



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PPGBCM

Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular



SIBAGHE

Systèmes Intégrés en Biologie,
Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *COFFEA ARABICA* E O NEMATOIDE DA
GALHA *MELOIGOGYNE INCOGNITA* : IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA E
CARACTERIZAÇÃO POR HISTOPATOLOGIA
E GENÔMICA FUNCIONAL.**

**ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE *COFFEA ARABICA* ET LE NEMATODE A
GALLES *MELOIDOGYNE INCOGNITA*: IDENTIFICATION DE LA RÉSISTANCE
ET CARACTERISATION PAR HISTOPATHOLOGIE
ET GENOMIQUE FONCTIONNELLE.**

Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire

Tese em co-tutela submetida ao PPGBCM da UFRGS - Brasil como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências e à l'École Doctorale SIBAGHE da UM2 - França pour le grade de Docteur de l'Université de Montpellier II.

12/2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE *COFFEA ARABICA* E O NEMATOIDE DA
GALHA *MELOIGOGYNE INCOGNITA* : IDENTIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA E
CARACTERIZAÇÃO POR HISTOPATOLOGIA
E GENÔMICA FUNCIONAL.

Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Dra. Maria Fatima Grossi de Sá

Dra. Diana Fernandez

Porto Alegre

Dezembro 2009

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES**

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II
Discipline : Biologie Intégrative des Plantes
Ecole Doctorale : SIBAGHE - Systèmes Intégrés
en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences, Environnement

Présentée et soutenue publiquement
Par

Erika Valéria Saliba Albuquerque Freire

Le 17 décembre 2009

Titre:

**ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE *COFFEA ARABICA* ET LE NEMATODE A
GALLES *MELOIDOGYNE INCOGNITA*: IDENTIFICATION DE LA RÉSISTANCE
ET CARACTERISATION PAR HISTOPATHOLOGIE
ET GENOMIQUE FONCTIONNELLE.**

JURY

Mme Diana FERNANDEZ	IRD/UM2, Montpellier
	Directrice de thèse
Mme Maria Fatima Grossi de Sá	Embrapa/UFRGS, Brésil
	Directrice de thèse
Mme Janice De Almeida-Engler	INRA, Sophia-Antipolis
	Rapporteuse

M. Giancarlo Pasquali

M. Marc Giband
Montpellier

Mme Mirian Maluf

UFRGS, Brésil

Rapporteur

CIRAD,
Examineur

Embrapa/IAC - Brésil

Examinatrice

Instituições e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF e nos laboratórios da UMR 186 "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", da Equipe 2 "Mécanismes des Résistances" do IRD - Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier-França, sob a orientação da Dra. Maria Fatima Grossi de Sá e da Dra. Diana Fernandez.

Os auxílios financeiros foram obtidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café-CBP&D/Café e do Programa CAPES/Cofecub.

Dedico esta tese
Aos amores da minha vida:
meu marido,
meus pais e
meus filhos.

A sabedoria da vida não está em
fazer aquilo que se gosta, mas
gostar daquilo que se faz.

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Esta tese é fruto do trabalho desenvolvido durante anos de descobertas científicas e de aperfeiçoamento profissional. Mas houve grandes experiências pessoais, que acrescentaram lembranças e se incorporaram no meu ser. Eu não poderei me lembrar de todos os que me ajudaram durante esse tempo, até porque muitos me ajudaram mesmo que eu não percebesse.

Então, agradeço inicialmente à minha família e meus parentes, que sempre participaram e participarão da minha vida, em todos os aspectos. Agradeço também aos meus pais José e Vera, que se privaram da minha presença em momentos importantes, e dos meus filhos Pedro, Felipe e Gabriel, que viveram esta aventura comigo, me mantendo motivada. Sobretudo, agradeço hoje e sempre a presença constante e participação inestimável do meu querido Paulo Roberto, companheiro incansável em todos os momentos, anteriores, presentes e posteriores, do meu doutorado e da minha vida.

Agradeço aos meus compadres e comadres, que estando perto ou longe, sempre moram no meu coração: Andréa (Deinha) e Carlos, Luciano e Luciana e Lizandra e Paulo.

Às minhas amigas que vieram me apoiar e fazer companhia durante minha estada na França, Ana Brasileiro, Gláucinha, Cristina Mattar e Juliana.

Às amigas e colegas de todos os momentos, que não me deixaram sozinha neste período que estive distante: Natália, Soraya, Angela, Vera Carneiro, Vera Marinho, Lili, Simone, Lucília, Lu Melo, Simoni, Leila, Patrícia, Ana Cláudia, Ana Gomes, Diva, Candice.

Aos meus colegas no Cenargen e da UnB, especialmente: João Batista, Giovanni, Francisco, Elíbio, Felipe, Roberto, Rodrigo, Antônio, Osmundo, Cristiano. Em especial, agradeço aos chefes José Manoel Cabral e Mauro Carneiro, que incentivaram o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos colegas que trabalharam diretamente comigo na bancada, Welcimar, Flávia, Poliene, Aulus, Laudete, Marcelo, Norma, Liziane.

Aos meus amigos e colegas com quem trabalhei ou partilhei o laboratório na França, François, Philippe, Luc, Louis, Eugenie, Nils, Jean Luc, Marjorie, Joan, Agnes, em especial Anne Sophie, Anne Claire, Aida, Majd, Jamel e os compatriotas Alessandra, Carla e Daniel e aos colegas da Embrapa-Labex que me apoiaram na colaboração bi-lateral, Luis Vieira e Pedro Arcuri.

Às colegas da parte administrativa, cujo trabalho me permitiu iniciar e completar minha missão, Lecir, Neuza, Sylvie e Sílvia.

Aos membros do comitê de qualificação, professores Athur Fett-Neto, Márcia Márgis e Maria Helena Zanettini.

Um agradecimento especial à Dra. Regina Carneiro, por ter me orientado nos trabalhos relativos aos nematoides. Ao Dr. Antônio Pereira e às Dras. Eveline Caixeta e Mirian Eira, pelas contribuições sobre o melhoramento do cafeeiro e conservação de sementes. Ao Dr. Michel Nicole, por sua acolhida na UMR "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs" e por toda a atenção dedicada ao longo da minha permanência no IRD.

Aos Drs. Giancarlo Pasquali e Marc Giband e às Dras. Mirian Maluf e Janice Engler por terem gentilmente aceitado o convite para compor a banca examinadora da tese.

Finalmente, as minhas orientadoras, que me dedicaram seu conhecimento e experiência, com muita paciência e compreensão, eu agradeço carinhosamente à Fatima Grossi e Diana Fernandez.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Resumo	001
Resumé	003
Resumé long	005
1. INTRODUÇÃO	017
1.1. O café	019
1.1.1. Importância sócio-econômica	019
1.1.2. Aspectos botânicos	020
1.1.2.1. Descrição morfológica	021
1.1.2.2. Características genéticas	022
1.1.3. Recursos genéticos e melhoramento	023
1.2. Nematoides fitoparasitas do cafeeiro	025
1.2.1. Principais características do gênero <i>Meloidogyne</i>	025
1.2.2. Incidência no cafeeiro	028
1.2.3. Controle da meloidoginose	030
1.3. Interações	033
1.3.1. Interação planta-patógeno	033
1.3.1.1. Resistência localizada	037
1.3.1.1.1. Resistência basal	038
1.3.1.1.1.1. Basal contra bactérias e fungos	038
1.3.1.1.2. Resistência específica	039
1.3.1.1.2.1. Genes <i>R</i> em plantas	039
1.3.1.1.2.2. Associada à reação de hipersensibilidade	049
1.3.1.1.2.2.1. Resposta hipersensitiva	050
1.3.1.1.2.3. Contra toxinas de patógenos	056
1.3.1.1.2.4. Não-sintomática – resistência extrema	058
1.3.1.1.3. Resistência Não-hospedeira	058
1.3.1.2. Resistência sistêmica	059
1.3.1.2.1. Adquirida	059
1.3.1.2.2. Induzida	061
1.3.1.3. Transdução do sinal de resistência	062
1.3.1.4. Silenciamento gênico	064
1.3.2. Interação planta- nematoide da galha	067
1.3.2.1. Incompatibilidade	068

1.3.2.1.1.	A resposta hipersensitiva aos RKN	068
1.3.2.1.2.	Genes <i>Nem-R</i>	069
1.3.2.1.3.	Efetores e genes de avirulência de elicitores do nematoide	072
1.3.2.2.	Compatibilidade	072
1.3.2.2.1.	Genes do parasitismo e efetores de virulência dos RKN	076
1.3.2.2.2.	Genes da suscetibilidade da planta	078
1.3.2.3.	A sinalização da interação planta-nematoide	080
1.4.	A transformação genética na resistência do cafeeiro	082
1.4.1.	Transformação genética de plantas lenhosas	084
1.4.2.	Transformação genética de cafeeiro	085
2.	FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE	087
	Capítulo 1. Identificação e caracterização da resistência à <i>M. incognita</i> em cafeeiro	089
1A.	Resistance to <i>Meloidogyne incognita</i> is expressed by a hypersensitive-like response in <i>Coffea arabica</i>	091
	Capítulo 2. Estudo da resposta molecular do cafeeiro à infecção por <i>M. incognita</i>	111
2.1.	Introdução	113
2.2.	Material e métodos	117
2.3.	Resultados	129
2.4.	Discussão	153
	Capítulo 3. Transformação de cafeeiro para caracterização e validação de genes	156
3A	Transgenic coffee fruits from <i>Coffea arabica</i> genetically-modified by bombardement	
3.	DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
4.	BIBLIOGRAFIA	172
5.	<i>Curriculum Vitae</i>	213

Lista de Abreviaturas

cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EST	Expressed Sequence Tag
ETI	Effector-triggered immunity
ETS	Effector-triggered susceptibility
GI	Gall Index
Kb	Quilo bases (1000 pares de bases)
LRR	Leucine rich repeat domain
MAMPs	Microbial-associated molecular patterns
NB	Nucleotide binding domain
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase II
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polimerase Chain Reaction
PRR	Pattern recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity
RH	Reação de Hipersensibilidade
RNA	Ácido ribonucleico
<i>uidA</i>	Beta-D-glucuronidase (GUS)

Resumo

Os nematoides da galha do gênero *Meloidogyne* provocam perdas importantes na produção de numerosas plantas de interesse agrônomico, como o cafeeiro (*Coffea arabica*). Neste trabalho foi identificado o acesso UFV 408-28 de *C. arabica* resistente à *M. incognita* e foram caracterizadas as respostas de resistência da planta nos níveis histológico e molecular. A resistência do genótipo UFV 408-28 se exprime por uma reação do tipo hipersensível (RH), com morte celular no local da infecção. A infecção por *M. incognita* é bloqueada antes de haver a formação de sítios de alimentação. Na planta suscetível (IAC15), o desenvolvimento do nematoide prossegue até a produção de ovos nas galhas, sendo que o ciclo se completa em aproximadamente 45 dias. O estudo comparativo das respostas moleculares dos dois genótipos entre 4 e 6 dias após infecção mostraram uma especificidade da expressão dos genes associados à RH ou à suscetibilidade. No genótipo resistente, a expressão de genes ligados à via de resistência dependente do ácido salicílico, ou à via dos compostos fenilpropanoides, é particularmente modificada. A identificação dos genes implicados na expressão da resistência pode ser utilizada no desenvolvimento de marcadores de seleção para o melhoramento de variedades comerciais de cafeeiro. Em paralelo, a transformação genética de *C. arabica* foi desenvolvida com o auxílio do gene repórter *uidA* (GUS), permitindo assim a possibilidade de transferência de genes para o estudo do seu respectivo envolvimento na resistência aos nematoides.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *Meloidogyne incognita*; nematoide da galha; resposta de hipersensibilidade, resistência de plantas; transformação genética.

