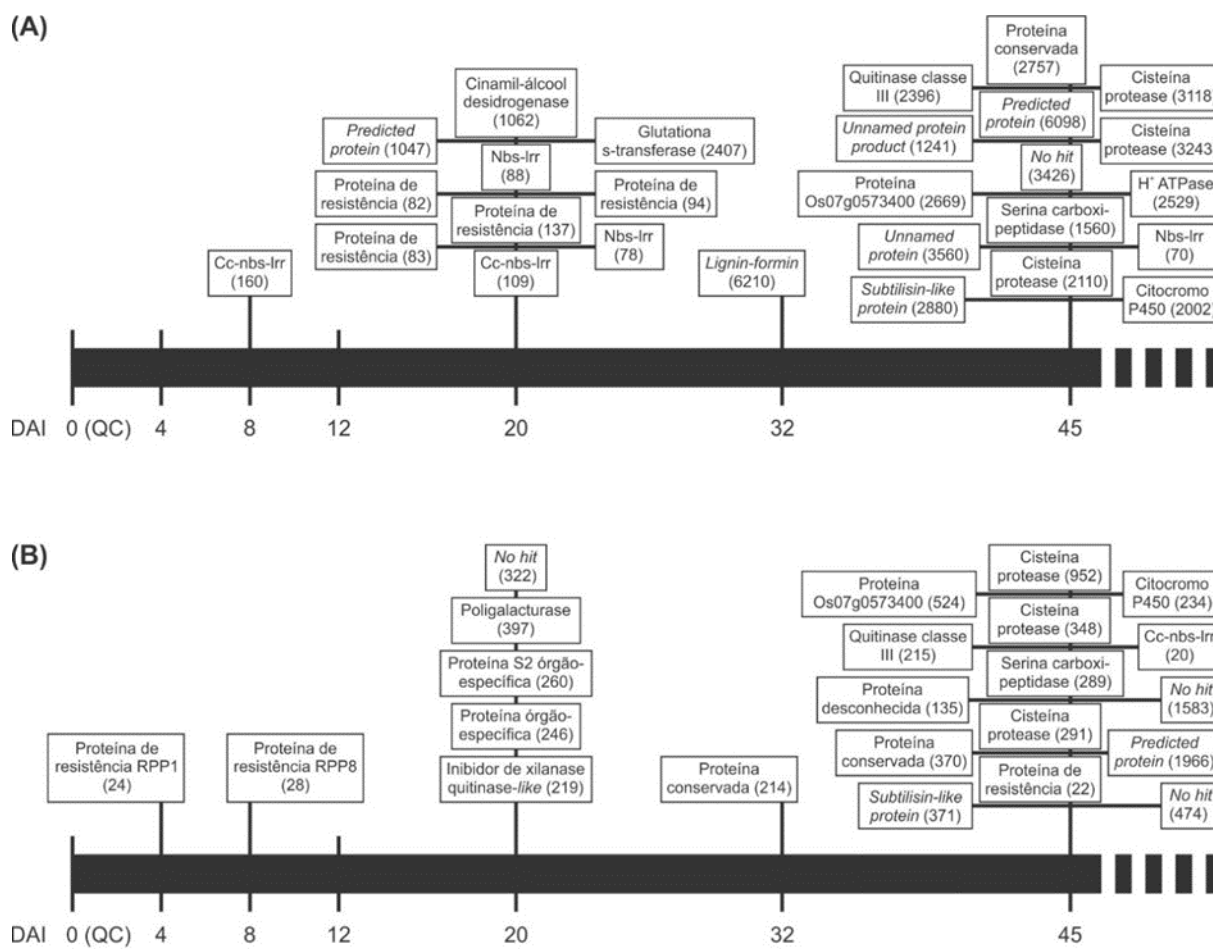


Figura 4.6. Proteínas putativas relacionadas aos genes que mais se destacaram quanto ao Q (A) e o FI (B), em diferentes tempos, após a infecção por *M. paranaensis*. O número entre parênteses que acompanha cada proteína putativa representa o valor da expressão do gene que a codifica.

(GSCOCT00025510001).

Tanto no que se refere ao conjunto total de genes, quanto aos relacionados à resistência a fitopatógenos, a diferença de expressão foi maior na comparação entre os clones 14 e 22 do que na comparação dos tratamentos 14I vs. 14C. Esse resultado também foi observado por meio de QSeq (Figura 4.3) onde a dispersão dos genes de resistência foi maior na relação 14/22 que na relação 14I/14C ou mesmo 22I/22C.

Em resumo, os resultados das análises *in silico* de RNAseq nos permite concluir que vários genes apresentam expressão diferencial entre os clones 14 e 22 e podem estar associados à resistência a *M. paranaensis*. Genes que atuam no metabolismo de lignina, genes

de resistência e também genes de função desconhecida, apresentam perfil diferencial entre os clones. Esses genes se expressaram mais no clone 14 que no clone 22 e mais também após a inoculação do clone resistente. De modo geral, a expressão desses genes, no que se refere ao FI e Q, foi maior nos dias finais do ciclo de infecção do patógeno com exceção dos genes que codificam proteínas de resistência que apresentaram maior Q nos dias iniciais.

4.4.2. Validação da expressão dos genes candidatos pré-identificados por meio de qPCR

Com o objetivo de testar alguns *primers* propostos na literatura relacionados a genes envolvidos com a morte celular programada e *no hits*, genes de função desconhecida e, também, a fim de verificar resultados *in silico* comparando-os com os resultados *in vivo*, realizou-se qPCRs com o mesmo RNA utilizado nos ensaios de RNAseq.

Os gráficos presentes na figura 4.7 mostraram a expressão dos genes por meio de qPCR. Neste ensaio, destacou-se o gene 11524 “*no hit*” que expressou no clone 14 e não no clone 22 nas duas vezes que foi realizado qPCR para esses *primers*. Destaque também para a diferença de expressão do gene CP1 que codifica uma cisteína protease, e o Inibidor da Cisteína Protease – CPI1, cuja expressão foi diferencial entre ambos os clones.

Os *primers* referentes à CP1 (cisteína protease) e CPI1 (inibidor da cisteína protease) foram, também, testados nos clones 14 e 22 inoculados em dias separados (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI) a fim de observar a expressão como a expressão diferencial dos clones ocorreu nos diferentes dias. No que se refere à CP1, a expressão foi alta no clone 22 aos 4 DAI e depois permaneceu baixa nos demais dias. Já no clone 14, a expressão foi maior aos 4 e 20 DAI, porém, em geral, foi mais discreta que no clone suscetível. A expressão da CPI1 foi sensivelmente maior no clone 14 que no clone 22, sendo que no clone resistente o maior pico de expressão foi aos 45 DAI. No clone suscetível, o padrão de expressão do CPI1 foi semelhante ao padrão do CP1, com expressão maior aos 4 DAI.

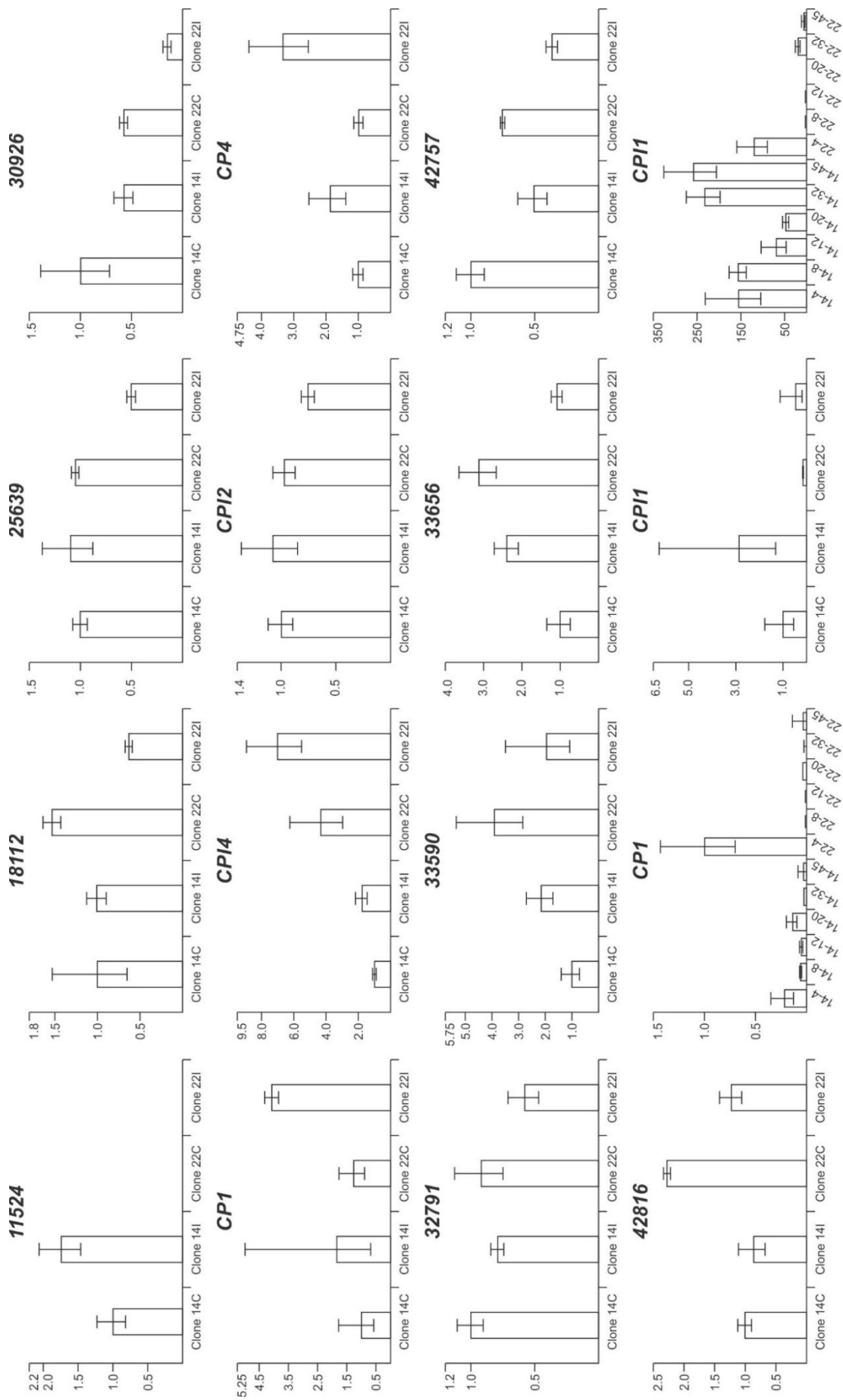


Figura 4.7. *Primers* testados (nome em negrito e itálico acima de cada gráfico) em ensaios de qPCR de cDNA de raízes dos clones 14 e 22 infectadas e não infectadas por *M. paranaensis*. O eixo x corresponde às amostras testadas e o eixo y, ao valor de expressão

Com base nos valores de Q e FI obtidos através do sequenciamento de *C. canephora* clone 14 e clone 22 infectados com *M. paranaensis*, e também nos resultados de qPCR, foram selecionados 19 genes cuja expressão foi diferencial (Tabela 4.9). Foi realizada uma busca por esses genes selecionados no Coffee-Hub, e verificou-se que a expressão dos mesmos em raízes de *C. canephora* sem o nematoide foi baixa para a maioria dos genes (Figura 4.8), o que pode ser mais uma demonstração de que a diferença de expressão no clone 14 inoculado com *M. paranaensis* em relação ao clone 14 não inoculado e clone 22 pode ser devida à infecção pelo nematoide.

Tabela 4.9. Genes candidatos à resistência a *M. paranaensis* que se destacaram quanto ao Q e FI do clone 14 e a expressão basal dos mesmos nas raízes de *C. canephora* e *Coffea* encontrada em coffe-genome.org. Todos esses genes não tiveram alto valor de QC.