Resumé

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* peuvent provoquer des pertes de récolte importantes chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique, comme le caféier (*Coffea arabica*). Dans ce travail, une variété de *C. arabica* (UFV 408-28) résistante à *M. incognita* a été identifiée et les réponses de résistance de la plante ont été caractérisées aux plans histologique et moléculaire. La résistance du génotype UFV 408-28 s'exprime par une réaction de type hypersensibilité (RH), avec mort cellulaire au site d'infection. L'infection par *M. incognita* est stoppée avant la formation des sites nourriciers. Chez la plante sensible (IAC15), le développement du nématode se poursuit jusqu'à la production d'œufs dans les galles, le cycle complet durant environ 45 jours. L'étude comparative des réponses moléculaires des deux génotypes entre 4 et 6 jai montre une spécificité de l'expression des gènes associée à la RH ou à la sensibilité. Dans le génotype résistant, l'expression de gènes liés à la voie de résistance dépendante du acide salicylique, ou à la voie des composés phénylpropanoïdes, est particulièrement modifiée. L'identification de gènes impliqués dans l'expression de la résistance, et pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection offre de nouvelles perspectives pour améliorer les variétés commerciales de café. En parallèle, la transformation génétique de *C. arabica* a été développée à l'aide du gène rapporteur *uidA* (GUS), permettant désormais d'envisager le transfert de gènes d'intérêt pour étudier leur rôle dans la résistance aux nématodes.

Mots-clés: *Coffea arabica*, *Meloidogyne incognita* ; nématode à galles ; réponse d'hypersensibilité, résistance des plantes ; transformation génétique.

Resumé long

1. Contexte et objectifs

Parmi les plantes d'intérêt agronomique, le caféier (*Coffea* sp.), surtout l'espèce *C. arabica*, constitue un élément essentiel dans l'économie d'exportation du Brésil, principal pays producteur du monde, avec 35% de la production mondiale en 2006.

Les nématodes du genre *Meloidogyne* peuvent provoquer des pertes de récolte importantes. On leur attribue 15% de pertes de la récolte brésilienne de café en 1998/9, avec un préjudice de l'ordre de 500 millions de dollars. Les stratégies de contrôle de nématodes font usage de pesticides extrêmement toxiques, peu efficaces et coûteux, et qui ont des conséquences néfastes sur l'environnement. Les programmes d'amélioration de caféier cherchent à développer des 'cultivars' de *C. arabica* moins sensibles aux nématodes de par le croisement avec des variétés provenant de *C. canephora*. Toutefois, les caractéristiques biologiques du caféier rendent difficile l'incorporation de gènes de résistance par l'amélioration traditionnelle et l'acquisition de résistances est accompagnée de modification d'autres caractéristiques agronomiques de la plante. Ainsi, la recherche vise à identifier et étudier les gènes impliqués dans la résistance aux nématodes *Meloidogyne* spp et à mettre au point des outils de transfert de ces gènes vers des variétés commerciales.

Ce travail de thèse avait pour objectif 1) d'identifier et de caractériser la résistance du caféier (*C. arabica*) au nématode de l'espèce *M. incognita*, 2) d'identifier des séquences potentiellement impliquées dans l'activation et la mise en place des systèmes de défense du caféier, et 3) d'évaluer la possibilité de transférer des gènes d'intérêt dans des variétés de *C. arabica* par transformation génétique.

Ces recherches ont été entreprises par le biais d'une collaboration entre le Cenargen-Embrapa (Brasilia, Brésil) et l'IRD (Montpellier, France) et grâce à un accord de co-encadrement de thèse (UFRGS - UM2) et une bourse financée par l'Embrapa (Brésil). Les travaux ont été menés dans le cadre d'un projet Capes (Brésil) – Cofecub (France) intitulé «Estratégias moleculares aplicadas para o melhoramento genético do cafeeiro visando resistência a fitonematóides.» (2007-2011), dont l'objectif est de développer des outils pour la sélection et l'utilisation de résistances durables aux nématodes au Brésil.

Les travaux de thèse ont commencé en 2005 au Cenargen par la sélection de plantes résistantes à *M. incognita* et la caractérisation histologique de la résistance. En parallèle, le développement de l'outil de transformation génétique du caféier était réalisé. A partir de 2007, au sein de l'UMR Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB) de l'IRD, les recherches ont été étendues à l'étude des réponses moléculaires du caféier à l'infection par *M. incognita*.

Le mémoire est constitué de 5 parties :

- une introduction bibliographique qui présente 1) les connaissances actuelles sur le caféier, sa transformation génétique et le pathosystème caféier – *Meloidogyne spp.*, 2) la résistance des plantes aux bio-agresseurs, et 3) les mécanismes de reconnaissance et les réponses de défense des plantes aux nématodes.
- Un premier chapitre décrivant la sélection de plantes résistantes à *M. incognita* et la caractérisation histologique de la résistance.
- Un deuxième chapitre présentant les résultats acquis sur les réponses moléculaires du caféier à l'infection par *M. incognita*.
- Un troisième chapitre rapportant les résultats acquis sur la transformation génétique du caféier avec le gène rapporteur *uidA*.
- Enfin, des conclusions générales et perspectives sont présentées.

La sélection et caractérisation de la résistance du caféier à *M. incognita* (Chapitre I) est présentée sous forme d'un article, en cours de révision pour la revue *European Journal of Plant Pathology* (Albuquerque E.V.S., Carneiro R., Costa P., Gomes A., Santos M., Pereira A., Nicole M., Fernandez D. and Grossi-de-Sa M.F. 2009. Resistance to *Meloidogyne incognita* is expressed by a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*).

La transformation génétique du caféier (chapitre III) fait l'objet d'un article publié dans la revue *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* (Albuquerque E.V.S., Cunha W.G., Barbosa A.E.A.D, Teixeira J.B., Vianna G.R., Cabral G.B., Fernandez D. and Grossi-de-Sa M.F. 2009. Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically-modified by bombardement. 45:532–539). Il est important de noter que c'est, à ce jour, le premier travail qui rapporte l'expression d'un transgène dans des fruits de *C. arabica*.

Dans ce résumé, nous présentons rapidement les données bibliographiques relatives au caféier et aux réponses de défense des plantes aux nématodes, puis les résultats acquis, en suivant l'organisation du mémoire écrit en portugais.

2. Contexte scientifique

2.1. Le caféier : contraintes agronomiques et ressources génétiques

La culture du caféier (*C. arabica*) occupe une place de choix dans le commerce international et génère des revenus importants pour les pays producteurs. Cependant, les principales variétés de *C. arabica* cultivées sont sensibles aux parasites, notamment à la rouille orangée, due au champignon *Hemileia vastatrix*, et aux nématodes du genre *Meloidogyne*. La lutte contre ces parasites fait appel depuis longtemps à l'utilisation de produits chimiques, avec tous les inconvénients qui en dérivent aux plans de la santé humaine, écologique et financier. Même si des méthodes de lutte alternatives sont possibles (utilisation de variétés de *C. canephora* résistantes aux nématodes comme porte-greffe, par exemple), elles ne sont pas forcément adaptées à la culture à grande échelle. Pour améliorer le caféier pour la résistance aux parasites, la voie génétique a été privilégiée depuis une cinquantaine d'années, avec pour objectif l'obtention de variétés de caféiers résistantes et conservant une production élevée, ainsi qu'une bonne qualité à la tasse (Van der Vossen, 2001). L'espèce de caféier *C. arabica* se singularise des autres espèces du genre *Coffea* par son organisation génomique et son mode de spéciation. *C. arabica* est la seule espèce autogame tétraploïde ($2n = 4x = 44$ chromosomes), les autres espèces étant diploïdes et allogames. Une faible variabilité génétique a été observée au sein de l'espèce *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 2000 ; Moncada et McCouch, 2004) et a été attribuée à ses caractéristiques biologiques particulières. Associée à la polyploïdie unique de *C. arabica*, elle limite particulièrement l'amélioration génétique de l'espèce. Il a ainsi été fait largement profit, dans les programmes de sélection, de l'Hybride de Timor, une variété tétraploïde résultant d'une hybridation naturelle de *C. arabica* avec *C. canephora*. Malheureusement, l'introduction de facteurs de résistance à partir des espèces apparentées s'accompagne généralement de facteurs génétiques défavorables à la qualité (Bertrand *et al.*, 2003). Par ailleurs, il est connu que la plupart des gènes de résistance sont hautement spécifiques et susceptibles d'induire une sélection de populations de parasites capables de contourner cette résistance.

Concernant la résistance aux nématodes, peu de données sont disponibles sur les interactions caféier / *Meloidogyne* spp. Seul un gène de résistance majeur (*Mex-1*) à l'espèce de nématode *M. exigua* a été génétiquement caractérisé à ce jour chez les caféiers (Noir *et al.*, 2003). Plus d'une quinzaine d'espèces de *Meloidogyne* ont été décrites dans le monde comme parasites du caféier (Carneiro *et al.*, 1996) et la plupart d'entre elles sont polyphages, non spécifiques des caféiers. Des études histologiques ont montré que la résistance à *M. exigua* conférée par le gène *Mex-1* se caractérise par une réaction d'hypersensibilité (RH) des cellules aux sites d'infection (Anthony *et al.*, 2005). A l'IRD, des banques d'ADNc spécifiques des interactions caféier / *M. exigua* ont été réalisées pour isoler des gènes exprimés au cours des réactions de résistance de la plante. Le séquençage systématique de 1500 ESTs a permis d'établir un catalogue des gènes exprimés en réponse à l'infection (Lecoals *et al.*, 2006).

Au plan génomique, les ressources publiques en ESTs du caféier sont en progression constante avec 527 unigènes de *C. arabica* associés aux réponses de résistance du caféier à la rouille (Fernandez *et al.*, 2004) et 13157 unigènes de *C. canephora* liés au développement du fruit (Lin *et al.*, 2005). Au Brésil, nous avons accès aux 200.000 ESTs de *C. arabica* produites dans le cadre du projet GenomaCafé (Vieira *et al.*, 2006). Cependant seules les ESTs de Lecoals *et al.*, (2006) sont issues de banques préparées à partir de racines de *C. arabica*.

Concernant la transformation génétique du caféier, au début de ce travail de thèse la technologie en était à ses débuts et en cours de mise au point dans plusieurs laboratoires (Etienne *et al.*, 2006).

2.2. Les mécanismes de défense des plantes et l'interaction plante - nématodes

Dans le cas de l'interaction plante - *Meloidogyne*, l'établissement du nématode dans les racines s'accompagne de modifications moléculaires et structurales des tissus racinaires qui témoignent d'une stratégie d'infection particulièrement performante (Caillaud *et al.*, 2008). Notamment, l'activité de facteurs de compatibilité produits par les glandes salivaires du nématode, et sécrétés via leur stylet dans les cellules hôtes, permettrait au parasite de contourner les mécanismes de défense de la plante et de détourner le métabolisme de la cellule végétale à son profit (Davis *et al.*, 2008). Récemment, un « sécrétome » de *M. incognita* composé d'environ 300 facteurs a été établi (Bellafiore *et al.*, 2008).

L'induction des mécanismes de défense mis en place dans les interactions plante - agent pathogène a été particulièrement bien étudiée dans le cas des relations gène - pour - gène, dont le phénotype de résistance est la RH, associée à la mort des cellules au site d'infection (Jones et Dangl, 2006). La RH s'accompagne de la production de formes très réactives de l'oxygène, de la libération de composés entrant dans la cascade de signalisation cellulaire, de l'activation des gènes de défense et de changements structuraux. A ce jour, seuls quelques gènes de résistance spécifiques aux *Meloidogyne* ont été identifiés et un seul cloné (Fuller et al., 2008). A l'exception de la résistance du pois chiche gouvernée par le gène *Rk*, la résistance gouvernée par ces gènes *R* s'exprime par une RH (gène *Mi-1* chez la tomate; Williamson, 1999), (gène *Mex-1* chez le caféier; Anthony et al., 2005), (gène *Me3* chez le poivron; Pegard et al., 2005) et (arachide ; Proite et al., 2008). Les mécanismes de l'interaction plante - *Meloidogyne* ont été étudiés chez la tomate portant le gène de résistance *Mi* (Milligan *et al.*, 1998). Cependant, le plus grand nombre d'informations concerne l'interaction de type compatible et les gènes induits lors de la formation du site nourricier (cellule géante) permettant au nématode d'achever son cycle de développement (de Almeida Engler et al., 2005 ; Caillaud et al ; 2008). A l'heure actuelle, peu de données existent sur les mécanismes de défense des plantes aux nématodes.

3. Sélection et caractérisation de la résistance du caféier à *M. incognita* (Chapitre I)

3.1. Identification de variétés résistantes

Dans ce travail, les génotypes de *C. arabica* Catuai Vermelho (IAC 15) et UFV 408-28 ont été testés pour leur sensibilité ou résistance aux trois espèces de *Meloidogyne* les plus représentées au Brésil : *M. incognita* (races 1, 2 et 3), *M. exigua* et *M. paranaensis*. Le génotype UFV 408-28 de l'Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais-Brésil) est dérivé d'un Hybride de Timor (CIFC 1590/9) et avait été sélectionné dans des d'essais de pathogénicité préliminaires. Le génotype IAC 15 qui provient de l'Instituto Agrônômico de Campinas (São Paulo-Brésil) est sensible aux nématodes et a été utilisé comme contrôle de sensibilité dans toute cette étude. Les essais de pathogénicité ont été réalisés sur des plants âgés de 6 mois, qui ont été chacun inoculés avec 5000 œufs de *Meloidogyne spp.* Huit mois plus tard, des comptages du nombre de galles sur les racines ainsi que des juvéniles produits ont été réalisés. Les analyses ont indiqué que les populations fortement agressives des *M. incognita* (races 1, 2 et 3) ne

pouvaient pas se reproduire avec succès dans les racines d'UFV 408-28, montrant un faible index de formation des galles (GI=2). En moyenne, une réduction de 87 % des populations de *M. incognita* a été observée sur UFV 408-28 par comparaison avec le cultivar sensible IAC 15. En revanche, UFV 408-28 s'est révélé sensible aux espèces *M. exigua* et *M. paranaensis* (GI= 5 et 4, respectivement), comme la variété IAC 15 (GI=5). Le génotype UFV 408-28 a donc été classé comme résistant à *M. incognita* et a été utilisé dans la suite de ce travail comme modèle pour l'étude de la résistance du caféier à *M. incognita*.

3.2. Caractérisation histologique de la résistance

Les analyses de pathologie ont été complétées par des analyses histo-cytologique pour la caractérisation approfondie de la résistance à *M. incognita*. Une étude comparative du déroulement du cycle infectieux de *M. incognita* (race 1) en situation compatible (génotype IAC 15) et incompatible (génotype UFV 408-28) a été entreprise afin de préciser la chronologie des événements conduisant à l'établissement de la résistance et d'en déterminer son phénotype au plan cellulaire. Des plantes âgées de 3-4 mois ont été inoculées avec environ 10 000 J2, et des coupes histologiques ont été réalisées sur des racines prélevées entre 2 et 49 jours après l'inoculation (jai). Au total, 9000 coupes de racines ont été examinées, en lumière blanche après coloration au bleu de toluidine, ou sous UV pour détecter une auto-fluorescence primaire. Chez la plante sensible, le nématode (stade juvénile J2) pénètre les racines au niveau du méristème au cours des 2 premiers jours suivant l'inoculation. Après migration intercellulaire dans le cortex vers le cylindre central, le nématode établit à partir de 6 jai des sites nourriciers, composés de cellules péri-vasculaires hypertrophiées. Chaque site nourricier est composé d'environ 5 cellules géantes, hyper vacuolisées, présentant un cytoplasme dense, et pouvant comporter plusieurs noyaux. A partir de 14 jai, on retrouve les nématodes associés aux sites nourriciers sous forme J3 ou J4. A 34 jai, on observe des femelles bien différenciées au sein de galles. Le cycle s'achève après 40 jai, avec la production des œufs et la rupture des galles (49 jai) permettant leur libération de la racine.

Chez la plante résistante, on retrouve des nématodes dans les racines jusqu'à 8 jai, et uniquement sous forme de J2. Aucune différenciation de site nourricier ou de cellule géante n'a été observée sur les 4500 coupes réalisées jusqu'à 34 jai. Il a été observé que l'infection du nématode pouvait être bloquée dès la pénétration, ou pendant la migration à 6, 7 et 8 jai. Les observations en microscopie effectuées entre 6 et 10 jai ont montré que

les cellules racinaires entourant les nématodes présentait des caractéristiques cellulaires de type RH (condensation de cytoplasme, aspect nécrotique), associées à une accumulation de composés phénoliques.

Ces données montrent que la résistance du génotype UFV 408-28 à *M. incognita* s'exprime par une réponse localisée de type RH. La progression du nématode est stoppée avant l'établissement de sites nourriciers et le développement des larves ne dépasse pas le stade J2. Chez le génotype sensible, le cycle complet de *M. incognita* est d'environ 40 jours.

4. Réponses moléculaires du caféier à l'infection par *M. incognita*. (Chapitre II)

L'objectif de ce travail était de comparer l'expression de gènes associés aux réponses de défense et/ou résistance dans les deux génotypes IAC 15 et UFV 408-28. En préalable à ce travail, une série de gènes candidats a été choisie dans les banques de données existantes sur la base de leur homologie avec des gènes impliqués dans la résistance chez les espèces modèles, tels que les régulateurs RAR1, EDR1, PAD4 ou des gènes impliqués dans des voies de biosynthèse d'hormones tel qu'une 13-lipoxygénase pour la synthèse de jasmonate. Cependant, la majorité des gènes étudiés ont été choisis à partir des banques soustractives issues de racines infestées par *M. exigua* réalisées à l'IRD (Lecouls et al., 2006).

Les 90 gènes retenus ont été classés en 14 classes selon leur fonction probable, lorsque celle-ci était connue, et sont identifiés dans le tableau 1. Pour chacun des gènes, des amorces spécifiques ont été déterminées pour analyser leur expression par RT-PCR quantitative.

Les résultats précédents obtenus en histologie ont permis de choisir les temps appropriés à l'étude de l'expression des gènes pour étudier la réponse de résistance associée à la RH. Des plantes âgées de 4 mois ont été inoculées avec environ 5000 J2 de *M. incognita* (race 1) et les extrémités (env. 1 cm) des racines ont été collectées 4, 5 et 6 jai. L'expérimentation comprenait 3 répétitions biologiques et l'expression des gènes chez les plantes inoculées a été comparée, pour chaque temps d'analyse, à celle de plantes non inoculées. Les résultats ont été analysés statistiquement par une comparaison des moyennes obtenues (ANOVA). Sur les 90 gènes testés, près de la moitié (43) ont montré une régulation transcriptionnelle au cours de l'infection par le nématode. Au plan chronologique, les réponses moléculaires de la plante semblent suivre la cinétique d'infestation : à 4 jai, seuls 2 gènes ont montré une expression différente de celle des

témoins non inoculés, à 5 jai ce sont 17% des gènes (5 chez le génotype résistant et 12 chez le génotype sensible) et, à 6 jai 38% des gènes étudiés sont dérégulés (20 chez le résistant, 19 chez le sensible). Dans l'ensemble, les réponses des génotypes sensible et résistant sont très différentes, puisque seulement 7 des gènes étudiés ont montré une régulation dans les deux génotypes à l'un des trois temps considérés. Ainsi, 16 gènes chez le génotype résistant UFV 408-28, et 19 gènes chez le génotype sensible IAC 15 ont présenté un profil d'expression caractéristique. Sur la base de leur similarité avec des protéines de fonction connue, l'analyse des gènes de caféier exprimés pendant l'infection avec *M. incognita* montre notamment que, entre 5 et 6 jai :

- dans les deux génotypes, 1) la majorité (77%) des facteurs de transcription testés, sélectionnés sur la base de leur implication dans l'activation des réponses de résistance aux parasites, est activée, suggérant que la plante est dans une phase de réponse active au parasite 2) la voie de biosynthèse du jasmonate est activée à 5 jai, ce qui pourrait être une réponse non spécifique due au dommage mécanique créé par la migration du nématode dans les tissus racinaires.

- chez le génotype résistant, 1) les gènes de défense qui sont activés correspondent à des régulateurs de résistance (PAD4) ou des PR protéines (PR1b, PR10) associés à la voie de signalisation de la résistance dépendante de l'acide salicylique (AS), 2) tous les gènes testés impliqués dans des voies de biosynthèse des phényl-propanoïdes sont réprimés à 6 jai, suggérant une répression de ce métabolisme lié au SA, lignines, acides chlorogéniques, flavonoïdes et à de nombreux autres métabolites secondaires 3) seuls quelques gènes impliqués dans la mort cellulaire ou le choc oxydatif sont activés entre 5 et 6 jai, en accord avec les observations en microscopie qui indiquaient que les premières RH étaient visibles à partir de 6 jai.

- chez le génotype sensible, peu de gènes liés à la défense sont activés. En revanche, ceux liés à la modification des parois cellulaires sont dérégulés, ainsi que des gènes liés à la mort cellulaire. A 6 jai, les observations en microscopie montraient le développement des premiers sites nourriciers. Les modifications spécifiques observées chez ces gènes pourraient être liées à ces changements structuraux.

5. Transformation génétique du caféier

La modification génétique de *C. arabica* est un outil important pour la recherche et la validation fonctionnelle des gènes. Dans ce travail, des plants du génotype Catuaí Vermelho ont été modifiés génétiquement avec le gène rapporteur *uidA* (GUS) par

bombardement de cals embryogéniques. Des explants de feuilles ont été cultivés sur un milieu inducteur de la callogenèse, modifié avec 20 μM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), et des cals ont été obtenus pour 90% d'entre eux. Les cals ont été bombardés avec le vecteur pBI426 contenant une fusion *uidA-nptII* sous le contrôle du promoteur double-CaMV35s. Les embryons ont été sélectionnés sur Kanamycine et la présence du transgène a été vérifiée par des analyses histochimiques d'activité β -glucuronidase (GUS), ainsi que par l'amplification du gène en PCR. L'intégration du transgène a été confirmée par Southern (sonde gène *nptII*) et un faible nombre de copies insérées (1 à 3) a été observé dans les embryons sélectionnés. Les plantes transformées ont ensuite montré un développement normal et ont produit des fruits au bout de trois ans. L'expression du gène *uidA* a été vérifiée dans les fleurs et les fruits, démontrant la capacité du promoteur double-CaMV35s à contrôler l'expression stable et à long terme d'*uidA* dans tous les tissus de *C. arabica*. En effet, nous avons obtenu une descendance T1 présentant une ségrégation de type Mendélienne 3:1 du gène *uidA*. Ces travaux étaient les premiers à rapporter l'expression d'un gène hétérologue dans des fruits de café, et sa transmission héréditaire aux plantes de *C. arabica*.

6. Conclusions et perspectives

Dans ce travail, une variété de *C. arabica* (UFV 408-28) résistante à *M. incognita* a été identifiée et les réponses de résistance de la plante ont été caractérisées aux plans histologique et moléculaire. Nous avons montré que la résistance du génotype UFV 408-28 s'exprimait par une réaction de type RH, avec la mort des cellules racinaires entourant le nématode. L'infection est stoppée au bout de 6 jours, avant la formation des sites nourriciers. Chez la plante sensible (IAC15), le développement du nématode se poursuit jusqu'à la production d'œufs dans les galles, le cycle complet durant environ 45 jours. Une étude comparative des réponses moléculaires des deux génotypes entre 4 et 6 jai a montré une spécificité de l'expression des gènes associée à la RH ou à la compatibilité. Dans le génotype résistant, l'expression de gènes liés à la résistance dépendante du SA ou la voie métabolique de production de composés phénylpropanoïdes, semble être particulièrement modifiée. Ces données sont à mettre en parallèle avec celles obtenues chez la tomate porteuse du gène *Mi.1*, qui montrent que l'AS joue un rôle essentiel dans la résistance à *M. incognita* (Branch et al., 2004 ; Bhattarai et al., 2008).

Chez le caféier, ces travaux constituent la première étude, au niveau moléculaire, des réponses physiologiques de la plante aux nématodes. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour approfondir notre compréhension des mécanismes qui participent à l'induction des réactions de défense du caféier aux *Meloidogyne spp.* En effet, grâce à ce travail, nous avons pu établir les cinétiques de réponses de la plante sensible ou résistante à *M. incognita* et identifier quelques gènes activés dans la RH. Pour une compréhension plus générale des mécanismes de défense du caféier aux nématodes, il serait intéressant de vérifier les réponses de la plante à d'autres *Meloidogyne spp.* La plupart des gènes que nous avons testés sont issus d'une banque d'ADNc de caféier inoculé avec *M. exigua* (Lecouls et al., 2006). Des résultats préliminaires obtenus sur l'expression de ces gènes en interaction incompatible semblent indiquer que les réponses moléculaires de la plante associées à la RH sont différentes (Lecouls, com. pers.).