Gene	Locus	Função	Deteção
GSCOCT00033153001	Cc01_g03180	Resistance protein	<i>In silico</i>
GSCOCT00025510001	Cc11_g02900	Rpp8-like P	<i>In silico</i>
GSCOCT00033032001	Cc11_g02060	Resistance protein	<i>In silico</i>
GSCOCT00006332001	Cc02_g36230	Resistance protein	<i>In silico</i>
GSCOCT00015151001	Cc03_g12800	Resistance protein	<i>In silico</i>
GSCOCT00028619001	Cc02_g26340	Chitinase	<i>In silico</i>
GSCOCT00034192001	Cc08_g03930	Citocromo P450	<i>In silico</i>
GSCOCT00024960001	Cc02_g26600	Proteína conservada	<i>In silico</i>
GSCOCT00004135001	Cc06_g16820	Cisteína protease	<i>In silico</i>
GSCOCT00018107001	Cc11_g07100	Lignina *	<i>In silico</i>
GSCOCT00004136001	Cc06_g16830	Cisteína protease	<i>In silico</i>
GSCOCT00030143001	Cc01_g07170	Inibidor cisteína protease	qPCR
GSCOCT00019006001	Cc00_g01140	Resistance protein	<i>In silico</i>
GSCOCT00029487001	Cc02_g10820	Cisteína protease	qPCR
GSCOCT00011524001	Cc00_g16260	<i>No hits</i>	qPCR
GSCOCT00010430001	Cc00_g29810	Cinamil álcool desidrogenase	<i>In silico</i>
GSCOCT00008376001	Cc00_g26820	<i>No hits</i>	<i>In silico</i>
GSCOCT00005885001	Cc00_g21130	Cisteína protease	<i>In silico</i>
GSCOCT00034157001	Cc08_g03710	Resistance protein RPM1	<i>In silico</i>

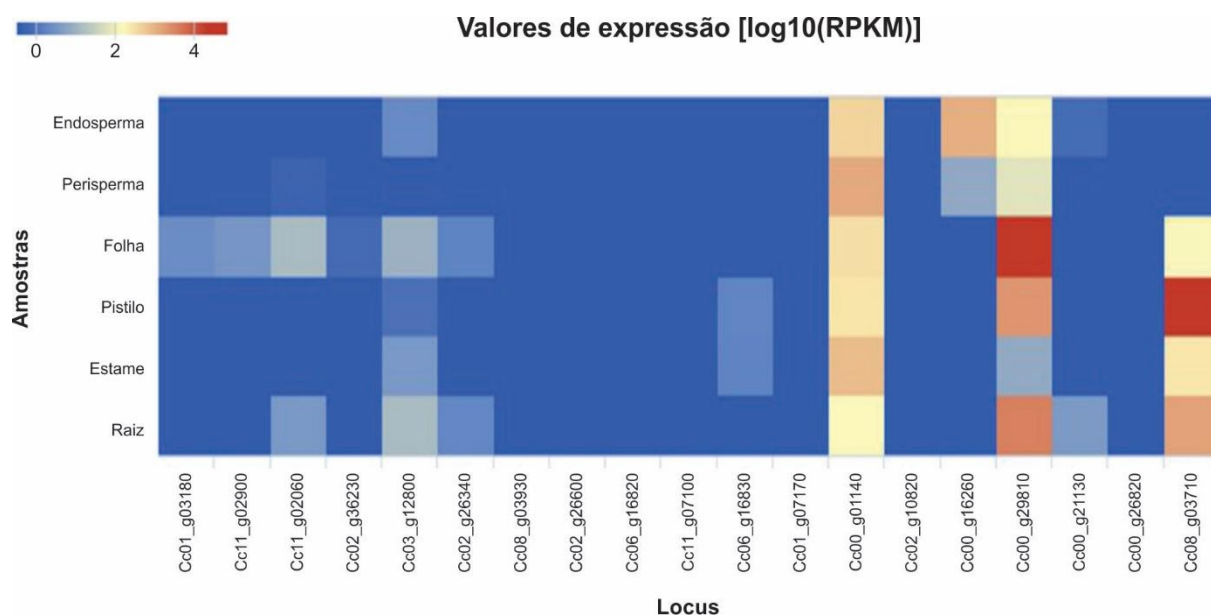


Figura 4.8. Expressão dos genes candidatos à resistência em diferentes órgãos de *C. canephora*. Dados obtidos por meio do Coffee Genome Hub (coffee-genome.org) onde se encontram os resultados do sequenciamento total de *Coffea canephora* (Denoeud *et al.*, 2015).

4.5. Discussão

Os estudos de RNASeq demonstraram que, em geral, houve uma diferença maior no perfil de expressão na comparação entre os clones 14 e 22 do que entre os tratamentos inoculado e não inoculado dentro do mesmo clone. Além disso, genes que codificam proteínas de resistência tiveram expressão maior no clone 14 do que no clone 22 antes mesmo da infecção por *M. paranaensis*. Estes resultados podem sugerir que o clone 14 já possui um *background* para resistência, ou seja, que suas células já estão preparadas para a entrada do patógeno antes mesmo de seu contato com a planta, o que permitiria um reconhecimento e reação de resposta mais rápidos.

A maioria dos genes de resistência descritos em plantas codifica proteínas que contém um sítio de ligação de nucleotídeo (NBS) e um domínio rico em repetições de leucina (LRR), e pertencem portanto a família de proteínas conhecida como NBS-LRR (Van der Biezen & Jones, 1998; Lukasik & Takken, 2009). O domínio LRR parece estar envolvido na especificidade de reconhecimento e resistência durante a interação planta-patógeno (Ellis *et*

al., 1999). O domínio NBS possui homologia com regiões de produtos de genes relacionados com a imunidade inata e apoptose em animais (Aravind *et al.*, 1999); é também encontrado em famílias de proteínas como ATPases e proteínas G, responsáveis por transporte intracelular, morte celular programada e defesa contra patógenos (Van Der Biezen & Jones, 1998).

Em plantas de clone 14 controle, parte dos genes que expressaram mais no clone resistente que no suscetível codifica proteínas portadoras do domínio NBS-LRR. Análise anterior *in silico* de sequências geradas no projeto Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006) identificou mais de 14.000 sequências relacionadas à defesa da planta contra patógenos em geral, e entre essas sequências se encontram proteínas NBS-LRR, quitinases, quinases e citocromo P450 (Alvarenga, 2007; Alvarenga *et al.*, 2009). Há exemplos de genes de resistência contra nematoides que codificam proteínas portadoras do domínio NBS-LRR, como o gene *Mi* de tomateiro, que atua contra espécies de *Meloidogyne* (Hwang & Williamson, 2003), e *Gro-1-4* de batata, efetivo contra patótipo de *Globodera rostochiensis* (Paal *et al.*, 2004).

Os genes que se expressaram no clone 14 mais do que no 22 antes do contato com o patógeno tiveram valor de QC menor que o seu valor de expressão após a inoculação (Q ou FI), exceto para genes 00010974001 e 00037300001 (CC-NBS-LRR e *no hit*, respectivamente), cuja expressão foi menor após a infecção. Todavia, a expressão desses genes antes da infecção foi menor do que a dos genes que expressaram somente após o contato com o patógeno (FI e Q). Esse resultado sugere que o aumento da expressão dos genes no clone 14 inoculado em relação ao clone 22 e ao clone 14 controle, pode ser devida à entrada do nematoide na raiz do cafeeiro.

Um dado interessante é demonstrado pela figura 4.4, a qual mostra uma queda geral na expressão dos genes no clone 14 inoculado aos 8DAI e no clone 22 inoculado aos 20DAI. De

acordo com a histopatologia, no clone resistente, aos 8DAI foi observada a primeira RH nas células ao redor do nematoide. No clone 22, o DAI em que ocorreu queda da expressão corresponde ao período de formação das células gigantes e desenvolvimento do nematoide (Capítulo 3). Nos 12 DAI para o clone 14 e 32 DAI para o clone 22, os níveis de expressão voltaram a subir. Mesmo levando-se em conta que o intervalo de tempo no qual se observa este aumento no clone 22 (12 dias) foi maior que no clone 14 (quatro dias), o clone suscetível, quando inoculados com *M. paranaensis*, parece responder mais tardiamente a essa mudança de expressão do que o clone resistente nas mesmas condições.

Uma hipótese para a queda de expressão observada em tempos diferentes nos distintos clones é a de que *M. paranaensis* causa fortes danos radiculares no cafeeiro suscetível, com pontos de necrose evidentes, enquanto no clone 14 essa resposta parece ser consequência de morte celular localizada. Este dano celular controlado, observado por meio da histopatologia, ocorreu em poucas células próximas ao patógeno, e não se estendeu às células adjacentes, e o sistema radicular do clone 14 não apresentou nenhum sinal de dano na presença de *M. paranaensis*. A queda de expressão como resultado de morte celular pode ser também uma tentativa de reação tardia do clone 22 ao nematoide, porém sem sucesso. Portanto, o clone 14 pode ser mais eficiente do que o clone 22 na contenção de *M. paranaensis*, devido à presença de moléculas relacionadas à defesa antes do contato com o patógeno e também à velocidade da resposta de defesa.

Entre os genes que tiveram expressão maior no clone 14 em relação ao clone 22 após infecção por *M. paranaensis* se destacam, além de genes que codificam proteínas de resistência, outros relacionados à morte celular e ao metabolismo de fenólicos e lignificação. Como exemplo, têm-se os genes que codificam cisteína proteases, a cinamil álcool desidrogenase (síntese de fenólicos), a proteína “*Lignin-forming*”, a quitinase e o citocromo P450. Estes obtiveram valor de expressão maior no clone 14 em relação ao 22. Parte desses

genes se destacou também quanto à maior expressão no clone 14 inoculado do que no 14 controle.

As diferenças de expressão para mais como resultado da inoculação, ou entre os clones resistente e suscetível, podem sugerir um maior potencial para resistência presente no clone 14. No presente trabalho, o foco foi nos genes cuja expressão foi maior no clone 14 inoculado e naqueles cuja expressão aumentou com a infecção por *M. paranaensis*. No entanto, genes cuja expressão foi menor no clone 14 podem ser igualmente importantes no processo de resistência a *Meloidogyne* e outros fitopatógenos. Ao analisar globalmente os genes que tiveram expressão diferencial (Q) entre os clones 14 e 22 (Figura 4.14A), nota-se também que há uma separação temporal entre a expressão dos genes de resistência e os que codificam proteínas que atuam no processo de defesa.

Conforme citado no Capítulo 1, lignina e outros compostos fenólicos são importantes para a defesa bioquímica e também estrutural contra patógenos (Barber & Mitchell, 1997; Benhamou & Nicole, 1999). Da mesma forma, a cinamil álcool desidrogenase também está envolvida em lignificação e resposta a patógenos (Kiedrowski *et al.*, 1992). O acúmulo de compostos fenólicos nas raízes do clone 14 já foi observado e discutido no Capítulo 3 como parte da RH, e a presença e acumulação desses compostos em plantas resistentes é um processo comumente observado em ensaios histopatológicos. Em (Mazzafera *et al.*, 1989), no entanto, não houve diferença de concentração de fenóis entre as plantas inoculadas ou não inoculadas com *M. incognita* em ambos os genótipos, resistente (*C. canephora* Apoatã) e suscetível (*C. arabica* Mundo Novo), sendo que o conteúdo de fenóis foi maior no genótipo suscetível, ainda que a atividade da peroxidase e polifenoloxidase tenham sido maiores no genótipo resistente. O acúmulo de compostos fenólicos ao redor do nematoide pode não acontecer no processo de contenção/eliminação do patógeno, e a planta resistente pode apresentar apenas morte das células gigantes (Das *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2014).

As cisteína proteases pertencem a um grande grupo de proteínas envolvidas na morte celular programada, desenvolvimento de tecidos, eliminação de tecidos e órgãos da planta, resposta a patógenos e pragas, etc. (Greenberg, 1996; 1997; Pennell & Lamb, 1997; Chichkova *et al.*, 2004; Lepelley *et al.*, 2012). Estão incluídas nesse grupo de proteases as caspases, papaínas e catepsinas. As caspases são cisteínas dependentes de aspartato essenciais na morte celular programada. Extratos de frutas contendo cisteína proteases provocaram danos na cutícula e diminuição da atividade de juvenis de *Meloidogyne* spp. e em *Globodera* spp. (Stepek *et al.*, 2007).

No entanto, cisteína proteases também fazem parte do metabolismo de fitonematoides, atuando em processos digestórios, e de nematoides parasitas de animais, onde possuem atividade imunogênica. Em ambos os grupos, são importantes componentes do processo de patogenicidade (Koiwa *et al.*, 1997; Lilley *et al.*, 1999; Sajid & McKerrow, 2002, Shingles *et al.*, 2007), necessárias tanto para o seu desenvolvimento quanto para reprodução (Koiwa *et al.*, 1997). A atividade de cisteína proteases foi detectada em *Globodera pallida* (Atkinson *et al.*, 1996; Urwin *et al.*, 2001); *H. glycines*, através do gene *HgCP-1* (Urwin *et al.*, 2002); *M. incognita*, através do gene *Mi-Cpl-1* (Shingles *et al.*, 2007; Neveu *et al.*, 2003); *M. hapla* e *M. javanica* (Atkinson *et al.*, 2003).

Em plantas, a hidrólise de proteínas via cisteína protease é mediada por inibidores de cisteína protease que estão acumulados nos tecidos da planta, em resposta a ferimentos e/ou herbivoria (Urwin *et al.*, 2003; Fuller, 2008). Essas proteínas fazem parte da defesa enzimática das plantas (Ryan, 1990; Xavier-Filho, 1992; Solomon *et al.*, 1999), formando um complexo com as proteases e inibindo assim sua atividade. São proteínas importantes no processo de defesa da planta, conferindo resistência natural, além de serem excelentes candidatos para a construção de defesa das mesmas, uma vez que são ativas contra nematoides e outros patógenos (Haq *et al.*, 2004; Shingles *et al.*, 2007; Rabovich *et al.*, 2009).

No que se refere aos fitonematoides, os inibidores de protease afetam o seu desenvolvimento e reprodução (Urwin *et al.*, 1997, 1998, 2000, 2003; Atkison *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a expressão dos genes do cafeeiro *C. canephora* Conilon para cisteína protease foi diferencial entre os clones 14 e 22, chegando a ser mais de 3.000 vezes expresso no clone resistente em relação ao suscetível. Esse resultado está de acordo com a histopatologia das raízes, onde, principalmente nos dias que correspondem ao final do ciclo do nematoide na raiz, ocorreu degradação e morte celular das células gigantes que compunham o sítio de alimentação e intensa RH. Estudos sobre cisteína proteases indicam um papel chave dessas proteínas na defesa das plantas, contrabalanceado pela ação de inibidores das proteases (Van der Hoorn & Jones, 2004).

De fato, a atividade das cisteína proteases na morte celular e RH necessita da regulação via inibidores de cisteína proteases, o que poderia evitar que os danos no tecido infectado pelo patógeno se estendessem para tecidos saudáveis, comprometendo as funções radiculares. Cisteína proteases e inibidores de cisteína proteases podem estar trabalhando em conjunto tanto na defesa inicial, funcionando como barreira à migração de *M. paranaensis*, quanto nos dias finais, evitando o amadurecimento e reprodução do nematoide. Em resumo, a cisteína protease e o inibidor desta enzima parecem constituir importantes proteínas que atuam na resistência contra *M. paranaensis*.