Il serait intéressant de compléter le catalogue des gènes induits ou réprimés en réponse à *M. incognita* et *M. exigua*, les deux espèces pour lesquelles des résistances spécifiques ont été identifiées chez le caféier. La production d'ESTs par pyroséquençage, par exemple, permettrait de générer une quantité exhaustive de données et d'appréhender de façon quasi complète le transcriptome de la plante en interaction avec le nématode. Ces données permettraient de vérifier les voies métaboliques qui sont modifiées chez la plante. En parallèle, il serait intéressant de mesurer les taux d'hormones (AS, AJ) produits dans les racines en interaction avec le nématode pour vérifier l'hypothèse de leur implication dans la résistance du caféier aux *Meloidogyne spp.*

De plus, ces données pourraient fournir des indications importantes sur les modifications du métabolisme de la plante qui pourraient être dues à une manipulation du nématode. On sait que l'activité d'effecteurs du nématode permettrait au parasite de contourner les mécanismes de défense de la plante et de détourner le métabolisme de la cellule végétale à son profit (Davis et al., 2008). Le génome de *M. incognita* a été séquencé (Abad et al., 2008). Les connaissances qui seront bientôt générées sur les effecteurs de virulence du nématode (Bellafiore *et al.*, 2008) fourniront certainement des perspectives intéressantes pour entreprendre des études plus fines de l'interaction caféier / *M. incognita*. A l'IRD, la caractérisation de certains de ces effecteurs dans l'interaction riz - *M. incognita* est en cours, et les données qui seront issues de ces travaux pourraient être étendues à l'interaction avec le caféier pour vérifier si les stratégies d'infection du nématode sont conservées sur les différentes espèces que *M. incognita* infecte.

La mise en évidence d'une réaction de type RH dans l'interaction caféier - *M. incognita* suggère que, comme pour *M. exigua*, la résistance spécifique du caféier pourrait être contrôlée par un gène de résistance majeur. En effet, la résistance aux nématodes gouvernée par des gènes *R* s'exprime généralement par une RH (Williamson, 1999 ; Anthony et al., 2005; Pegard et al., 2005; Proite et al., 2008). Des croisements ont été réalisés à partir du génotype UFV 408-28, et des études génétiques sont en cours qui permettront de vérifier si le déterminisme génétique de la résistance est de type monogénique dominant. Comme pour la variété IAPAR59 résistante à *M. exigua* (Noir et al., 2003), le génotype UFV 408-28 est issu d'un croisement avec un Hybride de Timor, et le caractère de résistance à *M. incognita* est certainement hérité de *C. canephora*. Le séquençage du génome de *C. canephora* qui est en cours pourra faciliter le clonage du gène d'ici quelques années.

Les résultats que nous avons obtenus sur la transformation génétique du caféier nous permettent désormais d'envisager l'obtention de plantes génétiquement modifiées et d'étudier la fonction des gènes que nous avons caractérisés. Au début de ce travail de thèse, la transformation génétique du caféier était en cours de mise au point dans plusieurs laboratoires. Nos travaux sur les fruits de *C. arabica* transformés avec le gène *uidA* prouvent qu'une telle approche est réalisable malgré les délais de régénération puis de floraison du caféier. Par ailleurs, il est désormais possible d'obtenir assez rapidement des racines de caféier transformées par *A. rhizogenes* (Alpizar et al., 2008), ce qui permet d'obtenir des données sur le rôle d'un gène dans l'interaction avec les nématodes, en système homologue. Dans un premier temps, pour sélectionner quelques gènes candidats, la plante modèle *A. thaliana* pourrait être utilisée. Des approches de génétique reverse pourraient être utilisées pour les gènes bien caractérisés et pour lesquels il existe des mutants chez *A. thaliana*. Récemment, la complémentation du mutant *ndr1-1*, impliqué dans la signalisation de la résistance chez *A. thaliana*, par le gène de caféier *CaNDR1* a été entreprise avec succès à l'IRD (Cacas et al., 2009). De même, la fonction du gène *CcETR1* de *C. canephora* dans la perception de l'éthylène a été montrée en utilisant la plante *A. thaliana* (Bustamante et al., 2007).

Les résultats obtenus dans ce travail pourront avoir d'intéressantes répercussions appliquées. Ils devraient, en particulier, conduire à identifier des gènes impliqués dans l'expression de la résistance, et pouvant être utilisés comme marqueurs de sélection efficaces dans les programmes d'amélioration. A court terme, la mise au point de marqueurs moléculaires fournira des outils complémentaires aux approches de génétique

classique pour la sélection de variétés de *C. arabica* résistantes et permettra de mieux valoriser les ressources génétiques caféières. A plus long terme, ces travaux produiront des éléments pour envisager de nouvelles stratégies de lutte, dans une perspective de durabilité de la résistance des caféiers aux parasites.

Au-delà de la caractérisation de gènes spécifiques des réponses de sensibilité ou de résistance, utilisables pour l'amélioration génétique du caféier, notre étude apporte également des données fondamentales pour la compréhension des mécanismes de résistance des plantes aux nématodes. Il n'existe en effet pas de résistance aux *Meloidogyne* spp. chez la crucifère modèle *A. thaliana*. Ainsi, bien que le caféier soit un modèle d'étude difficile, les études menées sur *C. arabica* contribueront à améliorer, de façon significative, les connaissances sur les mécanismes de résistance des plantes à ces parasites.

INTRODUÇÃO

1.1. O café

Produzido principalmente por países de terceiro mundo e consumido mundialmente, o café é cultivado em grande parte por pequenas e médias propriedades em diferentes países tropicais (Caixeta e Teixeira, 1999). Estatísticas estimam que cerca de 4 milhões de toneladas de café verde sejam produzidas por ano (ABIC, 2009). O mercado de comercialização do café, assim como de outros produtos agrícolas, tem altas e baixas periódicas que dificultam previsões e planejamentos em relação à economia (Osório, 2005). Desta forma, qualquer ganho tecnológico ou comercial que aumente a diversificação dos produtos do café e seus derivados, ou que reduza os custos de produção e aumente a produtividade pode auxiliar na estabilização das crises do mercado. Aliada aos interesses econômicos, está aumentando a tendência em considerar as questões do impacto da cultura cafeeira no meio ambiente, o que implica em maiores investimentos em tecnologias de processos que minimizem os riscos ecológicos (ICO, 2010). Também é crescente a preocupação com a qualidade e a diversificação do produto para a criação ou conquista de novos nichos de mercado (Viniegra-González, 2000). Por fim, o interesse nos aspectos médicos e sanitários incentiva a geração de novos produtos. Para atender a demanda de consumidores cada vez mais exigentes e da competição de mercado, existe a necessidade em aumentar o conhecimento científico das plantas de cafeeiro (*Coffea* spp.) e outras espécies do gênero para o desenvolvimento de metodologias visando o melhoramento genético de variedades.

1.1.1. Importância sócio-econômica

O café é uma bebida apreciada mundialmente e que atualmente constitui a segunda *commodity* mais valorizada no mundo. A cadeia produtora do café movimenta anualmente mais de 13 bilhões de dólares no mercado internacional (ICO, 2009). Aproximadamente 130,7 milhões de sacas (60kg) foram produzidas em 2008/9, gerando milhões de empregos nos países tropicais produtores.

No contexto da economia brasileira, o café é um produto agrícola tradicional que gera mais de 7 milhões de empregos diretos e indiretos (Embrapa Café, 2004). As primeiras mudas e sementes introduzidas no Brasil foram plantadas em Belém do Pará por Francisco de Mello Palheta em 1727. O plantio seguiu em 1774 para o Rio de Janeiro e alcançou os estados de São Paulo e Minas Gerais em 1825. Com as primeiras

exportações iniciou-se o ciclo do café, que tem gerado diversas riquezas para o Brasil desde então (Instituto Brasileiro do Café, 1985). O Brasil é o maior produtor de café do mundo (Abic, 2009). Na última safra, em 2008, foram produzidas 46 milhões de sacas. Também é o maior exportador, responsável por 34% do mercado internacional, o que corresponde a 4,7 bilhões de dólares. Aproximadamente 90% do volume de exportação corresponde ao café verde. Os três maiores importadores do café brasileiro são a Alemanha, os Estados Unidos e a Itália.

O maior interesse econômico internacional é representado pela espécie *Coffea arabica*, que corresponde a 74% da área plantada no Brasil. Entretanto, as cultivares do tipo Arábica são altamente suscetíveis a pragas e doenças. As pragas que atacam o cafezal adquirem graus de importância diferentes, que variam de acordo com as regiões cafezeiras do país produtor. De maneira geral, as principais perdas atuais de produtividade e qualidade em praticamente todas as áreas de cultivo são causados por broca (*Hyphothenemus hampei*), bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastrix*) e nematóides (*Meloidogyne* spp.).

A safra brasileira de café sofre grandes perdas causadas por nematóides. Segundo o Dr. Jaime M. dos Santos, professor da Unesp, estudos da Sociedade Brasileira de Nematologia mostram que houve danos em 1998/9 que causaram a perda de 15% da safra, correspondente à R\$ 961,6 milhões. As perdas causadas pelos nematóides chega a limitar o plantio em certas regiões (Zambolin et al., 2003). Existe grande interesse econômico no melhoramento genético do cafeeiro ao estresse biótico causado pelos nematóides (Etienne et al., 2002; Bertrand & Anthony, 2008).

1.1.2. Aspectos botânicos

As plantas de cafeeiro pertencem ao gênero *Coffea*, que por sua vez faz parte da família Rubiaceae, considerada cosmopolita com distribuição nas regiões tropicais e que abrange mais de 10 mil espécies agrupadas em 630 gêneros. De acordo com classificação recente de Bridson e Verdcourt (1988) e Bridson (1994), os cafeeiros foram reunidos em dois gêneros: o *Psilanthus* Hook e *Coffea* L., os quais diferem, basicamente, por particularidades apresentadas nas estruturas florais. O gênero *Coffea* é representado por mais de 100 espécies no subgênero *Coffea* e por sete espécies no subgênero *Baracoffea* (Davis et al, 2006). As espécies plantadas comercialmente para a produção da bebida, que são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. No Brasil as rubiáceas são muito bem representadas, com cerca de 1.500 espécies em 130 gêneros

(Souza & Lorenzi, 2005). Outros representantes de significativa importância são *Genipa americana* (jenipapo) e *Calycophyllum spruceanum* (pau-mulato), e no paisagismo os gêneros *Mussaenda*, *Ixora*, *Gardenia* e *Pentas*.

A classificação taxonômica completa do cafeeiro segue o seguinte agrupamento: *Eukaryota*; *Viridiplantae*; *Streptophyta*; *Embryophyta*; *Tracheophyta*; *Spermatophyta*; *Magnoliophyta*; *eudicotyledons*; *core eudicotyledons*; *asterids*; *lamiids*; *Gentianales*; *Rubiaceae*; *Ixoroideae*; *Coffeae*; *Coffea*.

As plantas de café do tipo Arábica são de uma espécie (*C arabica*) nativa de florestas tropicais africanas, desenvolvendo-se sob a forma de árvores pequenas em ambiente sombreado de sub-bosque, com temperaturas amenas e elevada umidade relativa (Narasimhaswamy, 1968). O centro de origem é uma região restrita, localizada entre o Sudoeste da Etiópia, Sudeste do Sudão e Norte do Quênia que ocorre entre 8 a 12° LN, e cuja altitude varia de 1.000 a 3.000 m (Carvalho, 1946).

1.1.2.1. Descrição morfológica

Em geral, o cafeeiro é um arbusto de crescimento contínuo, com dimorfismo de ramos (Carvalho e Krug, 1950; Rena & Maestri, 1986), que atinge 2 a 4m de altura, conforme as condições climáticas da região. Possui caule cilíndrico, lenho duro, branco amarelado e dois tipos de ramos: ortotrópico (do grego orthós: reto, normal) e plagiotrópicos (do grego plágios: oblíquo, transversal). A raiz principal do cafeeiro é pseudopivotante e amplamente ramificada na camada superior do solo (Carvalho e Mônaco, 1965). As raízes axiais (4 a 8) saem da pivotante, se ramificam e crescem predominantemente no sentido descendente até 3 m de profundidade. As raízes verticais por sua vez se distribuem no sentido horizontal sob a projeção do dossel. As raízes laterais superficiais crescem próximas e paralelas à superfície do solo e podem ultrapassar 2 m de comprimento. As raízes alimentadoras são curtas, com diâmetros inferiores a 1,0 mm, esbranquiçadas e possuem pêlos absorventes, numa extensão de 3 a 5 mm à partir do ápice. Essas raízes respondem pela absorção de 75 % das necessidades de água e nutrientes organo-minerais do cafeeiro.

As folhas do cafeeiro possuem pecíolo curto, lâmina elíptica ou elípticolanceolada, glabra, verde-luzidia na página superior ou adaxial e verde clara na página inferior ou abaxial (Dedecca, 1957). As margens foliares são ligeiramente onduladas, medindo 90 a 180 mm de comprimento e 30 a 70 mm de largura; nervação reticulada, nervura mediana desenvolvida, com 9 a 12 nervuras secundárias de ambos os

lados; bordas inteiras, levemente onduladas. As folhas são opostas e cruzadas no caule (ramo ortotrópico), enquanto nos ramos plagiotrópicos são opostas e no mesmo plano, as quais quando novas apresentam coloração bronzeada ou verde clara (Aguiar, 2001). Os estômatos estão localizados na posição abaxial encontrando-se, em média, 200 células estomáticas por mm² (Voltan et al., 1992). O mesófilo foliar é constituído por uma única camada de parênquima paliçádico, logo abaixo da epiderme superior, rico em cloroplastos e grãos de amido. Na seqüência aparece o parênquima lacunoso, rico em cloroplastos, formada por 10 a 12 camadas de células, distribuídas de maneira irregular.

As flores do cafeeiro possuem pedicelo curto, estão agrupadas em glomérulos axilares e varia de duas a vinte flores por axila foliar (Carvalho e Mônaco, 1965). O ovário é ínfero, bilocular e, raramente, trilocular, com um óvulo ou oosfera em cada loja. As inflorescências surgem nas gemas seriadas dos ramos plagiotrópicos (Rena e Maestri, 1985). As estruturas das flores do cafeeiro: ovário, corola, estilo-estigma e filete que sustenta a antera. A superfície estigmática encontra-se no ápice do estilete, onde ocorre a polinização pela deposição de grãos de pólen. No momento da antese, 90 a 99 % dos óvulos já foram fecundados (autofecundação). O pólen germina, emitindo o tubo polínico, entre 48 a 68 horas (Mendes, 1961).

O fruto de *C. arabica* é simples, derivado de um ovário, classificado como drupa, carnosos e contém um caroço. Morfologicamente o fruto possui um pedúnculo curto, oval e elíptico, com superfície lisa e brilhante, sendo verde quando imaturo, podendo evoluir para vermelho ou amarelo após a maturação (Carvalho e Mônaco, 1965). As sementes são oblongas e plano-convexas, uma em cada loja do ovário. O endosperma da semente de café é córneo e esverdeado, encoberto por um envoltório delicado – a película prateada. O embrião (2 mm). Localiza-se na base do endosperma e é constituído por um eixo hipocotiledonar curto com duas folhas cotiledonares cordiformes justapostas (Carvalho e Mônaco, 1965). O desenvolvimento do fruto requer de 6 a 8 meses desde a antese até a maturação.

1.1.2.2. Características genéticas

A espécie *C. arabica* é um alotetraploide natural com 11 conjuntos de cromossomos ($2n=4x=44$). Todas as outras espécies do gênero *Coffea* são diploides ($2n=22$ chromosomes) de fecundação cruzada obrigatória, com exceção de *C. heterocalyx* e *C. anthonyi* Stoff. & F. Anthony. Por serem autógamias, as cultivares de *C. arabica* são propagadas por mudas à partir de sementes.

A base genética nas cultivares de Arábica é pouco diversificada (Berthaud e Charrier, 1988), devido à baixa taxa de fecundação cruzada (5 a 10 %), apesar da ocorrência de mutações e da existência de cruzamentos naturais (Krug et al., 1939). A diversidade global em *C. canephora*, *C. congensis* e *C. liberica* é bastante alta comparada à *C. arabica*, que tem a diversidade mais baixa mesmo que os representantes selvagens desta espécie sejam mais diversos do que os cultivados (Cubry et al. 2008).

Os dados sobre a genética do cafeeiro são poucos e de difícil acesso, considerando-se as ferramentas genéticas disponíveis para plantas-modelo ou outras culturas bem estudadas. Sabe-se que o genoma de *C. arabica* é estimado em $2C = 2.5$ pg (Bennett & Leitch 1995), enquanto que o tamanho haplóide de *C. arabica* é de aproximadamente 1,200 Mb (Cros et al., 2005). Os início do desenvolvimento de mapas de ligação gênica para *C. arabica* foi descrito por Pearl et al. (2004). Recentemente foi descrita a sequência cloroplastídica de *C. arabica* (155189 pb), composta de 130 genes (Samson et al. 2007).

Em relação à genômica de *C. arabica*, apenas alguns genes e sequências regulatórias foram identificados e clonados até o momento (Marraccini et al., 1999; Marraccini et al., 2003; McCarthy et al., 2007; Petitot et al., 2008). Por outro lado, os dados de sequências gênicas expressas (EST) estão sendo enriquecidos por projetos como o CafEST (Vieira et al., 2006), onde 130.792 ESTs de *C. arabica* foram identificados. Outros 1.303 EST são públicos e disponíveis no banco do NCBI, que incluem sequências de tecidos foliares interagindo com o fungo causador da ferrugem (Fernandez et al. 2004).

1.1.3. Recursos genéticos e melhoramento

Os recursos genéticos potencialmente existentes dentre as outras espécies de *Coffea* (Davis et al., 2006) são de difícil introgressão em *C. arabica*, pois esta é a única espécie autógama e alotetraplóide do gênero. Baixa diversidade genética (Lashermes et al., 1999), especiação relativamente recente (Maurin et al., 2007) e a base genética estreita das variedades comerciais (Pearl et al., 2004) são aspectos limitantes do melhoramento tradicional de *C. arabica*. Na realidade, duas populações de base, conhecidas como Typica e Bourbon são responsáveis pela maioria das cultivares de *C. arabica* plantadas atualmente (Anthony et al., 2002).

A busca de fontes de resistência intraespecíficas em acessos selvagens de *C. arabica* da Etiópia revelou baixos índices de resistência aos estresses bióticos (Anthony

et al. 1999). Os programas de melhoramento tradicionais geralmente utilizam as espécies *C. canephora* ou *C. racemosa* como fontes de resistência, inclusive para os RKN.

A necessidade de novas cultivares resistentes aos RKN deverá ser agravada em um futuro próximo, de acordo com as previsões de influência das mudanças climáticas sobre a cafeicultura (Ghini *et al.*, 2008). Dentre os métodos sem uso de químicos disponíveis, o desenvolvimento de cultivares resistentes é o que oferece melhor eficiência e segurança.

A espécie *C. canephora* possui genes de resistência às principais pragas e doenças de cafeeiro, bem como aos nematóides *M. exigua*, *M. paranaensis*, *M. incognita* e *P. coffeae* (Bertrand *et al.*, 2001). As características de *C. canephora* são mais facilmente introduzidas em variedades de *C. arabica* através de cruzamentos com os híbridos interespecíficos naturais, como o Híbrido de Timor (HT), que possui 44 cromossomos e apresenta auto-fecundação (Lashermes *et al.*, 2000). Assim, os acessos derivados de cruzamentos com HT e com *C. canephora* podem fornecer resistência aos nematóides, da mesma forma como foi buscada a resistência à ferrugem do cafeeiro (Rodrigues, 1975 ; Kushalappa & Eskes, 1989 e Mahé *et al.*, 2007).

Várias linhagens derivadas de HT mostraram níveis de resistência à *M. exigua* similares aos observados em *C. canephora* (Bertrand *et al.*, 1997; Gonçalves & Pereira, 1998; Silvarolla *et al.*, 1998; Bertrand *et al.*, 2001; Fazuoli *et al.*, 2006). Estudos de infecção com a cultivar resistente 'IAPAR9' demonstraram a ocorrência de morte celular localizada com acumulação de compostos fenólicos ao redor dos nematoides (Anthony *et al.*, 2005). O fenótipo de resistência ao *M. exigua* é fortemente associada à presença do locus contendo o gene *Mex-1* (Noir *et al.*, 2003), que apresenta expressão dominante incompleta (Alzipar *et al.*, 2007).

Resultados promissores de melhoramento para resistência ao *M. paranaensis* foram encontrados recentemente na progênie que deu origem à cultivar IPR-100 (Sera *et al.*, 2007). O gene responsável por essa resistência provavelmente foi introgridido do genitor *C. canephora* do genótipo Catucaí. A resistência ao *M. paranaensis* em *C. canephora* está sendo reavaliada, pois o diagnóstico deste RKN foi confundido com o de *M. incognita* até 1996 (Carneiro *et al.*, 1996; Carneiro *et al.*, 2004).

Diversos estudos foram conduzidos sobre a reação de genótipos *C. arabica* e de *C. canephora* às quatro raças de *M. incognita* (Bertrand & Anthony, 2008; Campos & Villain, 2005; Silva & Campos, 2008). Foram descritos acessos de *C. canephora*

resistentes à raça 1 (Gonçalves et al., 1996). Algumas progênies de HT e de acessos selvagens de *C. arabica* mostraram redução efetiva da reprodução de uma população de *M. incognita* do Brasil de raça não especificada (Hernandez et al., 2004). A resistência à raça 3 não foi encontrada em acessos de *C. arabica* (Lordello & Lordello, 1987; Gonçalves and Ferraz, 1987).

1.2. Nematoides fitoparasitas do cafeeiro

Os nematóides são os animais multicelulares que colonizam a maior variedade de nichos ecológicos (Hunt et al., 2005). O modo de vida das espécies é bastante diverso, podendo ser de vida livre, predatório ou parasita. Os nematoides fitoparasitas se distinguem dos outros nematoides do solo por possuírem no aparelho bucal uma estrutura pontiaguda especializada para a penetração nos tecidos vegetais. Essa estrutura recebe denominações diferentes nos três principais grupos: estilete em *Tylenchida*, odontoestilete em *Dorylaimida* e onquioestilete em *Triplonchida*.

A ordem *Tylenchida* inclui o gênero *Meloidogyne*, cujas espécies são conhecidas como os nematóides-da-galha (Root-Knot Nematodes – RKN). As espécies do gênero *Meloidogyne* são parasitas biotróficos de uma ampla gama de hospedeiros que abrange a maioria das plantas floríferas (Trudgill, 1997). Dentre os fitonematóides, o gênero *Meloidogyne*, por sua ampla disseminação e alta capacidade destrutiva, tem sido considerado o mais importante na cafeicultura mundial (Campos et al., 1997). *M. incognita* é uma espécie ubíqua de RKN considerada como “o fitopatógeno mais danoso do mundo” (Trudgill & Blok, 2001).

Os RKN atacam diversas culturas economicamente importantes (tomate, cenoura, feijão, algodão, soja, tabaco, uva) e são nematoides responsáveis pelos maiores danos em cafeeiro. Atualmente 17 gêneros de nematoides são encontrados nas plantações brasileiras (Carneiro & Cofcewicz, 2008). Prejuízos menores causados por *Pratylenchus brachyurus* foram relatados no estabelecimento de novas plantações em São Paulo e Minas Gerais (Lordello, 1984) e por *P. coffeae* nos estados de São Paulo e Pernambuco. Alguns dos outros gêneros ocasionalmente detectados em plantações de são: *Aorolaimus* sp., *Mesocriconema* sp., *Trichodorus* sp. e *Xiphinema* sp. (Souza, 2008).