Nos testes de qPCR, observou-se pico de expressão do inibidor de cisteína protease aos 45 DAI no clone 14, e os perfis de expressão estão de acordo com o observado na histopatologia, onde a morte celular programada e RH nas células próximas ao nematoide ocorreram nos dias iniciais e finais do ciclo de infecção (capítulo 3). No entanto, ao observar a expressão deste gene por ambas as ferramentas, qPCR e ensaio *in silico*, os valores de Q e FI deste gene obtidos pelo sequenciamento foram muito baixos e não diferenciais, como mostrado na qPCR. Esse resultado pode demonstrar que o mecanismo de resistência do clone

14 pode envolver mais a participação da cisteína protease como proteína, que leva a morte celular programada, do que o seu inibidor, que pode atuar nas proteases do nematoide. Em resumo, ao analisar a participação das cisteína proteases e inibidores de cisteína protease, o bloqueio do ciclo do patógeno parece ocorrer de forma indireta, ou seja, a degeneração do seu sítio de alimentação.

Observou-se, ainda, o papel do *no hit*, gene cuja função é desconhecida, e os genes do cromossomo 0. Ambos apresentaram expressão diferencial considerável entre os clones 14 e 22, portanto, devem ser posteriormente estudados em maior profundidade. Observações anteriores mostraram que alguns *no hits* se expressaram diferencialmente em clones de *C. canephora* tolerantes e sensíveis a seca (Vieira *et al.*, 2012). Na qPCR, o *no hit* 11524 não mostrou expressão no clone 22, e esta diferença pode ter acontecido por duas razões: 1) não houve realmente expressão desse gene, ou 2) ele não está presente no clone suscetível. Mais estudos se fazem necessários a fim de averiguar a importância e função deste *no hit*.

Devido às diferentes condições de processamento dos dados relativos à expressão, podem ocorrer diferenças entre os ensaios *in silico* e por qPCR. O sequenciamento de nova geração apresenta os resultados putativos do que poderia ocorrer *in vivo*, enquanto a PCR em tempo real demonstra o que está ocorrendo em uma situação mais próxima da que ocorre naturalmente. Em ensaios futuros, se fará necessário validar por qPCR esses genes e outros que tiveram alta expressão.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que alguns genes de resistência tiveram expressão anterior à entrada do patógeno, e as diferenças de expressão entre o clone 14 inoculado e o não inoculado e entre o 14 e clone 22 podem indicar a presença de uma resistência constitutiva, que permitiria uma reação mais rápida e eficaz contra o nematoide. Os genes candidatos cuja expressão é posterior à infecção por *M. paranaensis* foram aqueles de resistência a doenças (GSCOCT33153001 e GSCOCT25510001), os quais codificam

cisteína protease, proteína que atua na produção de lignina, e do citocromo P450, além de genes que precisam ser mais estudados, dada sua função desconhecida (*no hits*). Estas informações não permitem descartar o papel dos genes que expressaram anteriormente à infecção, mas cuja expressão foi menor.

4.6. Conclusões

Genes codificadores de proteínas de resistência com domínio rico em leucina (LRR), cisteína proteases, proteínas envolvida na síntese de lignina e proteínas de função desconhecida foram candidatos nos estudos de resistência do clone 14 a *M. paranaensis*. A alta expressão desses genes no clone 14 resistente em relação ao clone 22 suscetível a *M. paranaensis*, bem como a expressão diferencial (qPCR) de inibidores de protease, corrobora os resultados observados através da histopatologia do clone resistente. As citadas proteínas atuam na morte celular programada e RH, observadas tanto nos dias iniciais do parasitismo como também na fase final do ciclo do nematoide.

4.7. Perspectivas Futuras

Por meio dos resultados obtidos no presente trabalho espera-se, em ensaios próximos, validar os genes selecionados, bem como outros das listas Q e FI, por meio de qPCR, buscar conexões entre a resistência ao estresse biótico (infecção por *Meloidogyne*) e o estresse abiótico (tolerância a seca) e por fim estudar as interações proteína-proteína que possam estar ocorrendo na planta resistente, dentre muitas outras linhas de pesquisa com o objetivo de obter maior conhecimento sobre a resistência do cafeeiro a espécies de *Meloidogyne*.

REFERÊNCIAS

- Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4:217-224.
- Agrios GN (1997) *Plant Pathology*. 4^a ed. Londres, UK. Academic Press.
- Aguiar ATE, Fazuoli LC, Salva TJG, Favarin JL (2005) Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. *Bragantia* 64:577-582.
- Ahlfors R, Brosché M, Kollist H, Kangasjärvi J (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 58:1-12.
- Albuquerque EVS, Carneiro RMDG, Costa PM, Gomes ACMM, Santos M, Pereira AV, Nicole M, Fernandez D, Grossi de Sá MF (2010) Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology* 127:365-373.
- Albuquerque EV, Silva MS, Teixeira CDC, Campos MDA, Sá MFGD, Silva FRD (2007). Análise *in silico* dos ESTs isolados de *Coffea arabica* infestada com *Meloidogyne paranaensis*. In: 5^o Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Águas de Lindóia, BR. Embrapa-Café.
- Alekcevetch JC, De Araújo Carneiro F, Da Silva Rêgo EC, Guerra AF, Bartholo GF, Ferrão MAG, Fonseca AFA, Marraccini P, Andrade AC (2013) Estudo da diversidade genética de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon por meio de marcadores moleculares do tipo SSR. In: 8^o Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Salvador, BR. Embrapa-Café.
- Alvarenga SM (2007) Caracterização de seqüências expressas do genoma café potencialmente relacionadas com a resistência a doenças. Tese de Doutorado, Universidade Federal de

Viçosa, Viçosa, BR.

- Alvarenga SM, Caixeta ET, Zambolim EM, Zambolim L, Sakiyama NS (2009) Categorização funcional de sequências expressas envolvidas na defesa do cafeeiro a doenças. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Embrapa-Café.
- Alves Filho JP (2002) Uso de Agrotóxicos no Brasil: Controle Social e Interesses Corporativos. São Paulo, Brasil. Annablume.
- Anthony F, Topart P, Astorga C, Anzueto F, Bertrand B (2003) La resistencia genética de *Coffea* spp. a *Meloidogyne paranaensis*: identificación y utilización para la caficultura latinoamericana. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 67:5-12.
- Anthony F, Topart P, Martinez A, Silva M, Nicole M (2005) Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. Plant Pathology 54:476-482.
- Anwar SA, McKenry MV (2000) Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistance *Vitis* spp. Nematologica 30:9-17.
- Anwar SA, Trudgill DL, Phillips MS (1994) The contribution of variation in invasion and development rates of *Meloidogyne incognita* to host status differences. Nematologica 40:579-586.
- Anzueto F, Bertrand B, Peña M, Marban-Mendoza N, Villain L (1996) Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de America Central. In: 17º Simposio sobre Caficultura Latino-Americana, Memoria... San Salvador, SV. IICA-PROMECAFÉ.
- Anzueto F, Bertrand B, Sarah JL, Eskes AB, Decazy B (2001) Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. Euphytica 118:1-8.
- Anzueto F, Eskes AB, Sarah JL, Decazy B (1991) Recherche de la résistance à *Meloidogyne* sp. dans une collection de *Coffea arabica*. In: 14th International Scientific Colloquium

- on Coffee, Proceedings... San Francisco, US. ASIC. pp. 534-543.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Arango LG, Baeza CA, Leguizamón JE (1982) Pruebas de resistencia a especies de *Meloidogyne* en plántulas de *Coffea* spp. In: 10th International Scientific Colloquium on Coffee, Proceedings... Salvador, BR. ASIC. pp. 563-568.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences* 24:47-53.
- Atkinson HJ, Urwin PE, McPherson MJ (2003) Engineering plants for nematode resistance. *Annual Review of Phytopathology* 41:615-639.
- Bajaj KL, Mahajan R (1977) Phenolic compounds in tomato susceptible and resistant to *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood. *Nematologia Mediterranea* 5:329-333.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276:726-733.
- Barber MS, Mitchell HJ (1997) Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review of Cytology* 172:243-293.
- Barbosa DHSG, Vieira HD, Souza RM, Viana AP, Silva CP (2004a) Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira* 28:49-54.
- Barbosa DHSG, Vieira HD, Souza RM, Silva CP (2004b) Survey of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in coffee plantations in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Nematologia Brasileira* 28:43-47.
- Barros AF, Oliveira RDL, Zambolim L, Ferreira AO, Coutinho RR (2011) *Meloidogyne paranaensis* attacking coffee trees in Espírito Santo State, Brazil. *Australasian Plant*

Disease Notes 6:43-45.

Barros FC, Sagata E, De Castro Ferreira LC, Juliatti FC (2010) Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. *Bioscience Journal* 26:231-239.

Bateman DF (1978) The dynamic nature of disease. In: Horsfall JG, Cowling EB (Eds.) *Plant Disease – An Advanced Treatise, Volume 3: How Plants Suffer From Disease*. Nova York, US. Academic Press. pp. 53-83.

Benhamou N, Nicole M (1999) Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:703-719.

Berthaud J (1986) Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Paris, FR. ORSTOM.

Bertrand B, Aguilar G, Bompard E, Rafin A, Anthony F (1997) Comportement agronomique et résistance aux principaux déprédateurs des lignées de Sarchimor et Catimor au Costa Rica. *Plantations, Recherche, Développement* 4:312-321.

Bertrand B, Aguilar G, Santacreo R, Anzueto F (1999) El mejoramiento genético en América Central. In: Bertrand B, Rapidel B (Eds.) *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*. San José, CR. Agroamerica. pp. 407-456.

Bertrand B, Anthony F (2008) Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza RM (Ed.) *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Dordrecht, NL. Springer Science+Business. pp.165-190.

Bertrand B, Anthony F, Lashermes P (2001) Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *C. canephora*. *Plant Pathology* 50:637-643.

Bertrand B, Anzueto F, Peña M, Anthony F, Eskes AB (1995) Genetic improvement of coffee

- for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) in Central America. In: 16th International Scientific Colloquium on *Coffee*, Proceedings... Paris, FR. ASIC. pp. 630-636.
- Bertrand B, Guyot B, Anthony F, Lashermes P (2003) Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theoretical and Applied Genetics* 107:387-394.
- Bertrand B, Nuñez C, Sarah JL (2000a) Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 49:383-388.
- Bertrand B, Peña-Duran MX, Anzueto F, Cilas C, Etienne H, Anthony F, Eskes A (2000b) Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp. nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. *Euphytica* 113:79-86.
- Bertrand B, Ramirez G, Topart P, Anthony F (2002) Resistance of cultivated coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) trees to corky-root caused by *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*, under controlled and field conditions. *Crop Protection* 21:713-719.
- Bettencourt AJ, Carvalho A (1968) Melhoramento visando a resistência do cafeeiro à ferrugem. *Bragantia* 27:35-68.
- Blum LEB (2002) *Doenças de Plantas: Conceitos Básicos*. Florianópolis, BR. UDESC.
- Boisseau M, Aribi J, Sousa FR, Carneiro RMDG, Anthony F (2009) Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 34:38-41.
- Bolwell GP (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 2:287-294.
- Bowler C, Fluhr R (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5:241-246.

- Byrd JR. DW, Kirkpatrick J, Barker KR (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142-143.
- Cabos RYM, Sipes BS, Nagai C, Serracin M, Schmitt DP (2010) Evaluation of coffee genotypes for root-knot nematode resistance. *Nematropica* 40:191-202.
- Cabrera Poch HL, Manzanilla López RH, Kanyuka K (2006) Functionality of resistance gene *Hero*, which controls plant root-infecting potato cyst nematodes, in leaves of tomato. *Plant, Cell & Environment* 29:1372-1378.
- Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, Engler JA, Abad P, Rosso MN, Favery B (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104-113.
- Caixeta ET, Oliveira ACB, Zambolim EM, Diniz LEC (2003) Avanços tecnológicos em biologia molecular: projeto genoma no melhoramento de plantas. In: Zambolim L. (Ed.) *Produção Integrada de Café – Volume 1*. 1ª ed. Viçosa, BR. UFV. pp. 223-246.
- Calderón-Vega M (1989) Reacción de diferentes genotipos de café a *Meloidogyne arabicida* López y Salazar (1989), gama de hospedantes y hongos fitopatógenos asociados. *Boletín de Promecafé* 13:1-3.
- Campos V, Villain L (2005) Nematode parasites of Coffee and Cocoa. In: Luc M, Skora RA, Bridge J (Eds.) *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. 2ª ed. Egham, UK. CABI. pp. 529-580.
- Carneiro RG (1995) Reação de progênies de café Icatu a *Meloidogyne incognita* raça 2, em condições de campo. *Nematologia Brasileira* 19:53-59.
- Carneiro RMDG, Almeida MRA, Gomes ACMM, Hernández A (2005a) *Meloidodgyne izalcoensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising coffee in El Salvador. *Nematology* 7:819-832.
- Carneiro RMDG, Randig O, Almeida MRA, Gonçalves W (2005b) Identificação e

- Caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através do fenótipos das esterases e Scar-PCR-Multiplex. *Nematologia Brasileira* 29:33-241.
- Carneiro RMDG, Almeida RMA (2001) Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25:35-44.
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO, Santos MSN, Almeida SA (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28:177-189.
- Carneiro RMDG, Cofcewicz ET (2008) Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza RM (Ed.) *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Dordrecht, NL. Springer Science+Business. pp.87-121.
- Carneiro RMDG, Jorge CL (2001) Seletividade fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne paranaensis* quando multiplicadas durante sucessivas gerações em tomateiros e cafeeiros. In: 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil Anais... Brasília, BR. pp. 82-83.
- Carneiro RMDG, Mesquita LFG, Gonçalves W, Pereira AA (2008) Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from Brazil and Central America on two genotypes of *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 33:309-312.
- Carneiro RMDG, Tigano MS, Randing O, Almeida MRA, Sarah JL (2004) Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6:287-298.
- Carvalho A (1946) Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero *Coffea* com referência especial à espécie Arabica. *Boletim da Superintendência dos Serviços do Café* 21:174-180.