1.2.1. Principais características do gênero *Meloidogyne*

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* (RKN) são tilenquídeos, animais que possuem o corpo de simetria bilateral e coberto por uma cutícula (Hunt et al., 2005). O modo de vida destes fitopatógenos é endoparasítico obrigatório e compreende quatro estádios juvenis (Williamson & Hussey, 1996). A forma migratória do nematoide penetra inteiramente na raiz, onde se fixa no tecido vegetal para iniciar a fase sedentária e reprodutiva (Bird & Kaloshian, 2003).

O ciclo de vida dos RKN se completa em torno de 25 dias (25-30°C) e apresenta fases de vida livre e parasítica (figura 1). Os ovos são postos em uma matrix de massa gelatinosa secretada pela fêmea (figura 1 a), podendo ser exposto ao solo ou permanecer dentro da raiz da hospedeira. A eclosão dos ovos depende de condições ambientais favoráveis, mas independe da presença de plantas hospedeiras. As formas juvenis são vermiformes, sendo que o primeiro estágio (J1) passa para o segundo estágio (J2) ainda dentro do ovo (fig. B).

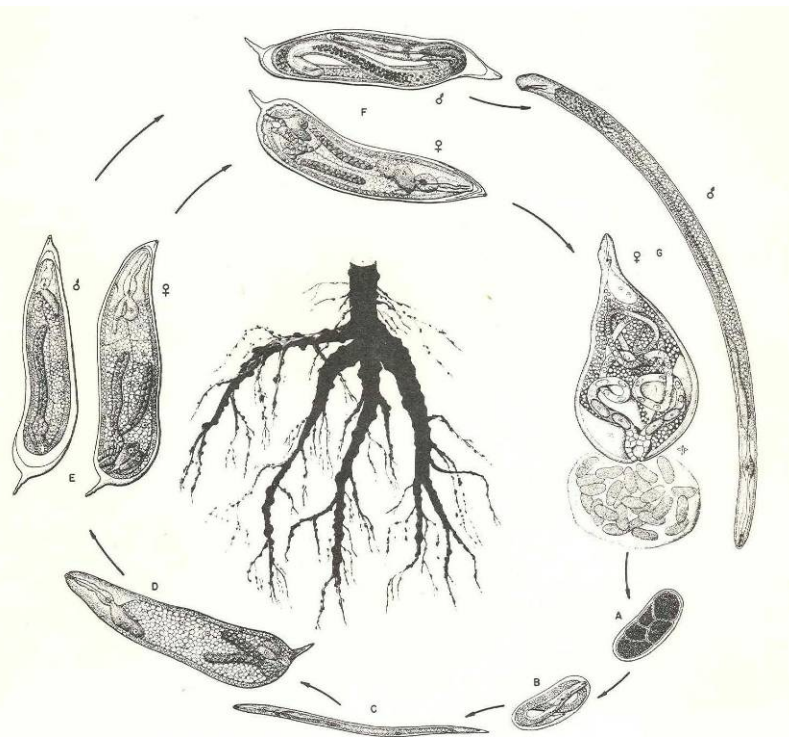


Figura 1: ciclo de vida do nematoide da galha, compreendendo as fases sedentária e de vida livre, com destaque para ovo (a), ovo contendo o juvenil 1 (b), juvenil 2 (c), juvenil 3 (d), início da diferenciação sexual (e), dimorfismo sexual (f), fêmea com massa de ovos e macho adulto (g).

Na fase de vida livre, os J2 (0,3-9,5 mm) requerem uma quantidade mínima de água que favoreça sua locomoção. A estrutura do solo influencia no movimento e capacidade de penetração das larvas J2. Em geral, os solos arenosos apresentam as

melhores condições de infecção. Vários fatores podem atrair os RKN até 1m distantes as raízes da planta (Hunt et al., 2005). Os J2 (figura 2) penetram a zona de elongação do ápice radicular ou pontos de brotamento de novas raízes laterais. Com o auxílio do estilete e provavelmente de enzimas hidrolíticas salivares, a larva J2 se desloca por entre as células do córtex radicular até atingir o ápice, onde fazem a volta no meristema e migram para a zona de diferenciação do cilindro vascular. Estudos feitos em raízes de *Arabidopsis* com anticorpos da matrix extracelular vegetal e da cutícula de *M. incognita* confirmaram a rota dos J2 tanto *in vivo* como *in vitro* (Gravato Nobre et al., 1995).



Figura 2 : Larva infectiva de *Meloidogyne* no estágio juvenil 2 recém-eclodida (Nomarski micrograph) (*Meloidogyne incognita*) (Dr. David M. Bird, NC State University, Dept. of Plant Pathology).

Ao atingir a zona de divisão celular do parênquima vascular, o J2 seleciona um pequeno número de células para formar seu sítio de nutrição. O sofisticado processo de estabelecimento desta estrutura de alimentação foi revisado por Fuller et al. (2008). Através do estilete (10-24 μm), secreções das glândulas salivares do nematoide são injetadas pela parede celular e induzem as células a uma série de transformações morfológicas e alterações de metabolismo, que passam a ser denominadas células-gigantes. A proliferação nuclear (cariocinese) das células gigantes ocorre por sucessivas divisões mitóticas incompletas (mitose acitocinética). Consequentemente, cada célula

tem várias cópias do genoma, o que permitem a síntese de grande quantidade de proteínas a serem ingeridas pelo RKN. As alterações das células-gigantes causam hiperplasia localizada nas raízes afetadas, formando as galhas características dos RKN. As galhas ocorrem devido à hipertrofia das células gigantes do tecido vascular e à hiperplasia do córtex. A infecção massiva resulta na coalescência de várias galhas individuais em grandes protuberâncias (Noe, 2004). Os danos por lesões nos cilindros vasculares decorrem da migração pelos vasos das formas infectivas (J2) ou pelo desvio de nutrientes causado pela instalação dos sítios de alimentação das formas sedentárias. (Sijmons, 1993).

Ao se alimentar, a larva aumenta de diâmetro passando aos estádios J3 (figura 1 e) e em seguida J4 (figura 1 f). Ocorre dimorfismo sexual, apesar dos RKN serem partenogênicos. Assim, o macho não possui função na reprodução. Os machos são vermiformes enquanto que as fêmeas possuem forma globosa. A taxa de diferenciação em machos é maior quando as condições são desfavoráveis para o desenvolvimento da larva.

A fêmea (figura 1 g) apresenta de 0,4-1,3 mm de comprimento e possui glândulas retais que produzem a matrix gelatinosa da massa de ovos. O aumento de peso relatado em *Vitis vinifera* entre a larva J2 de *M. incognita* e a fêmea adulta com a massa de ovos é de 250 vezes (Melakeberhan & Ferris, 1988).

1.2.2. Incidência no cafeeiro

Os RKN constituem o maior problema fitossanitário para a cultura do café pelos grandes prejuízos que causam e pela dificuldade de controle (Morais et al., 1977). De fato, muitas propriedades continuam a ser infestadas por esses fito-parasitas, os quais são identificados tardiamente pelo manifesto dos danos causados nas raízes e parte aérea da planta, geralmente após alguns anos de infestação e ampla disseminação na lavoura. As espécies mais agressivas são *M. incognita* Chitwood e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos and Almeida, 1996. Juntos, *M. incognita* e *M. paranaensis* (fig. 4b e c) causam sérios danos nas plantações de café, destruindo mais de 80% do sistema radicular após o quinto ano de plantio (Bertrand & Anthony, 2008). O ciclo de vida do RKN é de 32-42 dias e os sintomas provocados são clorose foliar, redução de crescimento, senescência foliar, declínio geral do vigor, eventualmente, a morte da planta (Campos & Villain, 2005).



Figura 3: campo de plantação de café infestado com *M. paranaensis*. (Foto cedida por L. Villain)

O patossistema café-*Meloidogyne* na América Latina teve origem na cultura em larga escala. A hipótese mais plausível para a compatibilidade dessa interação é o surgimento de populações de RKN adaptadas ao cafeeiro como nova planta hospedeira (Bertrand & Anthony, 2008). O primeiro relato de ataque de nematóides nos cafezais brasileiros foi feito em 1892 por Emílio A. Göldi, com a descrição da espécie *M. exigua* que dizimava os cafeeiros da província do Rio de Janeiro. Em consequência, a cultura foi substituída por cana-de-açúcar, que não é hospedeira deste nematóide. As devastadoras perdas dos produtores de café destas áreas, principalmente no Rio, Paraná e oeste de São Paulo, foram fatores determinantes para a migração da cafeicultura nacional nas últimas décadas para novas regiões não infestadas, como nos estados de Goiás, Mato Grosso e Bahia. Recentemente foram identificados novos focos no Triângulo Mineiro que estão causando morte de plantas em grandes áreas (Dutra, 2003). Atualmente, as maiores áreas de plantação estão situadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Paraná Bahia e Rondônia (Abic, 2009).

No Brasil, as espécies *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* Goldi, 1887 são as mais importantes nas principais regiões produtoras do país (Randig *et al.*, 2004). Outras espécies que podem eventualmente danificar o cafeeiro são *M. coffeicola* Lordello & Zamith, *M. hapla* Chitwood and *M. javanica* (Treub) Chitwood A raça 1 de *M. incognita* é a mais frequente de maneira geral, seguida pelas raças 2 e 3 no Paraná e em São Paulo e raramente a raça 4 (Kryzanowski *et. al.* 2001, Lordello *et al.*, 2001). No noroeste do Paraná a espécie *M paranaensis* foi constatada em 37,8% das amostras obtidas de cafezais. Em Minas Gerais as maiores perdas ocorrem pelo ataque de *M. incognita* e *M. exigua*, sendo este último encontrado em 26% das propriedades. No Rio

de Janeiro, Bahia e Espírito Santo predomina *M. exigua* em arábica e no Espírito Santo *M. incognita* em *C. canephora* (Dutra, 2003).

O RKN *M. incognita* causa os efeitos mais devastadores (figura 4b), desde o primeiro registro de incidência em São Paulo, quando milhões de plantas infectadas foram substituídas por outras culturas (Lordello & Mello Filho, 1970; Curi et al., 1977). O ataque de *M. exigua* (figura 4a) induz numerosas galhas e causa 10 a 20% de redução da produtividade devido ao depauperamento da planta (Bertrand *et al.*, 1997). Levantamentos nas áreas de produção revelaram que *M. paranaensis* dissemina-se rapidamente nas plantações brasileiras (Carneiro & Almeida, 2000; Lordello & Lordello, 2001). O desenvolvimento do *M. paranaensis* (figura 4 c) causa entumescimento e rachaduras no córtex radicular, mas não produz galhas típicas, sendo que a massa de ovos produzida permanece sob o tecido epidérmico (Carneiro *et al.*, 1996, 2008).



Figura 4 :raízes de cafeeiro infectadas com nematoides da galha : *M. exigua* (a), *M. incognita* (b) e *M. paranaensis* (c) (foto cortesia de Luc Villain).

1.2.3. Controle da meloidoginose

As medidas preventivas de controle dos RKN propostas por Goldi no século XIX são as mais recomendadas até os dias atuais. As recomendações fitossanitárias de exclusão visam essencialmente: i) evitar a contaminação de novas áreas desde a formação das mudas, e ii) erradicar as plantações contaminadas, fazendo em seguida rotação de culturas anuais por 8 a 10 anos antes de plantar o café novamente (Ferraz, 2008).

Medidas de contenção evitam a disseminação dos nematóides, que ocorre a longas distâncias principalmente pelo transporte de mudas infestadas. Dentro de uma mesma propriedade esta disseminação pode ocorrer por veículos e implementos contaminados ou mesmo pela irrigação (Krzyzanowski, 2000).

A erradicação dos nematídeos por controle químico tem baixa eficiência nas doses de campo e é dificultada pelas características de distribuição no solo em reboleiras (figura 5). Além disso, esta prática representa maiores gastos para o produtor no trato cultural do cafezal, bem como conseqüências indesejáveis para o meio ambiente. A utilização de nematicidas fumigantes extremamente tóxicos foi banida, sendo atualmente restrita a produtos granulados de contato direto ou de efeito sistêmico (Campos & Silva, 2008).

Como os nematóides possuem muitas plantas hospedeiras, cultivadas ou não, o controle por rotação de culturas fica dificultada (Silvarolla et al., 2000). Algumas espécies permitem o replantio de café Arábico em solos anteriormente infestados após um período rotação de culturas, da seguinte forma: em um ano para *M. exigua* com feijão comum, soja, sorgo, *Crotalaria spectabilis* Roth, *Stilozobium aterrimum* Piper e Tracy e *Panicum maximum* Jacq. (Morais et al., 1977); por período maior que um ano para *M. incognita* e *M. paranaensis* com *Arachis hypogea* L., *Ricinus communis* L., *Stylobium deeringianum* Bort. e *C. spectabilis* (Carneiro & Carneiro, 1982) ou *Arachis pintoi* Krapov e W.C. Gregory (Santiago et al., 2001).



Figura 5: fotografia aérea de lavoura cafeeira infestada com *M. paranaensis*. A área de maior dano causado pelo nematoide está circundada em amarelo (foto cortesia de Luc Villain).

Uma alternativa de controle dos RKN é a utilização de porta-enxertos resistentes para as cultivares de *C. arabica* (Campos & Silva, 2008). Entretanto, deve ser considerado o aumento do custo de produção das mudas enxertadas, além do que a estaquia interespecífica pode comprometer a produtividade e a qualidade do fruto de *C. arabica* (Bertrand et al., 2001). Os programas de melhoramento de porta-enxertos são focalizados em *C. canephora*, *C. congensis* A. Froehner e *C. dewevrei* De Wild e T. Durand pelas características de seus sistemas radiculares e fenótipos de resistência. No

Brasil, devido à grande distribuição e alta agressividade de *M. incognita* no estado de São Paulo, foi desenvolvida a variedade ‘Apoatã’ (Fazuoli, 2002), que apresenta imunidade ao *M. exigua* e resistência incompleta ao *M. incognita* e *M. paranaensis*. O uso dessa variedade de porta-enxerto permitiu a plantação em solos já infestados de RKN e a prevenção de perdas em novas plantações (Campos, 1977).

É preciso destacar que o uso de nematicidas ou plantas não-hospedeiras não gera melhoras substanciais em plantações já estabelecidas de café infestadas por *M. incognita* (Jaehn, 1984). De qualquer forma, a manutenção e adubação correta da cultura podem adiar a necessidade de erradicação das plantas afetadas.

1.1. Interações

1.1.1. Interação planta-patógeno

As plantas estão constantemente expostas a diversos microrganismos que ameaçam seu crescimento e propagação. As relações planta-patógeno são caracterizadas por um complexo de interações de ataque, defesa, contra-ataque e contra-defesa. O sucesso evolutivo das plantas reside na sua habilidade em detectar e reagir aos patógenos potenciais. Nas plantas foram desenvolvidos sistemas de reconhecimento do patógeno, enquanto que nos patógenos a evolução fez surgir efetores capazes de desativar a defesa das plantas e toxinas que ativam a morte celular na hospedeira. As interações estudadas atualmente são resultado de longos períodos de coevolução antagonística. Assinaturas de coevolução podem ser encontradas em diversos níveis de análises genéticas e moleculares (Stukenbrock e McDonald, 2009).

O sistema imunitário vegetal apresenta sofisticadas formas e mecanismos de defesa à doenças, que contam com a imunidade inata de cada célula e nos sinais móveis que emanam dos locais infectados (Shah, 2009). Os genes envolvidos nos processos-chave da infecção suscitam grande interesse como alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo de pragas, doenças e nematóides.

No modelo clássico de interação planta-patógeno gene-a-gene proposto por Flor (1971), a resistência ocorre apenas quando a planta possui um gene *R* de resistência dominante e o patógeno expressa o gene *Avr* dominante de avirulência (figura 1). Os receptores específicos (PRR) fazem parte de proteínas de resistência (*R*), que são altamente polimórficas e agem principalmente no meio intracelular. As proteínas *R* desencadeiam a resistência específica contra patógenos hemi ou biotróficos que precisam de tecidos vivos para sua proliferação.

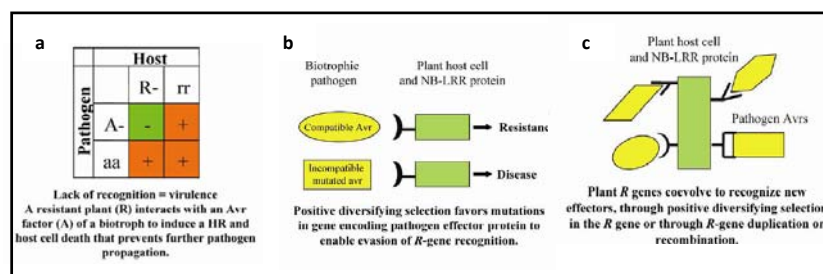


Figura 1: Interação gene-a-gene *Avr-R*: (a) base genética; (b) mecanismos moleculares e (c) evolução molecular (Stukenbrock e McDonald, 2009).

O rápido reconhecimento de um patógeno potencial é a condição necessária para provocar as respostas de defesa (Dangl & Jones, 2001). As plantas reconhecem alguns

metabólitos derivados dos patógenos que podem desencadear as respostas de defesa vegetal. Esses fatores indutores de defesa (elicitores) são essencialmente antígenos derivados dos fitoparasitas.

Com base nos conceitos e resultados atuais sobre a imunidade vegetal, as formas e mecanismos podem ser agrupadas do ponto de vista do reconhecimento do microrganismo invasor: (i) não-específica (geral), que é efetiva contra várias espécies ou várias linhagens ou raças, ou biovars de uma mesma espécie; (ii) específica, em que uma cultivar ou genótipo de planta é resistente à infecção de uma ou poucas linhagens ou raças de uma mesma espécie de patógeno.

A divisão proposta por Király et al. (2007), detalhada na tabela 1, classifica a resistência como inata e adquirida. Dentro da resistência inata, são propostas duas subdivisões, quais sejam: não-específica, ou geral, e específica. A categorização das subdivisões é arbitrária, mas apresenta pontos interessantes que serão discutidos mais detalhadamente adiante.

Tabela 1: classificação das formas de resistência de plantas segundo Király et al. (2007).

Resistance phenomenon	Mechanism
<i>Innate resistance</i>	
Non-specific, general resistance	
Non-host resistance	<i>HR, ROS, BAX inhibitor-1, PEN genes</i>
Basal resistance against bacteria	<i>Flagellin FLS2 interaction, ROS, antimicrobial compounds</i>
Race non-specific <i>mlo</i> resistance and quantitative resistance to fungi	<i>Cell wall thickening Antimicrobial compounds ROS</i>
Resistance to necrosis-inducing stresses	<i>High antioxidant capacity</i>
Specific resistance (cultivar/pathogenic race specificity)	
Extreme resistance – symptomless gene-for-gene resistance <i>Rx</i> -resistance against viruses without HR Symptomless reaction to rust pathogens, no visible HR	<i>Unknown</i>
Gene-for-gene resistance <i>R</i> -gene ↔ <i>Avr</i> -gene interaction associated with the hypersensitive response (HR)	<i>ROS Phytoalexins Phenol oxidation Stress proteins</i>
Resistance to pathogen toxins	<i>Enzymatic detoxification Lack of toxin receptors</i>
Gene silencing	<i>Recognition and decomposition of foreign RNAs with ribonucleases</i>
<i>Acquired resistance</i>	
After a primary infection an acquired resistance develops against a second infection ‘Stress memory’	<i>Accumulation of SA Stimulated antioxidants Gene silencing Rhizobacterial induction</i>

Outra forma de divisão da resistência inata, recentemente revisada por Boller e He (2009), é a separação em dois principais grupos de amplitude de defesa, conforme a percepção ou reconhecimento do patógeno (Jones e Dangl, 2006). A resistência basal da imunidade provocada por PAMP (PTI), ou resposta primária, tem como base os receptores extracelulares transmembrânicos (PRRs) que reconhecem moléculas conservadas associadas a microrganismos ou patógenos (MAMPs ou PAMPs), que geralmente são proteínas, ácidos graxos, fragmentos de quitina e beta-1,3-glucanas, e outros elicitores inespecíficos. Apesar de ser relativamente fraca (figura 2), a resposta primária da PTI impede a colonização da maioria dos microrganismos, como no exemplo da interação entre a flagelina bacteriana (Felix et al., 1999). Por outro lado, os patógenos especializados podem produzir efetores capazes de suplantar a resposta primária, estabelecendo a infecção. Entretanto, caso esses elicitores específicos estimulem a resposta secundária de defesa específica, ocorre a chamada imunidade provocada por efetores (ETI). Nesse tipo de resistência específica, uma variedade (ou cultivar) de planta pode combater a infecção de uma ou poucas cepas (ou raças) do patógeno.

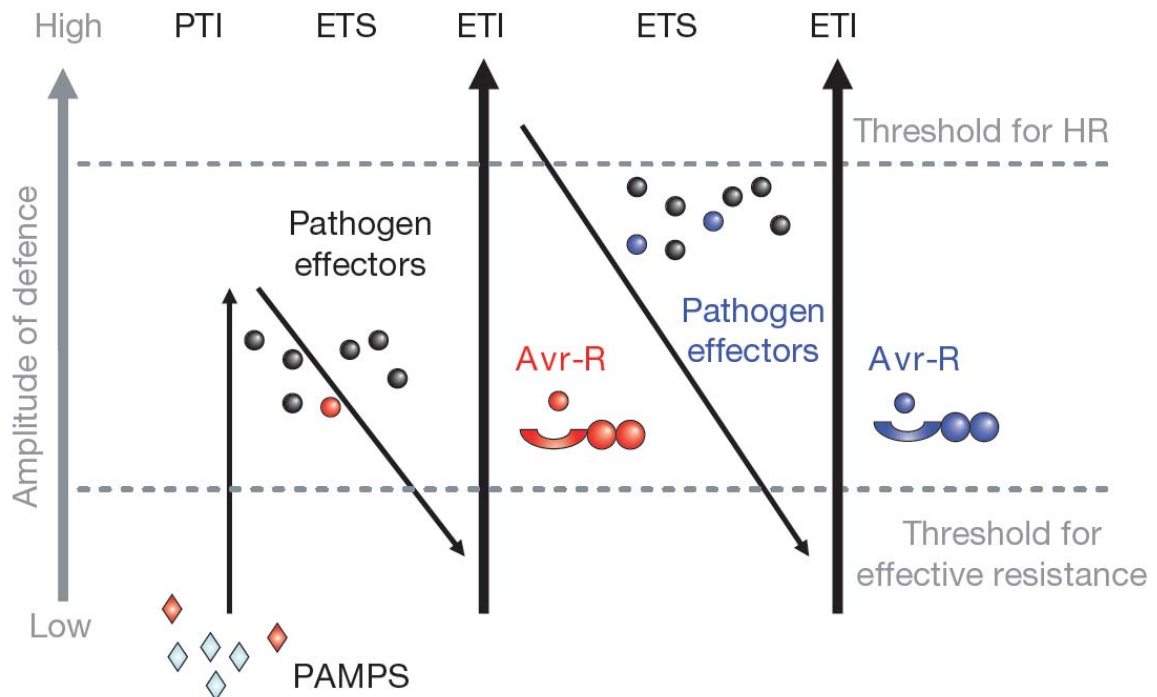


Figura 2: modelo em *zigzag* ilustrando a resposta quantitativa do sistema imune. A amplitude total da resposta de resistência ou de suscetibilidade é proporcional a [PTI – ETS+ETI]. Dangl e Jones, 2006. Na fase 1, a planta detecta os MAMPs/PAMPs (losangos vermelhos) via PRRs para provocar a PTI. Na fase 2, os patógenos que escapam liberando efetores que interferem na PTI, ou que permitem de outra forma a nutrição e dispersão do patógeno, estabelecem a ETS. Na fase 3, um efector (indicado em vermelho) é reconhecido por uma proteína NB-LRR, aivando a ETI, que é uma versão amplificada da PTI que ultrapassa a linha do limite mínimo para a indução da RH. Na fase 4, são selecionados isolados do patógeno que perderam o efector vermelho, e que talvez tenham ganhado novos efetores por fluxo gênico horizontal (em azul) - estes podem ajudar os patógenos a suprimir a ETI. A seleção favorece novos alelos de NB-LRR da planta que possam reconhecer um dos efetores recém adquiridos, resultando novamente na ETI. (Jones e Dangl, 2006).