- Carvalho A, Fazuoli LC, Mazzafera P (1988) Melhoramento do cafeeiro: produtividade de progênies derivadas da hibridação do cultivares Laurina e Mundo Novo. *Bragantia* 47:213-222.
- Carvalho A, Medina Filho HP, Fazuoli LC, Guerreiro Filho O, Lima MMA (1991) Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética* 14:135-183.
- Castagnone-Sereno P (2006) Genetic variability and adaptative evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96:282-289.
- Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Dalmaso A (1992) Differential expression of root-knot nematode resistance genes in tomato and pepper: evidence with *Meloidogyne incognita* virulent and avirulent near-isogenic lineages. *Annals of Applied Biology* 120:487-492.
- Castro JMC, Campos VP, Pozza EA, Naves RL, Andrade Júnior WC, Dutra MR, Coimbra JL, Maximiniano C, Silva JRC (2008) Levantamento de fitonematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira* 32:56-64.
- Chalfoun SM, Reis PR (2010) História da cafeicultura no Brasil. In: Reis PR, Cunha RL (Eds.) *Café Arábica: do Plantio à Colheita, Volume 1*. Lavras, BR. EPAMIG. pp. 23-85.
- Chichkova N, Kim S, Titova E, Kalkum M, Morozov V, Rubtsov Y, Kalininia N, Taliansky M, Vartapetian A (2004) A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell* 16:157-171.
- CONAB (2014) Acompanhamento da safra brasileira de café – primeiro levantamento/2014. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br/Menu/noticias/Safracafe%202014%202814-15%29%20-%201%C2%BA%20Levantamento%20-%20JAN-14.pdf>. Acessado em 23 de abril de 2015.
- CONAB (2015) Acompanhamento da safra brasileira de café – primeiro levantamento/2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_14_11_

57_33_boletim_cafe_janeiro_2015.pdf. Acessado em 23 de abril de 2015.

- Contarato CC, Tomaz MA, Sobreira FM, Alves FR, Jesus Junior WC, Rodrigues AA, Ferrão MAG, Ferrão RG (2009) Resistência da variedade 'Vitória INCAPER 8142' de café conilon a *Meloidogyne exigua*. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Correa VF, Dos Santos MFA, Almeida MRA., Peixoto JR, Castagnone-Sereno P., Carneiro, RMDG (2013) Species-specific DNA markers for identification of two root-knot nematodes of coffee: *Meloidogyne arabicida* and *M. izalcoensis*. European Journal of Plant Pathology 137:305-313.
- Cubry P, De Bellis F, Pot D, Musoli P, Leroy T (2013a) Global analysis of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (Rubiaceae) from the Guineo-Congolese region reveals impacts from climatic refuges and migration effects. Genetic Resources and Crop Evolution 60:483-501.
- Cubry P, Bellis F, Avia K, Bouchet S, Pot D, Dufour M, Legnate H, Leroy T (2013b) An initial assessment of linkage disequilibrium (LD) in coffee trees: LD patterns in groups of *Coffea canephora* Pierre using microsatellite analysis. BMC Genomics 14:1-15.
- Cubry P, Musoli P, Legnaté H, Pot D, De Bellis F, Poncet V, Anthony F, Dufour M, Leroy T (2008) Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. Genome 51:50-63.
- Curi SM, Carvalho A, Moraes FP, Monaco LC, Arruda HV (1970) Novas fontes de resistência genética de *Coffea* no controle de nematóide do cafeeiro, *Meloidogyne exigua*. Biológico 36:293-395.
- Curtis MD, Rae AL, Rusu AG, Harrison SJ, Manners JM (1997). A peroxidase gene promoter induced by phytopathogens and methyl jasmonate in transgenic plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 10:326-338.

- Da Mata JS, Sera T, Azevedo JA, Alteia MZ, Colombo LA, Sanches RS, Petek MR, Fadelli S (2000) Seleção para resistência ao nematóide *Meloidogyne paranaensis* EMN95001: IAPARLN 94066 de “Catuaí x Icatu” em área altamente infestada. In: 1º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Poços de Caldas, BR. pp. 515-518.
- Damatta FM Chaves ARM, Pinheiro HA, Ducatti C, Loureiro ME (2003) Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. *Plant Science* 164:111-117.
- Damatta FM, Ramalho JC (2006) Impact of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:55-81.
- Damatta FM, Silveira JSM, Ducatti C, Loureiro ME (2000) Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: 1º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Poços de Caldas, BR. pp. 907-910.
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Das S, Demanson DA, Ehlers JD, Close TJ, Roberts PA (2008) Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany* 59:1305-1313.
- De Gara L, De Pinto MC, Tommasi F (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 41:863-870.
- De Kochko A, Akaffou S, Andrade AC, Campa C, Cruzillat D, Guyot R, Hamon P, Ming R, Mueller LA, Poncet V, Tranchant-Dubreuil C, Hamon S, Jean-Claude K, Michel D (2010) Advances in *Coffea* Genomics. In: Delseny M, Kader JC (Eds.) *Advances in Botanical Research*, Volume 53. Londres, UK. Academic Press. pp. 23-63
- Denoëud F, Carretero-Paulet L, Dereeper A, Droc G, Guyot R, Pietrella M, Zheng C, Alberti A, Anthony F, Aprea G, Aury JM, Bento P, Bernard M, Bocs S, Campa C, Cenci A,

- Combes MC, Cruzillat D, Da Silva C, Daddiego L, De Bellis F, Dussert S, Garsmeur O, Gayraud T, Guignon V, Jahn K, Jamilloux V, Joët T, Labadie K, Lan T, Leclercq J, Lepelley M, Leroy T, Li LT, Librado P, Lopez L, Muñoz A, Noel B, Pallavicini A, Perrotta G, Poncet V, Pot D, Priyono, Rigoreau M, Rouard M, Rozas J, Tranchant-Dubreuil C, Vanburen R, Zhang Q, Andrade AC, Argout X, Bertrand B, Kochko A, Graziosi G, Henry RJ, Jayarama, Ming R, Nagai C, Rounsley S, Sankoff D, Giuliano G, Albert VA, Wincker P, Lashermes P (2014) The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science* 345:1181-1184.
- Diniz LEC, Sakiyama NS, Lashermes P, Caixeta ET, Oliveira ACB, Zambolim EM, Loureiro ME, Pereira AA, Zambolim L (2005) Analysis of AFLP markers associated to the *Mex-1* resistance locus in Icatu progenies. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:387-393.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A, Teh T, Wang CA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 103:8888-8893.
- Dropkin VH, Nelson PE (1960) The histopathology of root-knot nematode infections in soybeans. *Phytopathology* 50:442-447.
- Dussert S, Lashermes P, Anthony F, Montagnon C, Trouslot P, Combes MC, Berthaud J, Noirot N, Hamon S (1999) Le caféier, *Coffea canephora*. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (Eds.) *Diversité Génétique des Plantes Tropicales Cultivées*. Montpellier, FR. QUAE. pp. 175-194.
- Eisenback JD, Hunt DJ (2009) General morphology. In: Perry R, Moens M, Starr JL (Eds.)

- Root-Knot Nematodes*. Cambridge, UK. CABI. pp. 18-54.
- Ellis JG, Lawrence GJ, Luck JE, Dodds PN (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *The Plant Cell* 11:495-506.
- Eulgem T (2006) Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLoS Pathogens* 2:126.
- Fassio LH, Silva AES (2010) Importância econômica e social do café Conilon. In: Ferrão RG, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG, Muner LH (Eds.) *Café Conilon*. Vitória, BR. Incaper. pp. 37-49.
- Fazuoli LC (1986) Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Malavolta E (Ed.) *Cultura do Cafeeiro*. Piracicaba, BR. Associação para Pesquisa da Potassa e do Fosfato Brazil. pp. 87-113.
- Fazuoli LC, Guerreiro O, Silvarolla MB, Braghini MT, Bliska FMDM (2005) Avaliação de híbridos F1 de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho x *C. canephora* cv. Robusta DP (Arabusta). In: 4º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Londrina, BR.
- Fazuoli LC, Medina Filho HP, Gonçalves W, Guerreiro Filho O, Silvarolla MB, Zambolim L (2002) Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arabica obtidas no Instituto Agrônomo de Campinas. In: Zambolim L (Ed.) *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Viçosa, BR. UFV. pp. 163-216.
- Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon MC, Petitot AS, C Silva M, Guerra-Guimarães L, Argout X, Nicole M (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5:527-536.
- Ferrão MAG, Ferrão RG, Fonseca AFA, Filho ACV, Volpi PS (2010) Origem, dispersão geográfica, taxonomia e diversidade genética de *Coffea canephora*. In: Ferrão RG, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG, Muner LH (Eds.) *Café Conilon*. Vitória,

- BR. INCAPER. pp. 67-91.
- Ferrão MAG, Fonseca AFA, Barbosa WM, Ferrão RG (2005) Variabilidade genética em *Coffea canephora* com base em marcadores RAPD. In: 4º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Londrina, BR.
- Ferrão MAG, Fonseca AFAD, Ferrão RG, Verdin Filho AC, Volpi PS, Damatta FM, Guarçoni RC (2009) Comportamento de clones promissores de café conilon em condição de déficit hídrico e irrigação. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Ferrão RG, Fonseca AF, Silveira JSM, Ferrão MAG, Bragança SM (2000) EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o Estado do Espírito Santo. Revista Ceres 47:555-559.
- Ferraz CCB, Monteiro AR (1995) Nematoides. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos, Volume 1. 3º ed. São Paulo, BR. Agronômica Ceres. pp. 168-201.
- Ferraz S, Freitas LG (2008) O Controle de Fitonematóides por Plantas Antagonistas e Produtos Naturais. Viçosa, BR. UFV.
- Ferris H, Schneider SM, Stuth C (1982) Probability of penetration and infection by root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*, in grape cultivars. American Journal of Enology and Viticulture 33:31-35.
- Flor HH (1946) Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. Journal of Agricultural Research 73:335-357.
- Flor HH (1947) Inheritance of reaction to rust in flax. Journal of Agricultural Research 74:241-262.
- Flor HH (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. Advances in Genetics 8:29-54.

- Flor HH (1971) Current status of gene-a-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Fonseca AFA, Ferrão MAG, Ferrão RG, Verdin Filho AC, Volpi PS, Zucатели F (2004a) Conilon Vitória 'INCAPER 8142': Variedade Clonal de Café Conilon. Vitória, BR. INCAPER.
- Fonseca AFA, Ferrão MAG, Ferrão RG, Verdin Filho AC, Volpi PS, Zucатели F (2004b) Conilon Vitória-INCAPER 8142: improved *Coffea canephora* var. Kouillou clone cultivar for the State of Espírito Santo. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4:1-3.
- Freitas VM, Correa VR, Motta FC, Sousa MG, Gomes ACMM, Carneiro MDG, Silva DB, Mattos JK, Nicole M, Carneiro RMDG (2014) Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. *Plant Pathology* 63:738-746.
- Fuller VL, Lilley CJ, Atkinson HJ, Urwin PE (2007). Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* 8:595-609.
- Fuller VL, Lilley CJ, Urwin PE (2008) Nematode resistance. *New Phytologist* 180:27-44.
- Glombitza S, Dubuis PH, Thulke O, Welzl G, Bovet L, Götz M, Affenzeller M, Geist B, Hehn A, Asnaghi C, Ernst D, Seidlitz HK, Gundlach H, Mayer KF, Martinoia E, Werck-Reichhart D, Mauch F, Schäffner AR (2004) Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Molecular Biology* 54:817-835.
- Goeldi EA (1892) Relatório sobre a molestia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. *Archivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 8:7-123.
- Gonçalves W, Fazuoli LC, Lima MMA, Silvarolla MB, Favoreto AJ, Motta Filho C,

- Guerreiro G (1998) Café IAC 4160 promissora fonte de resistência a *Meloidogyne paranaensis*. In: 21º Congresso Brasileiro de Nematologia, Anais... Maringá, BR. UEM/SBN. p.53.
- Gonçalves W, Ferraz LCCB (1987) Resistência do cafeeiro a nematoides. II. Testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. Nematologia Brasileira 11:123-142.
- Gonçalves W, Ferraz LCCB, Lima MMA, Silvarolla MB (1996a) Reações de cafeeiros às raças 1, 2 e 3 de *Meloidogyne incognita*. Summa Phytopathologica 22:172-177.
- Gonçalves W, Ferraz LCCB, Lima MMA, Silvarolla MB (1996b) Patogenicidade de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* raça 1 a mudas de cafeeiro. Bragantia 55:89-93.
- Gonçalves W, Pereira A (1998) Resistência do cafeeiro a nematoides: IV Reação de cafeeiros derivados do Híbrido do Timor a *Meloidogyne exigua*. Nematologia Brasileira 22:39-50.
- Gonçalves W, Ramiro DA, Gallo PB, Giomo GS (2004) Manejo de nematóides na cultura do cafeeiro. In: 10ª Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Café, Anais... Mococa, BR. Instituto Biológico. pp. 48-66.
- Gonçalves W, Silvarolla MB (2001) Nematoides parasitas do cafeeiro. In: Zambolim L (Ed.) Tecnologias de Produção de Café com Qualidade. Viçosa, BR. UFV. pp. 199-267.
- Gonçalves W, Silvarolla MB, Guerreiro-Filho O, Fazuoli LC, Medina-Filho HP (2000) Nematóides parasitas (*Meloidogyne* spp.) do cafeeiro: manejo genético e químico no Brasil. In: Anthony F, Rodríguez E (Eds.) Mejoramiento Sostenible del Café Arabica por los Recursos Genéticos, Asistido por los Marcadores Moleculares, con Énfasis en la Resistencia a los Nematodos. Turrialba, CR. CATIE-IRD. pp. 49-54.
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium

- that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 23: 441-450.
- Greco, N., & Di Vito, M. (2009). 11 Population Dynamics and Damage Levels. *Root-knot nematodes*, 246.
- Greenberg JT (1996) Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 93:12094-12097.
- Greenberg JT (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:525-545.
- Grundler FMW (1996) Engineering resistance against plant-parasitic nematodes. *Field Crops Research* 45:99-109.
- Gutierrez OA, Wubben MJ, Howard M, Roberts B, Hanlon E, Wilkinson JR (2009) The role of phytohormones ethylene and auxin in plant-nematode interactions. *Russian Journal of Plant Physiology* 56:1-5.
- Hague NGM, Gowen SR (1987) Chemical control of nematodes. In: Brown RH, Kerry BR (Eds.) *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Nova York, US. Academic Press. pp.131-178.
- Haq SK, Atif SM, Khan RH (2004) Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431:145-159.
- Hartman KM, Sasser JN (1985) Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Carter CC, Sasser JN (Eds.) *An Advanced Treatise on Meloidogyne, Volume 2: Methodology*. Raleigh, US. Department of Plant Pathology, North Carolina State University. pp. 69-77.
- Hendre PS, Phanindranath R, Annapurna V, Lalremruata A, Aggarwal RK (2008) Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea*

- canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. BMC Plant Biology 8:51.
- Hernandez A, Fargette M, Sarah JL (2004a) Characterization of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) from coffee plantations in Central America and Brazil. Nematology 6:193-204.
- Hernandez A, Fargette M, Sarah JL (2004b) Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) isolates from Central America and Brazil on four genotypes of *Coffea arabica*. Nematology 6:205-213.
- Humphreys-Pereira DA, Flores-Chaves L, Gómez M, Salazar L, Gómez-Alpízar L, Elling AA (2014) *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. Nematology 16:643-661.
- Hunt DJ, Handoo ZA (2009) Taxonomy, identification and principal species. In: Perry RN, Moens M, Starr JL (Eds.) Root-Knot Nematodes. Egham, UK. CABI. pp. 55-88.
- Hussey RS, Barker KR (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- Hussey RS, Boerma HR (1981) A greenhouse screening procedures for root knot nematode resistance in soybean. Crop Science 21:794-796.
- Huang CS, Maggenti AR (1969). Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. Phytopathology 59:447-455.
- Hwang CF, Williamson VM (2003) Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. The Plant Journal 34:585-593.

- IAPAR (2012) Café IPR 100 – cultivar de café arábica resistente ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. Disponível em: http://www.iapar.br/arquivos/File/Sementes_e_Mudas/folder_ipr100_13_09_12.pdf. Acessado em 14 de setembro de 2012.
- ICO (2013) Exporting countries: total production. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/po.htm>. Acessado em 21 de fevereiro de 2015.
- Illy A, Viani R (Eds.) (1995) Espresso Coffee: the Chemistry of Quality. London, UK. Academic Press.
- Inácio MC, Silva EDS, Souza MED, Ono EO, Rodrigues JD (2011) Mensageiros secundários relacionados à ação dos hormônios vegetais. *Current Agricultural Science and Technology* 17: 438-446.
- IBC (1986) Cultura de Café no Brasil – Pequeno Manual de Recomendações. 1ª ed. Rio de Janeiro, BR. DIPRO/IBC.
- Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6:153-158.
- Ito DS, Sera T, Santiago DC, Alegre CR, Kanayama FS, Ribeiro Filho C, Del Grossi L, Shigueoka LH, Rocha VPC, Sera GH (2009) Tecnologia “kit de resistência aos nematóides” para viabilização de áreas infestadas para o cultivo de café. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48:692.
- Jones JDG (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology* 4:281-287.
- Juliatti FC, Silva AS, Juliatti FC (2001) Problemas fitossanitários em culturas sob pivô central no triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. In: Zambolim L (Ed.) Manejo Integrado – Fitossanidade: Cultivo Protegido, Pivô Central e Plantio Direto. Viçosa, BR. UFV. pp.

205-256.

- Jupe F, Pritchard L, Etherington GJ, Mackenzie K, Cock PJA, Wright F, Sharma SK, Bolser D, Bryan GJ, Jones JDG, Hein I (2012) Identification and localisation of the *NB-LRR* gene family within the potato genome. *BMC Genomics* 13:75.
- Kanayama FS, Santiago DC, Alegre CR, Sera GH, Shigueoka LH, Ito DS, Sera T, Fernandez L (2009) Resposta das cultivares de café desenvolvidas pelo IAPAR aos nematoides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 1 e 2. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Keen NT (1990) Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24:447-463.
- Khallouk S, Voisin R, Van Ghelder C, Engler G, Amiri S, Esmenjaud D (2011) Histological mechanism of the resistance conferred by the *Ma* gene against *Meloidogyne incognita* in *Prunus* spp. *Nematology* 101:945-951.
- Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich IE, Dangl JL (1992) Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus. *The EMBO Journal* 11:4677-4684.
- Kobe B, Deisenhofer J (1995) Proteins with leucine-rich repeats. *Current Opinion in Structural Biology* 5:409-416.
- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM (1997) Regulation of protease inhibitors and plant defence. *Trends in Plant Science* 2:379-384.
- Krzyzanowski AA, Figueredo R, Santiago DC, Favoreto L (2001) Levantamento de espécies e raças de *Meloidogyne* em cafeeiros no Estado do Paraná. In: 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Resumos Expandidos... Vitória, BR. Embrapa.. pp. 1175-1181.
- Kuriyama H, Fukuda H (2002) Developmental programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5:568-573.

- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M (2001) Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* 75:223-230.
- Lam E, Fukuda H, Greenberg J (2000) Programmed Cell Death in Higher Plants. Dordrecht, NL. Springer Science+Business.
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215-224.
- Lashermes P, Andrade AC, Etienne H (2008) Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: Moore PH, Ming R (Eds.) *Genomics of Tropical Crop Plants*. Nova York, US. Springer. pp. 203-226.
- Lashermes P, Combes MC, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics* 261:259-266.
- Lebo Jr. SE, Gargulak JD, McNally TJ (2001) Lignin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.
- Lepelley M, Ben Amor M, Martineau N, Cheminade G, Caillet V, McCarthy J (2012) Coffee cysteine proteinases and related inhibitors with high expression during grain maturation and germination. *Plant Biology* 12:31.
- Leroy T, Bellis F, Legnate H, Kananura E, Gonzales G, Pereira LF, Andrade AC, Charmetant P, Montagnon C, Cubry P, Marraccini P, Pot D, Kochko A (2011) Improving the quality of African robustas: QTLs for yield- and quality-related traits in *Coffea canephora*. *Tree Genetics & Genomes* 7:781-798.
- Leroy T, Marraccini P, Dufour M, Montagnon C, Lashermes P, Sabau X, Ferreira LP,

- Jourdan I, Pot D, Andrade AC, Glaszmann JC, Vieira LGE, Piffanelli P (2005) Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theoretical and Applied Genetics* 111:1032-1041.
- Leroy T, Montagnon C, Charrier A, Eskes AB (1993) Reciprocal recurrent selection applied to *Coffea canephora* Pierre. I. Characterization and evaluation of breeding populations and value of intergroup hybrids. *Euphytica* 67:113-125.
- Leroy T, Ribeyre F, Bertrand B, Charmetant P, Dufour M, Montagnon C, Marraccini P, Pot D (2006) Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:229-242.
- Levine A, Pennel RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6:427-437.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Lilley CJ, Devlin P, Urwin PE, Atkinson HJ (1999) Parasitic nematode, proteinases and transgenic plants. *Parasitology Today* 15:414-417.
- Lima ALS, Damatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water stress. *Environmental and Experimental Botany* 47:239-247.
- Livramento DE (2010) Morfologia e fisiologia do cafeeiro. In: Reis PR, Cunha LR (Eds.) *Café Arábica – do Plantio à Colheita, Volume 1*. Lavras, BR. EPAMIG. pp. 87-161.
- Lo SCC, Nicholson RL (2008) Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: Pascholati SF, Leite B, Stangarlin JR, Cia P (Eds.) *Interação Planta-Patógeno*. Piracicaba, BR. FEALQ. pp. 285-303.
- Lopez-Lima D, Sánchez-Nava P, Carrion G, De Los Monteros AE, Villain L (2014) Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode

- Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. European Journal of Plant Pathology 141:623-629.
- Lordello AIL, Lordello RRA, Fazuoli LC (2001) Levantamento de espécies de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado de São Paulo. In: 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Resumos Expandidos. Vitória, BR. Embrapa. pp. 1182-1187.
- Lordello LGE (1986) Nematóides causadores de galhas (gênero *Meloidogyne*). In: Lordello LGE (Ed.) Nematóides das Plantas Cultivadas. 8ª ed. São Paulo, BR. Nobel. pp. 125-147.
- Lukasik E, Takken FLW (2009) STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. Current Opinion in Plant Biology 12:427-436.
- Malta MR, Silva EDB, Nogueira FD, Guimarães PTG, Silva FADM, Chagas SJDR (2001) Composição físico-química e qualidade do café (*Coffea arabica* L.) fertilizado com diferentes fontes e doses de potássio. In: 2º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Brasília, BR. pp. 2421-2430.
- Maluf MP (2008). Genomic tools for the development of engineered *Meloidogyne*-resistant coffee cultivars. In: Souza RM (Ed.) Plant-Parasitic Nematodes of Coffee. Dordrecht, NL. Springer Science+Business. pp. 191-205.
- Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. Annual Review of Genomics and Human Genetics 9:387-402.
- Marraccini P, Vinecky F, Alves GSC, Ramos HJO, Elbet S, Vieira NG, Carneiro FA, Sujii PS, Alekcevetch JCM, Silva VA, Damatta FM, Ferrão MAG, Leroy T, Pot D, Vieira LGE, Silva FR, Andrade AC (2012) Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. Journal of Experimental Botany 63:4191-4212.
- Matiello RR, Barbieri RL, Carvalho FIF (1997) Resistência das plantas a moléstias fúngicas.

- Ciência Rural 27:161-168.
- Mazzafera P, Gonçalves W, Fernandes JAR (1989) Fenóis, peroxidase e polifenoloxidase na resistência do cafeeiro a *Meloidogyne incognita*. *Bragantia* 48:131-142.
- McCarty DR, Chory J (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103:201-209.
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* 7:212.
- Medeiros RB, Ferreira MASV, Dianese JC (2003) Mecanismos de Agressão e Defesa nas Interações Planta-Patógeno. Brasília, BR. UnB.
- Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, Castagnone-Sereno P, Bleve-Zacheo T (2006) Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170:501-512.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell* 10:1307-1319.
- Mills D, Kunoh H, Keen NT, Mayama S (1996) Molecular Aspects of Pathogenicity and Resistance: Requirement for Signal Transduction. Saint Paul, US. APS.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9:490-498.
- Molinari S (1991) Induction of isoperoxidases in resistant and susceptible tomato cultivars by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 23:254-258.
- Mondego JMC, Vidal RO, Carazzolle MF (2011) An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea*

- canephora*. BMC Plant Biology 11:30.
- Montagnon C (2000) Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre. Tese de Doutorado, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, Montpellier, FR.
- Montagnon C, Leroy T, Yapo (1992) A Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers (*Coffea canephora* Pierre) en collection. Conséquences sur leur utilisation en sélection. Café, Cacao, Thé 36:187-198.
- Mota FC, Alves GCS, Giband M, Gomes ACMM, Sousa FR, Mattos VS, Barbosa VHS, Barroso PAV, Nicole M, Peixoto JR, Rocha MR, Carneiro RMDG (2013) New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. Plant Pathology 62:1173-1183.
- Moura RM, Regis EMO (1987) Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). Nematologia Brasileira 11:215-225.
- Muniz MF, Campos VP, Moita AW, Gonçalves W, Carneiro RMDG (2009) Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of a naturally virulent *M. exigua* population breaking resistance of *Mex-1* gene. Tropical Plant Pathology 34:370-378.
- Musoli P, Cubry P, Aluka P, Billot C, Dufour M, De Bellis F, Pot D, Bieysse D, Charrier A, Leroy T (2009) Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. Genome 52:634-646.
- Nelson RR (1978) Genetics of horizontal resistance to plant diseases. Annual Review of Phytopathology 16:359-378.
- Neveu C, Jaubert S, Abad P, Castagnone-Sereno P (2003) A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines

- encode secreted proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:1077-1084.
- Noir S, Anthony F, Bertrand B, Combes MC, Lashermes P (2003) Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52:97-103.
- Otoboni CEM, Santos JM (2008) Estimativa da perda de produção de cafeeiros atacados por *Meloidogyne* sp. In: 7º Congresso de Iniciação Científica, Anais... Ourinhos, BR. FIO.
- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menéndez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The Plant Journal* 38:285-297.
- Padilha L, Garcia ALA, Rabello Jr. CAM, Carvalho CHS (2009) Comportamento de cultivares de café na presença do *Meloidogyne exigua*. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BBH, Jones JD (1997) Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* 91:821-832.
- Pegard A, Brizzard G, Fazari A, Soucaze O, Abad P, Djian-Coporalino C (2005) Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Nematology* 95:158-165.
- Pennell RI, Lamb C (1997) Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9:1157-1168.
- Pereira TB, Salgado SML, Souza ZRD, Paiva BT, Abreu FA, Oliveira LPV (2009) Seleção de genótipos de cafeeiro para resistência à *Meloidogyne exigua*. In: 6º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Vitória, BR. Consórcio Pesquisa Café.
- Petitot AS, Lecouls AC, Fernandez D (2008) Sub-genomic origin and regulation patterns of a

- duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomes* 4:379-390.
- Proite K, Carneiro R, Falcão R, Gomes A, Leal-Bertioli S, Guimarães P, Bertioli D (2008) Post-infection development and histopathology of *M. arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology* 57:974-980.
- Quail MA, Kozarewa I, Smith F, Scally A, Stephens PJ, Durbin R, Swerdlow H, Turner DJ (2008) A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods*, 5:1005-1010.
- Rabovich C, Paul R, Sipes B (2009) Protease inhibitors and reproduction of reniform nematode in pineapple. *Annals of Applied Biology* 154:127-132.
- Ramiro D, Jalloul A, Petitot AS, De Sá MFG, Maluf MP, Fernandez D (2010) Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens. *Tree Genetics & Genomes* 6:767-781.
- Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45:862-870.
- Randig O, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno P (2004) Identificação das principais espécies de *Meloidogyne* para sitas do cafeeiro no Brasil com marcadores SCAR-café em multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 28:1-10.
- Renelt A, Colling C, Hahlbrook K, Nurnberger T, Parker JE, Sacks WR, Scheel D (1993) Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *Journal of Experimental Botany* 44:257-268.
- Resende MD, Barretti PB, Medeiros FD, Silva DD, Pereira RB, Lins SDO, Pereira LM, Campos MDA (2007) Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 15:173-242.

- Ribeiro RCF, Pereira AA, Oliveira CH, Lima RD (2005) Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira* 29:11-16.
- Roberts PA (1992) Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24:213-227.
- Roberts PA (2002) Concepts and consequences of resistance. In: Star JL, Cook R, Bridge J (Eds.) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford, UK. CABI. pp. 25-41.
- Roberts PA, Matthews WC, Veremis JC (1998) Genetic mechanisms of host plant resistance to nematodes. In: Barker KR, Pederson GA, Windham GL (Eds.) *Plant and Nematode Interactions*. Madison, US. American Society of Agronomy. pp. 209-238.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49:317-343.
- Rocha FS, Campos VP (2004) Effect of exudates of plant cell culture on second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira* 29:294-299.
- Rodrigues ACF, Abrantes IMDO, Melillo MT (2000) Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica* 30:201-210.
- Rodrigues Jr. CJ, Gonçalves MM, Várzea VMP (2004) Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias* 27:203-216.
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JD (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *The EMBO Journal* 20:5556-5567.
- Ronchi CP, Damatta FM (2010) Aspectos fisiológicos do café Conilon. In: Ferrão RG, Fonseca AFA, Bragança SM, Ferrão MAG, Muner LH (Eds.) *Café Conilon*. Vitória,

- BR. INCAPER. pp. 95-119.
- Rufino JLS (2006) Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Antecedentes, Criação e Evolução. 1ª ed. Brasília, BR. Embrapa Café.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819.
- Ryan CA (1990) Proteases inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28:425-449.
- Ryan CA (2000) The system in signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica Biophysica Acta* 1477:112-121.
- Sajid M, McKerrow JH (2002) Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120:1-21.
- Salgado PR (2009) Compostos fenólicos relacionados à resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) e à ferrugem (*Hemileia vastatrix*). Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, BR.
- Salgado SML, Rezende JC (2010) Manejo de fitonematoides em cafeeiro. In: Reis PR, Cunha RL (Eds.) *Café Arábica: do Plantio à Colheita*, Volume 1. Lavras, BR. EPAMIG. pp. 757-804.
- Santino A, Taurino M, De Domenico S, Bonsegna S, Poltronieri P, Pastor V, Flors V (2013) Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Reports* 32:1085-1098.
- Sasser JN, Carter CC, Hartman KM (1984) Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance to Root-Knot Nematodes. Raleigh, US. North Carolina State University.
- Schafer JT, Pereira EDS, Schiavon MV, Vizzotto M, Campos AD, Gomes CB (2014) Conteúdo de compostos fenólicos e teores de açúcares redutores e não redutores em

- tubérculos de batata infectados com diferentes níveis de *Meloidogyne javanica*. In: 16º Encontro de Pós-Graduação, Anais... Pelotas, BR. UFPel.
- Scheel D (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 1:305-310.
- Schifino-Wittmann MT, Dall'Agnol M (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural* 32:1083-1090.
- Schuster SC (2008) Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods* 5:16-18.
- Schluttenhofer C, Yuan L (2014) Regulation of specialized metabolism by WRKY transcription factors. *Plant Physiology* 167:295-306.
- Sera GH, Sera T, Azevedo JA, Da Mata JS, Ribeiro Filho C, Doi DS, Ito DS, Fonseca ICB (2006) Porta-enxerto de café robusta resistentes aos nematóides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raça 1 e 2. *Semina: Ciências Agrárias* 27:171-184.
- Sera T, Androcioli Filho A, Cardoso RML, Dias MCLL, Guerreiro E, Silva E, Sera T (1996) IAPAR 59: cultivar de café para plantio adensado. *Simpósio Internacional sobre Café Adensado, 1994, Anais... Londrina, BR. IAPAR. pp. 293-294.*
- Sera T, Da Mata JS, Sera GH, Doi DS, Ito DS, Azevedo JÁ, Ribeiro Filho C (2005) Identificação de porta-enxertos de café robusta resistentes aos nematóides *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* raças 2 e 1. In: 4º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Londrina, BR.
- Sera GH, Sera T, Mata JSD, Ito DS, Fonseca ICDB, Alegre CR, Azevedo JA, Ribeiro C (2007). Reação da cultivar de café Tupi IAC 1669-33 em diferentes níveis de inóculo do nematóide *Meloidogyne paranaensis*. In: 5º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Águas de Lindóia, BR. Embrapa-Café.
- Shigueoka LH, Sera T, Ito DS, Andreaz E, Rocha VPC, Carvalho FG, Gardiano CG, Da Mata

- JS (2011) Avaliação de linhagens de café arábica resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis* em Londrina, Paraná. In: 7º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Araxá, BR. Embrapa-Café.
- Shingles J, Lilley CJ, Atkinson HJ, Urwin PE (2007) *Meloidogyne incognita*: Molecular and biochemical characterization of a cathepsin L cysteine proteinase and the effect on parasitism following RNAi. *Experimental Parasitology* 115:114-120.
- Siddiqi MR (2000) *Tylenchida: Parasites of Plants and Insects*. 2ª ed. Wallingford, UK. CABI.
- Silva RV, Oliveira RD, Ferreira PS, Ferreira AO, Rodrigues FA (2013) Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. *Tropical Plant Pathology* 38:114-121.
- Silva RV, Oliveira RDL, Nascimento KJT, Rodrigues FA (2010) Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. *Plant Pathology* 59:586-593.
- Silva RV, Oliveira RDL, Pereira AA, Sêni DJ (2007) Resposta de genótipos de *Coffea* spp. a diferentes populações de *Meloidogyne exigua*. *Fitopatologia Brasileira* 32:205-212.
- Silva RV, Oliveira RDL, Zambolim L (2009) Primeiro relato da ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro no Estado de Goiás. *Nematologia Brasileira* 33:187-190.
- Silva VA, Antunes WC, Guimarães BLS, Paiva RMC, Silva VDF, Ferrão MAG, Damatta FM, Loureiro ME (2010) Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:457-464.
- Silvarolla MB, Gonçalves W, Lima MMA (1998) Resistência do cafeeiro a nematoides. V – Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira* 22:51-59.

- Silvestrini M, Maluf MP, Guerreiro-Filho O, Gonçalves W (2005) Expressão de genes de resistência em resposta à infecção por nematóides. In: 4º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Londrina, BR.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E, Levine A (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 11:431-443.
- Souza SE, Santos JM, Matos RV, Ramos JA, Santos FS, Ferraz RCN, Carvalho GS, Oliveira CA (2000) Levantamento preliminar de *Meloidogyne* em cafeeiros no estado da Bahia – planalto de Vitória da Conquista e Chapada Diamantina. In: 1º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Anais... Poços de Caldas, BR. pp. 167-170.
- Starr JL, Roberts PA (2004) Resistance to plant-parasitic nematodes. *Nematology* 2:879-907.
- Stepek G, Curtis RHC, Kerry BR, Shewry PR, Clark SJ, Lowe AE, Duce IR, Buttle DJ, Behnke JM (2007) Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology* 134:1831-1838.
- Taylor AL, Sasser JN (1978) *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne Species)*. Raleigh, US. Department of Plant Pathology, North Carolina State University.
- Tirumalaraju SV, Jain M, Gallo M (2011) Differential gene expression in roots of nematode-resistant and-susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *Journal of Plant Physiology* 168:481-492.
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378.
- Trudgill DL, Blok VC (2001) Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*,

39:53-77.

Truman W, Bennett MH, Kubisteltig I, Turnbull C, Grant M (2007) *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 104:1075-1080.

Urwin PE, Green J, Atkinson HJ (2003) Expression of a plant cystatin confers partial resistance to *Globodera*, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. Molecular Breeding 12:263-269.

Urwin PE, Lilley CJ, Atkinson HJ (2002) Ingestion of double-stranded RNA by preparasitic juvenile cyst nematode leads to RNA interference. Molecular Plant-Microbe Interaction 15:747-752.

Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, Atkinson HJ (1997) Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. Plant Journal 12:455-461.

Urwin PE, McPherson MJ, Atkinson HJ (1998) Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. Planta 204:472-479.

Urwin PE, Troth KM, Zubko EI, Atkinson HJ (2001) Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. Molecular Breeding 8:95-101.

Van Der Biezen EA, Jones JDG (1998) The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. Current Biology 8:226-227.

Van Der Hoorn RA, Jones JD (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. Current Opinion in Plant Biology 7:400-407.

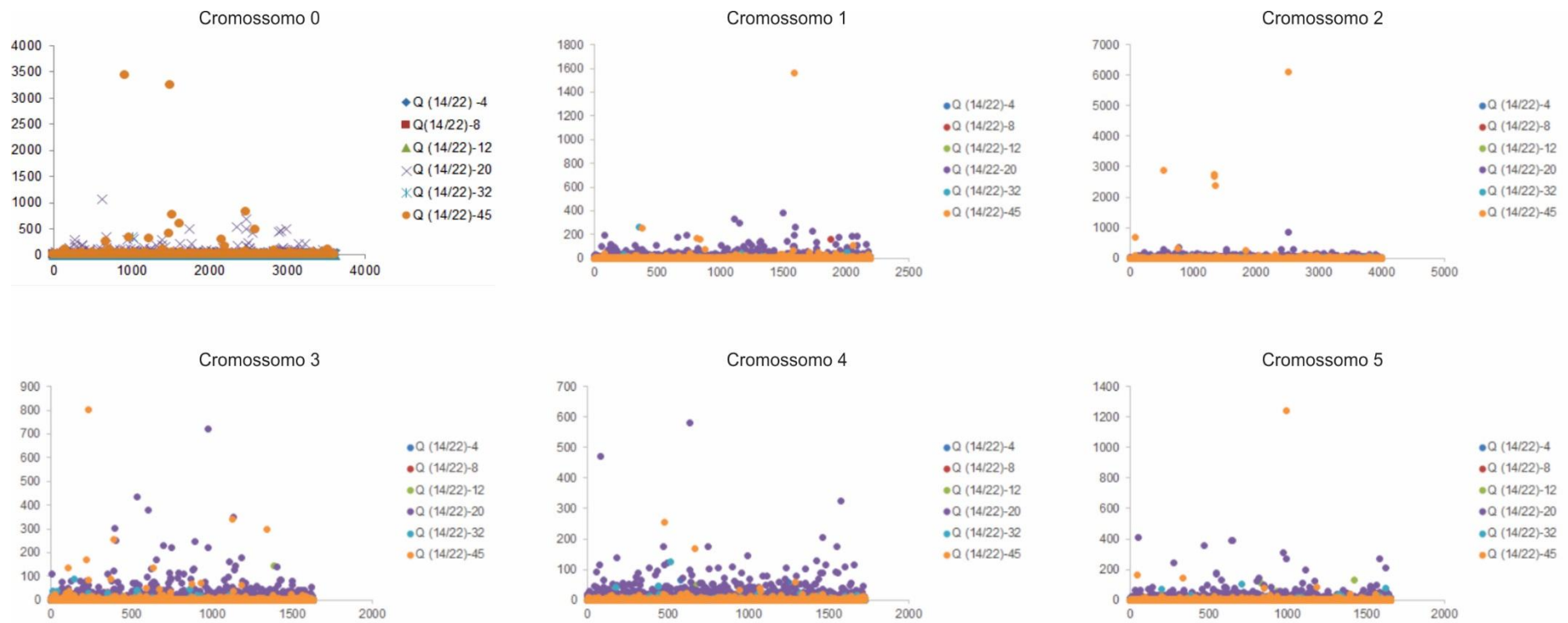
Van Der Hoorn RA, Roth R, De Wit PJGM (2001) Identification of distinct specificity determinants in resistance protein Cf-4 allows construction of a Cf-9 mutant that

- confers recognition of avirulence protein AVR4. *The Plant Cell* 13:273-285.
- Van Der Plank JE (1963) *Plant Diseases: Epidemics and Control*. Nova York, US. Academic Press.
- Van Der Plank JE (1975) Horizontal resistance: six suggested projects in relation to blast disease of rice. *Horizontal Resistance to Blast Disease of Rice, Seminar...* Cali, CO. CIAT. pp. 21-26.
- Van Der Plank JE (1982) *Host-Pathogen Interactions in Plant Disease*. Nova York, US. Academic Press.
- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes ANA, Metha A, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, Giglioti E, Kimura ET, Romano E, Kuramae EE, Lemos EGM, Almeida ERP, Jorge EC, Albuquerque EVS, Silva FR, Vinecky F, Sawazaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu IN, Batista JAN, Teixeira JB, Kitajima JP, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA, Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos, MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Grossi De Sá MF, Goldman MHS, Ferro MIT, TinocomLP, Oliveira MC, Van Sluys M, Shimizu MM, Maluf MP, Eira MTS, Guerreiro Filho O, Arruda P, Mazzafera P, Mariani PDSC, Oliveira RLBC, Harakava R, Balbao SF, Tsai SM, Di Mauro SMZ, Santos SN, Siquiera WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF, Pereira GAG (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18:95-108.
- Vieira NG. (2015) Identificação e caracterização de genes órfãos (“no hits”) de café (*Coffea* spp.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, BR.
- Villain L, Anzueto F, Sarah JL (2004) Resistance to root-lesion nematodes on *Coffea canephora*. *Nematology* 4:157-158.
- Villain L, Baullard P, Anzueto F, Hernandez A, Sarah JL (2002) Integrated protection of

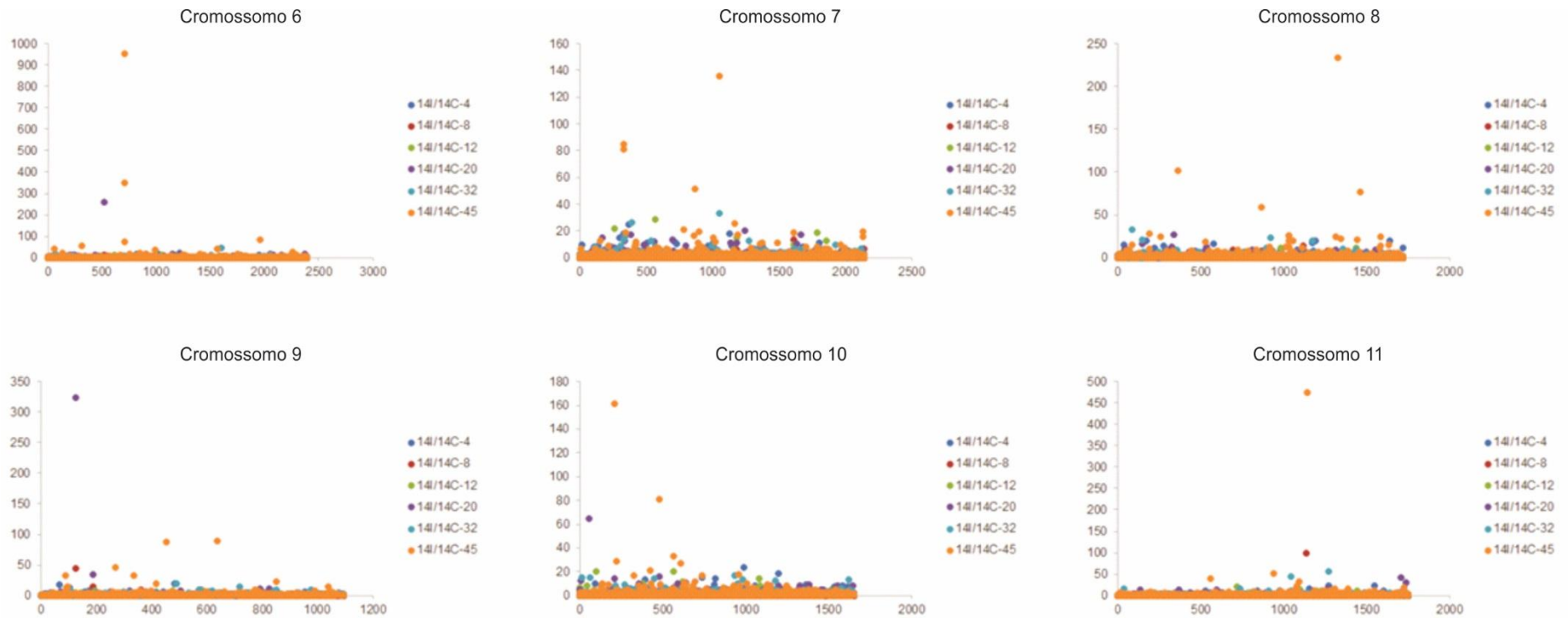
- coffee plantings in Central America against nematodes. *Plantations, Recherche, Développement: Recherche et Caféiculture* 118-133.
- Villain L, Hernández A, Anzueto F (2008) Central America. In: Souza RM (Ed.) *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Dordrecht, NL. Springer Science+Business. pp. 261-275.
- Villain L, Sarah JL, Hernández A, Bertrand B, Anthony F, Lashermes P, Charmetant P, Anzueto F, Figueroa P, Carneiro RMDG (2013) Diversity of root-knot nematodes associated with coffee orchards in Central America. *Nematropica* 43:194-206.
- Villain L, Sarah JL, Hernandez A, Charmetant P, Bertrand B, Anthony F, Topart P, Lashermes P, Anzueto F, Carneiro RM (2007) Biodiversity of root knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on coffee in Central America. In: 21st International Conference on Coffee Science, Proceedings... Montpellier, FR. ASIC. pp.1321-1324.
- Villain L, Molina A, Sierra S, Decazy B, Sarah JL (2000) Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. *Nematropica* 30:87-100.
- Vovlas N, Di Vito M (1991) Effect of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on the growth of coffee (*Coffea arabica* L.) in pots. *Nematologia Mediterranea* 19:253-258.
- Waetzig GH, Sobczak M, Grundler FM (1999) Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* 1:681-686.
- Walter MH (1992) Regulation of lignification in defense. In: Boller T, Meins F (Eds.) *Genes Involved in Plant Defense*. Nova York, US. Springer. pp. 327-352.
- Williamson VM (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology* 36:277-293.

- Williamson VM (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 2:327-331.
- Williamson VM, Kumar A (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22:396-403.
- Williamson VM, Roberts PA (2009) Mechanisms and genetics of resistance. In: Perry R, Moens M, Starr JL (Eds.) *Root-Knot Nematodes*. Cambridge, UK. CABI. pp. 301-325.
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322:681-692.
- Xavier Filho J (1992) The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 4:1-6.
- Xu H, Heath MC (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *The Plant Cell* 10:585-597.
- Yoon JY, Hamayun M, Lee SK, Lee IJ (2009) Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 12:63-68.
- Zacheo G, Bleve-Zacheo T (1988) Involvement of superoxide dismutases and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32:313-322.
- Zacheo G, Orlando C, Bleve-Zacheo T (1993) Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 25:249-256.

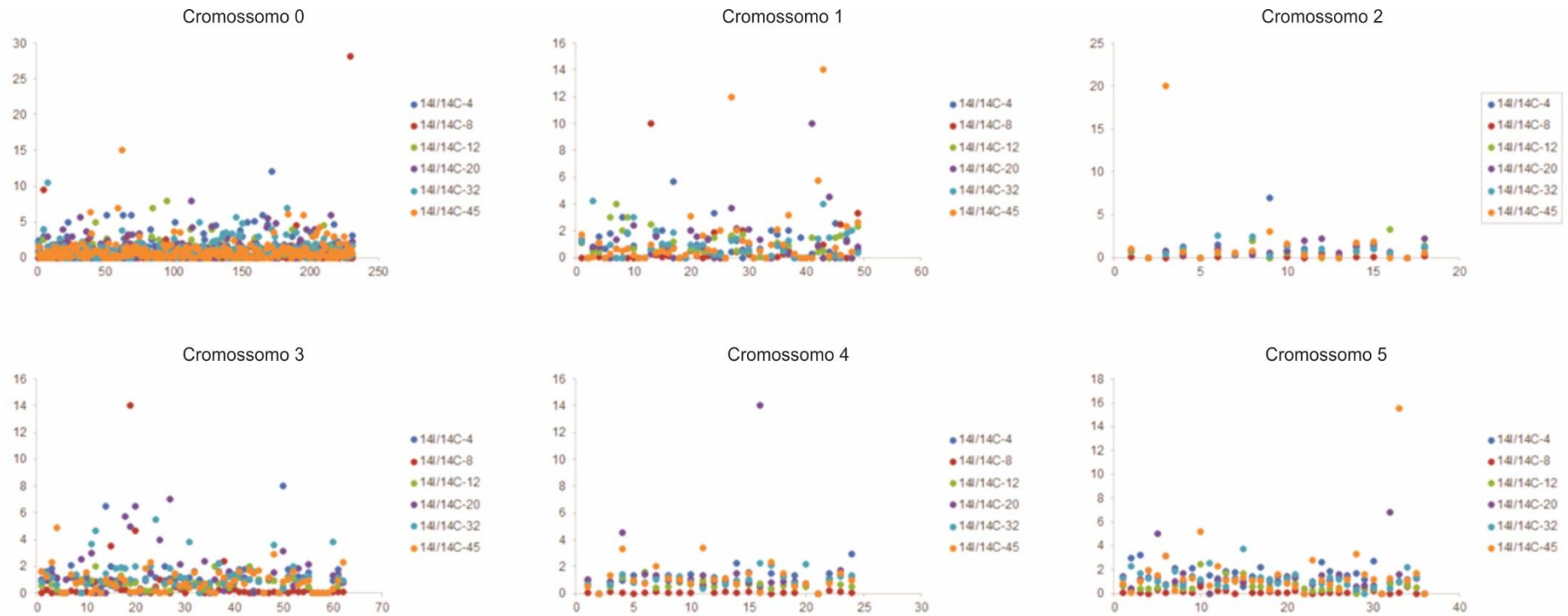
Apêndice I. Gráficos da Expressão dos genes (FI e Q) por Cromossomo.



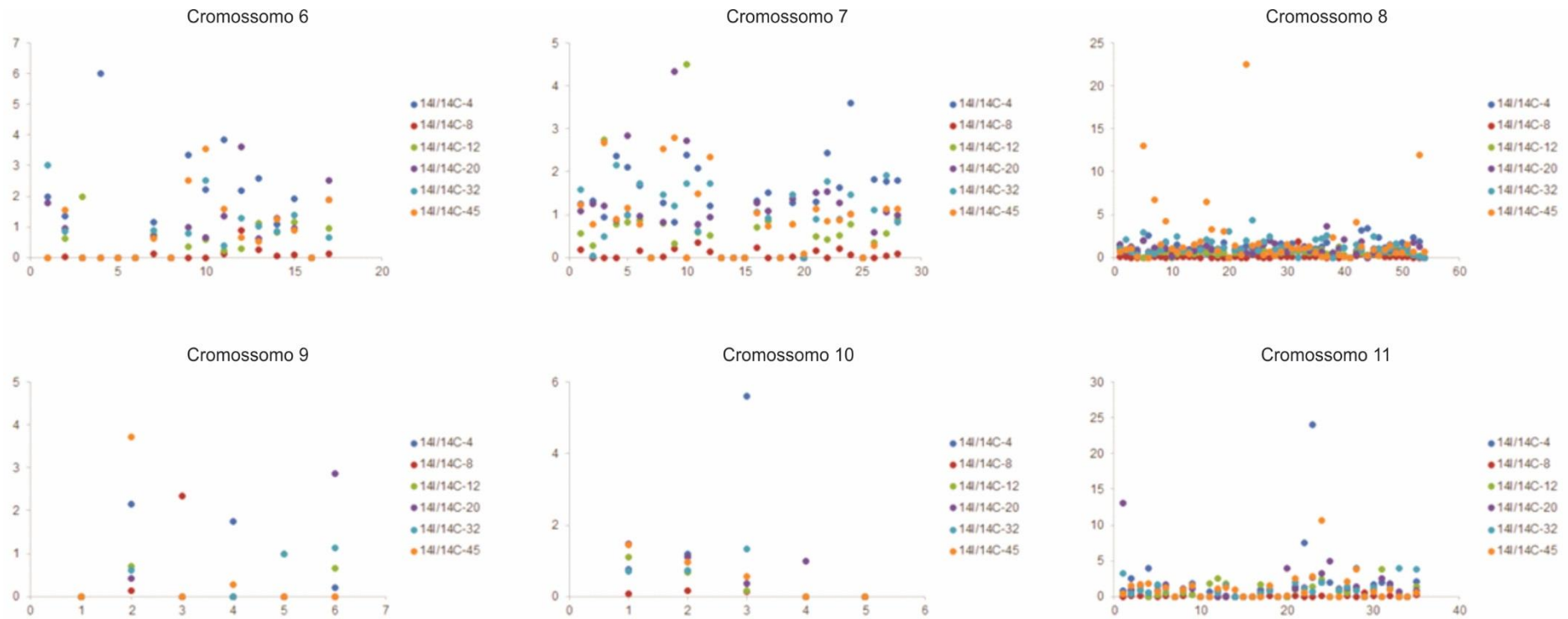
Valores de FI = $14I/14C$ dos genes para os cromossomos 0 a 5 de *Coffea canephora*. Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y , o valor da expressão FI do clone 14.



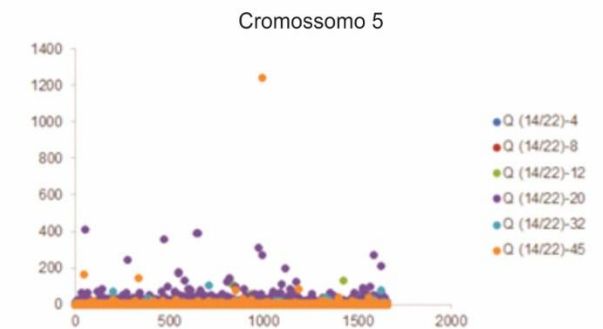
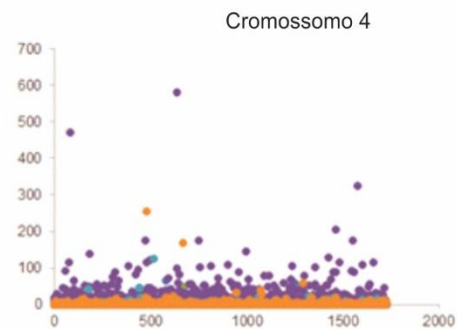
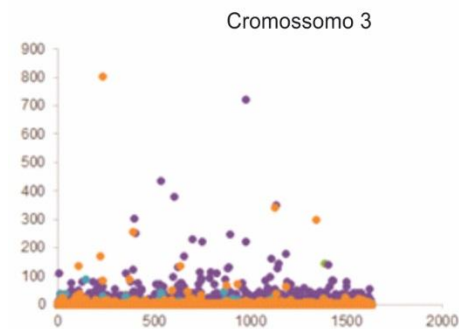
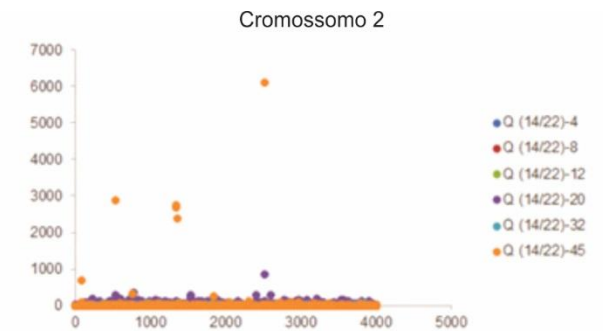
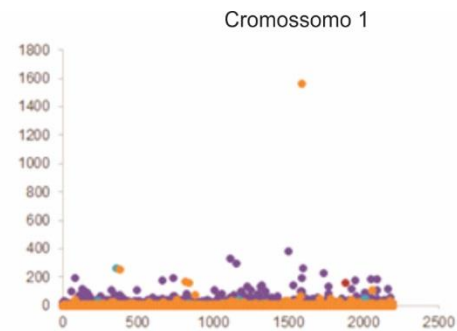
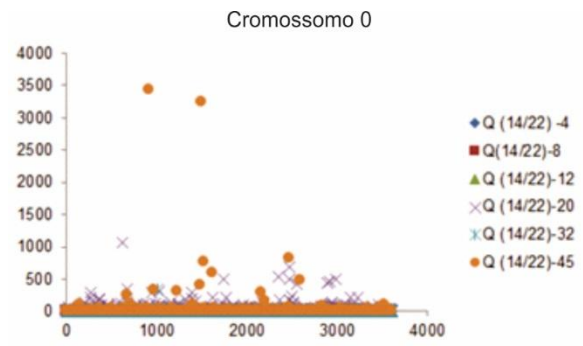
Valores de FI = 14I/14C dos genes para os cromossomos 6 a 11 de *Coffea canephora*. Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y, o valor da expressão FI do clone 14.



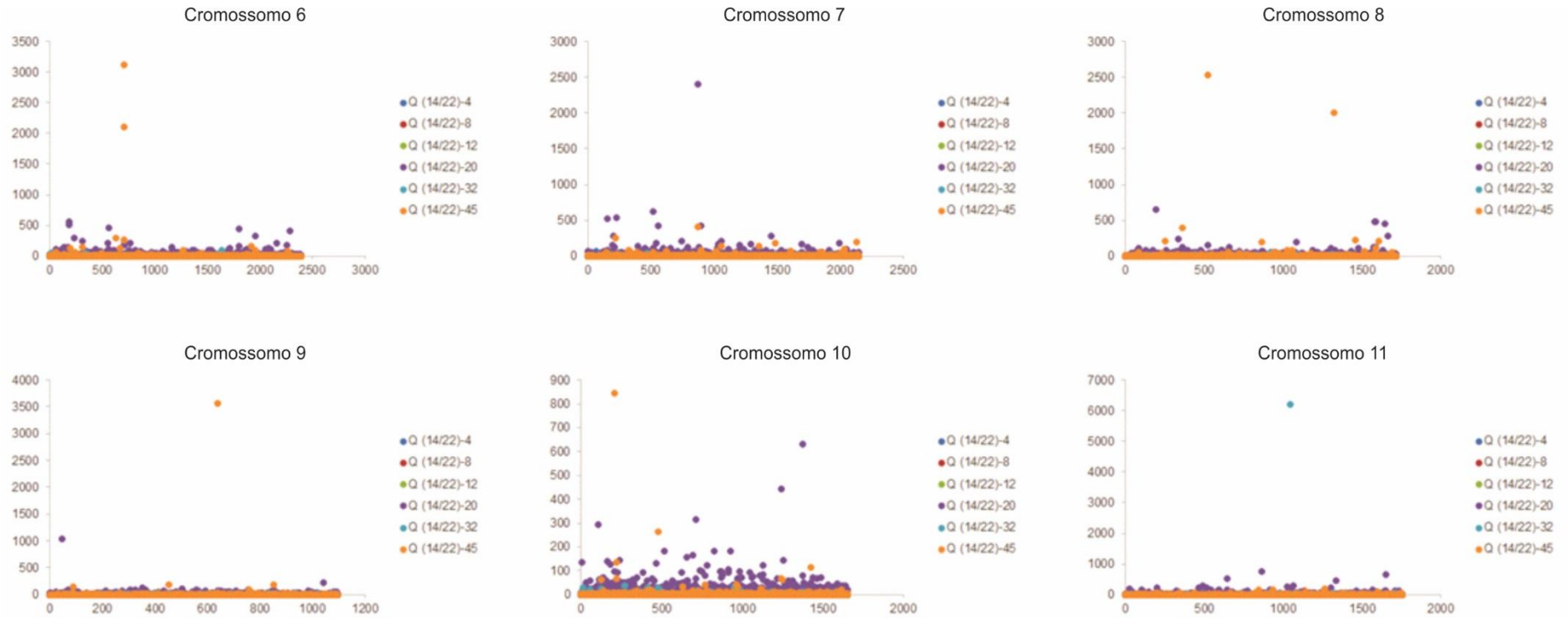
Valores de FI = 14I/14C dos genes para os cromossomos 0 a 5 de *Coffea canephora* (somente genes diretamente relacionados à resistência a patógenos). Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y , o valor da expressão FI do clone 14.



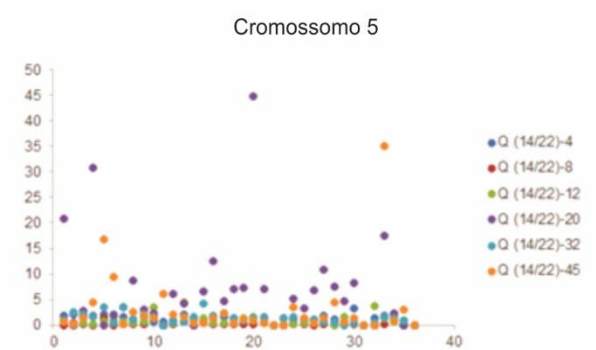
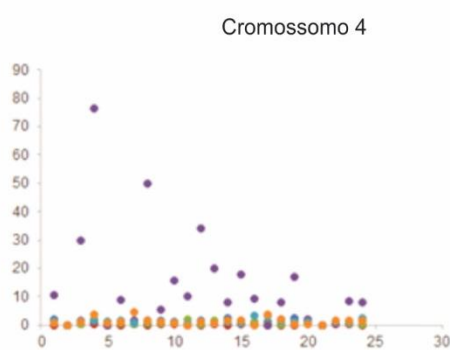
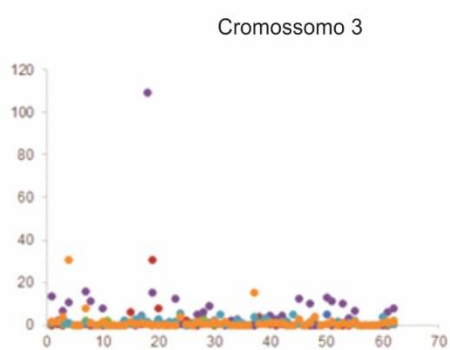
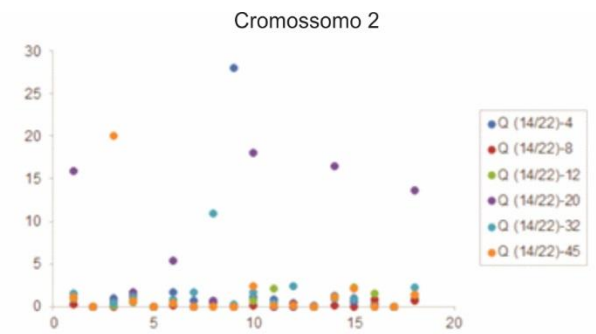
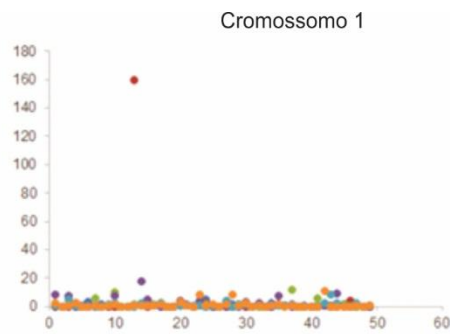
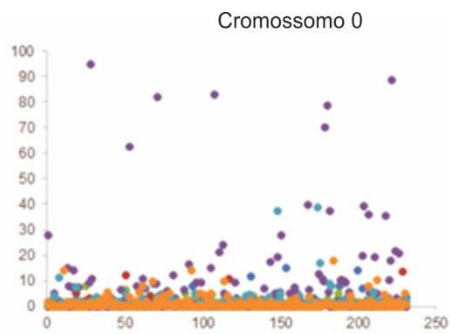
Valores de FI = 14I/14C dos genes para os cromossomos 6 a 11 de *Coffea canephora* (somente genes diretamente relacionados à resistência a patógenos). Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y, o valor da expressão FI do clone 14.



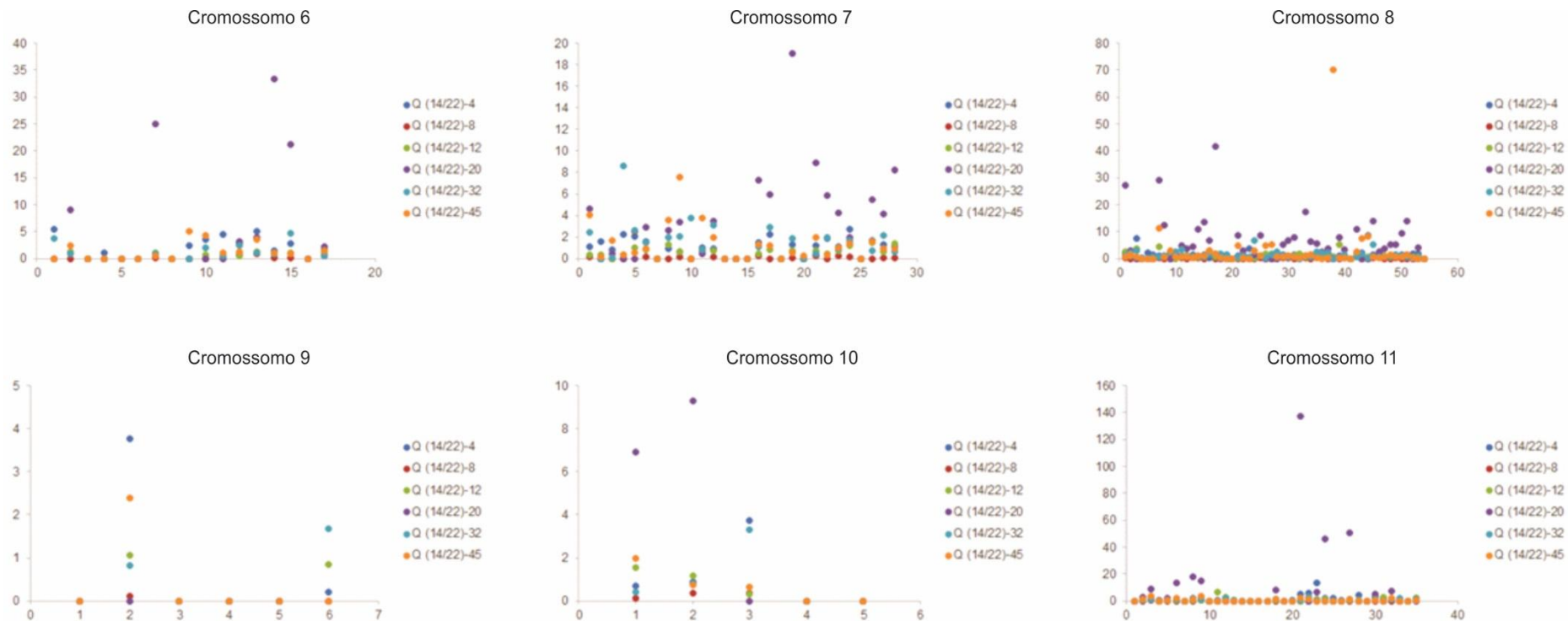
Valores de $Q = FI14/FI22$ dos genes para os cromossomos 0 a 5 de *Coffea canephora*. Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y , o valor da expressão Q .



Valores de $Q = FI14/FI22$ dos genes para os cromossomos 6 a 11 de *Coffea canephora*. Cada cor indica o dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y , o valor da expressão Q .



Valores de $Q = FI14/FI22$ dos genes para os cromossomos 0 a 5 de *C. canephora* (somente genes **diretamente** relacionados à resistência a patógenos). Cada cor indica dia após a inoculação (DAI) no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y , o valor da expressão Q .



Valores de $Q = FI14/FI22$ dos genes para os cromossomos 6 a 11 de *C. canephora* (somente genes **diretamente** relacionados à resistência a patógenos). Cada cor indica o dia após a inoculação no qual a amostra foi retirada (azul escuro, 4 DAI; vermelho, 8 DAI; verde, 12 DAI; roxo, 20 DAI; azul claro, 32 DAI; e laranja 45, DAI). O eixo x indica a posição do gene no cromossomo e o eixo y, o valor da expressão Q.