Nesta revisão de literatura, a divisão da interação planta-patógeno foi considerada de acordo com a distância entre o local de reconhecimento do invasor e a possível dispersão da resposta imune na planta para bloquear a invasão e/ou estabelecimento do patógeno.

1.1.1.1. Resistência localizada

A resposta localizada se refere ao bloqueio do patógeno por morte celular no local da infecção. Desta forma, o patógeno é impedido de se deslocar ou de se instalar no tecido vegetal. As informações sobre as características desse tipo de resposta são resumidas a seguir.

1.1.1.1.1. Resistência basal

1.1.1.1.1.1. Basal contra bactérias e fungos

A resistência basal contra bactérias ocorre precocemente na interação planta-patógeno. Esta resistência se caracteriza pelo reconhecimento de PAMPs típicos, como a flagelina de bactérias, como de efetores tipo-PAMP representados por lipopolissacarídeos, chitina fúngica e ergosterol etc. As respostas à flagelina e outros MAMPs são chamadas de imunidade provocada por PAMP (PTI). Os mais bem caracterizados exemplos de PAMPs são a flagelina bacteriana (Gomez-Gomez & Boller, 2002), o fator de alongação bacteriano EF-Tu (Zipfel et al., 2006), lipopolissacarídeos de bactéria, chitina e ergosterol de fungos e heptaglicosídeos transglutaminase de oomicetos (Zipfel & Felix, 2005). Após a etapa de reconhecimento, são envolvidos na resistência basal à bactérias genes idênticos aos ativados pela resposta específica de proteínas *R*. De fato, as ROS também exercem função nessa resistência, assim como outras enzimas chitinases e anti-microbianas.

A flagelina, subunidade do flagelo bacteriano, é indispensável para a motilidade (Macnab, 1992). O receptor de flagelina FLS2 de *Arabidopsis* foi identificado como uma quinase receptora tipo LRR (Chinchilla *et al.*, 2006), que é internalizada após a percepção da flagelina pela endocitose mediada por receptor (Robatzek *et al.*, 2006). No caso da flagelina, a interação entre o receptor FLS2 e um epitopo de 22 aminoácidos (flg22) permite o reconhecimento do patógeno por proteínas quinase do tipo receptor (Chinchilla *et al.*, 2006). Um dos primeiros passos da sinalização de receptor FLS2 é sua interação com a quinase associada a BRI1 (BAK1), que também age como co-receptor de hormônios brassinosteróides de plantas (Wang *et al.*, 2008). Homólogos de FLS2 são encontrados em todas as plantas superiores já sequenciadas, o que sugere que a percepção de flagelina por FLS2 é antiga e conservada. Por outro lado, a percepção do EF-Tu em *Arabidopsis* parece ser recente evolutivamente, pois o receptor correspondente está restrito a Brassicaceae (Boller e He 2009). De toda forma, trabalhos recentes sugerem que mesmo os PAMPs podem evoluir no sentido de escapar do reconhecimento pela hospedeira (Stukenbrock e McDonald, 2009). No caso de bactérias patogênicas flageladas, mecanismos para evitar a defesa da planta são encontrados na diversidade existente em domínios da flagelina e perda do flagelo após a infecção. Estratégias semelhantes devem existir em fungos e oomicetos para alterar ou descartar seus PAMPs e evitar o reconhecimento pela hospedeira.

Contra os fungos, foram descritos dois tipos importantes de resistência não específica. Um deles é denominado resistência não-específica de raça, particularmente efetiva e de ação durável contra oídeos de cevada, é codificada pelos alelos recessivos do gene *Mlo*. Este gene foi clonado e identificado como proteína transmembrânica que regula negativamente a morte celular e a resistência aos oídeos da cevada (Buschges *et al.*, 1997). O outro é a resistência quantitativa, que no caso do fungo limita a propagação. É interessante notar que nesse tipo de resistência a planta parece hospedeira e permite a infecção do fungo, mas a propagação do fungo é muito lenta e pouco numerosa. Essa resistência é bem caracterizada em batata para o fungo da quequeima (*Phytophthora infestans*) (Song *et al.*, 2003).

1.1.1.1.2. Resistência específica

Ao contrário da resistência não-específica induzida por PAMPs, a interação entre os produtos dos genes *R* e *Avr* desencadeia a resistência específica entre um genótipo de planta hospedeira e seu patógeno. Os genes *R* são frequentemente encontrados em *clusters* que evoluem rapidamente. O reconhecimento específico de novos patógenos parece ser favorecido por eventos de seleção divergente, bem como de recombinação intragênica e conversão gênica (Michelmore and Meyers 1998). Os processos que podem contribuir para a diversidade dos genes *R* incluem duplicações *in tandem* ou segmentais, recombinação, *crossing-over* desigual, mutações pontuais e seleção (Meyers et al. 2005).

1.1.1.1.2.1. Genes *R* em plantas

Os genes *R* são abundantes nos genomas das plantas e a maioria desses genes que já foram caracterizados partilham uma estrutura similar, mesmo entre gêneros distantes. As várias classes de genes *R* são agrupadas de acordo com a predição da estrutura dos produtos protéicos correspondentes. A localização celular das classes de proteínas *R* está representada na figura 3. A classe mais abrangente, chamada NB-LRR, contém seqüências repetitivas ricas em leucina (LRRs), um sítio central de ligação a nucleotídeo (NB) e um domínio aminoterminal contendo zíper de leucina (LZ) ou seqüência *coiled-coil* (CC). Outras classes possuem um domínio LRR extracelular um domínio transmembrânico e facultativamente um domínio intracelular serina/treonina quinase. As regiões NB são conservadas, enquanto que as LRR são altamente variáveis e são envolvidas no reconhecimento do patógeno e na especificidade da interação.

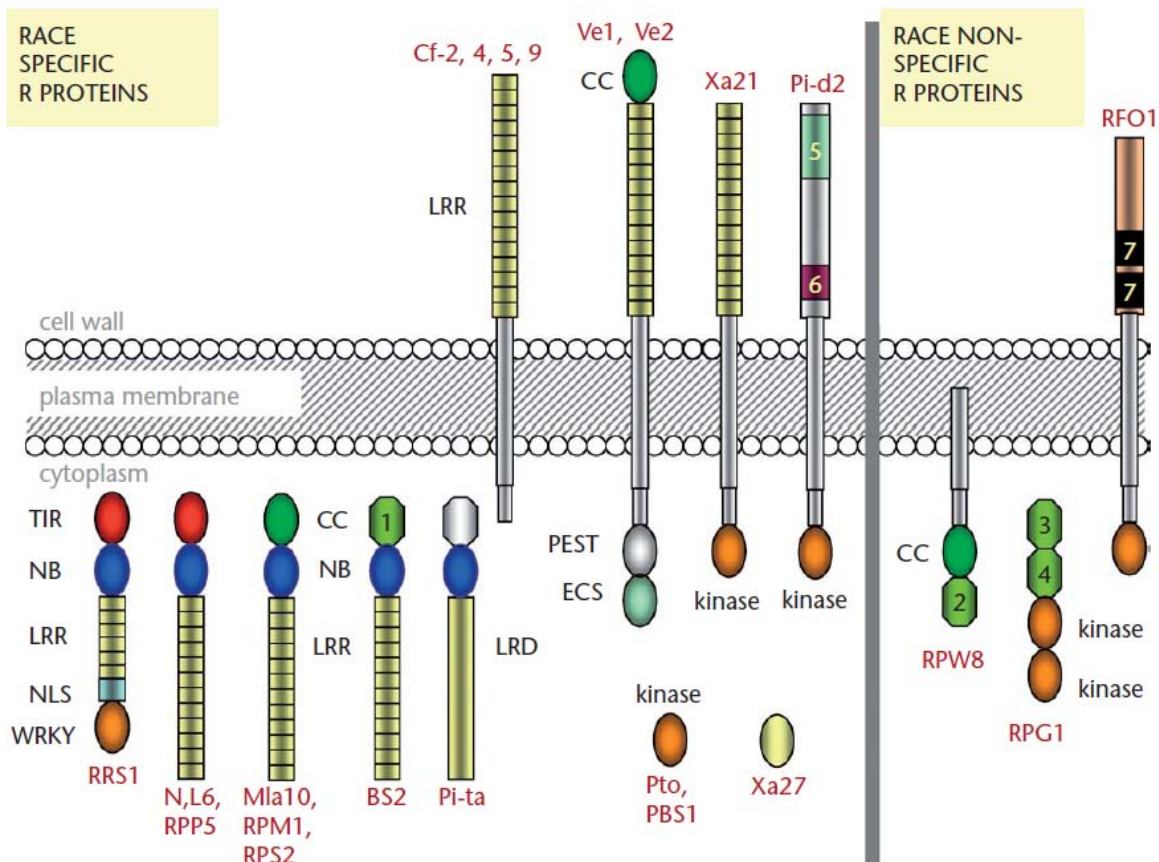


Figura 3: ilustração das classes de proteínas R e sua localização celular. Os domínios previstos das proteínas R que conferem resistência seja raça-específica ou não-específica são representados esquematicamente: CC, domínio *coiled-coil*; TIR, motivo *Toll and Interleukin 1 receptor-like*; NB, sítio *nucleotide binding*; LRD, domínio *leucine-rich*; LRR, repetição *leucine-rich*; NLS, *nuclear localization signal*; ECS, *endocytosis signal*; PEST, *Pro-Glu-Ser-Ther-like sequence*; WRKY, motivo característico de alguns fatores de transcrição de planta; 1, 2, 3, 4 – domínios novos que não apresenam homologia significativa com proteínas conhecidas; 5, domínio com homologia à lectina B ; 6, estrutura com fraca semelhança com o domínio PAN domain (*conserved core of three disulphide bridges*); 7, estrutura com homologia ao domínio do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF); Cf-2, Cf-4 and Cf-5 conferem resistência à raças de *Cladosporium fulvum* expressando, respectivamente, Avr2, Avr4 e Avr5; L6 resistência à ferrugem do linho 6; Mla10, resistência à *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* expressando Avr10; RPM1, resistência à *P. syringae* pv. *maculicola* expressando AvrRpm1 oi AvrB; RPP5, resistência à *Hyaloperonospora parasitica* expressando ATR5; proteínas Ve1 (*putative CC domain but no PEST sequence in the C terminus*) e Ve2 (*C-terminal PEST sequence*). A resistência conferida por MLO se caracteriza por níveis reduzidos ou ausência da proteína. (Hammond-Kosack e Kanyuka, 2007).

Nas proteínas NB-LRR, o domínio NB faz parte de um domínio maior chamado NB-ARC homólogo de CED-4 em *Caenorhabditis elegans* (van der Biezen e Jones, 1998). Os terminais N têm estrutura diversas (Pan et al., 2000), sendo chamadas TNL as

proteínas que tem homologia com os receptores Toll e interleucina humana 1 (TIR) (McHale et al., 2006). Os outros terminais N que possuem regiões CC são presentes em proteínas chamadas CNL (Meyers *et al.*, 2005). As proteínas R de plantas apresentam motivos característicos das ‘ATPases transdutoras de sinais com vários domínios’ fazem parte da classe STAND da família NB-ARC (figura 4), juntamente com outras proteínas animais reguladoras da morte celular (Leipe *et al.*, 2004). Os motivos característicos e a sequência consenso de cada domínio estão representados na figura 4a.

A morte celular é geralmente provocada após a ativação das proteínas R, o que torna essencial a regulação desse sistema de defesa. A regulação da atividade das proteínas R parece ser fortemente inibida na ausência do patógeno, mas rapidamente ativada após o ataque. A manutenção das proteínas R na forma inativa deve ser realizada pela interação molecular entre os vários domínios (figura 4b). A listagem das proteínas que interagem física e geneticamente com as proteínas NB-LRR é descrita por Lukasik e Takken (2009).

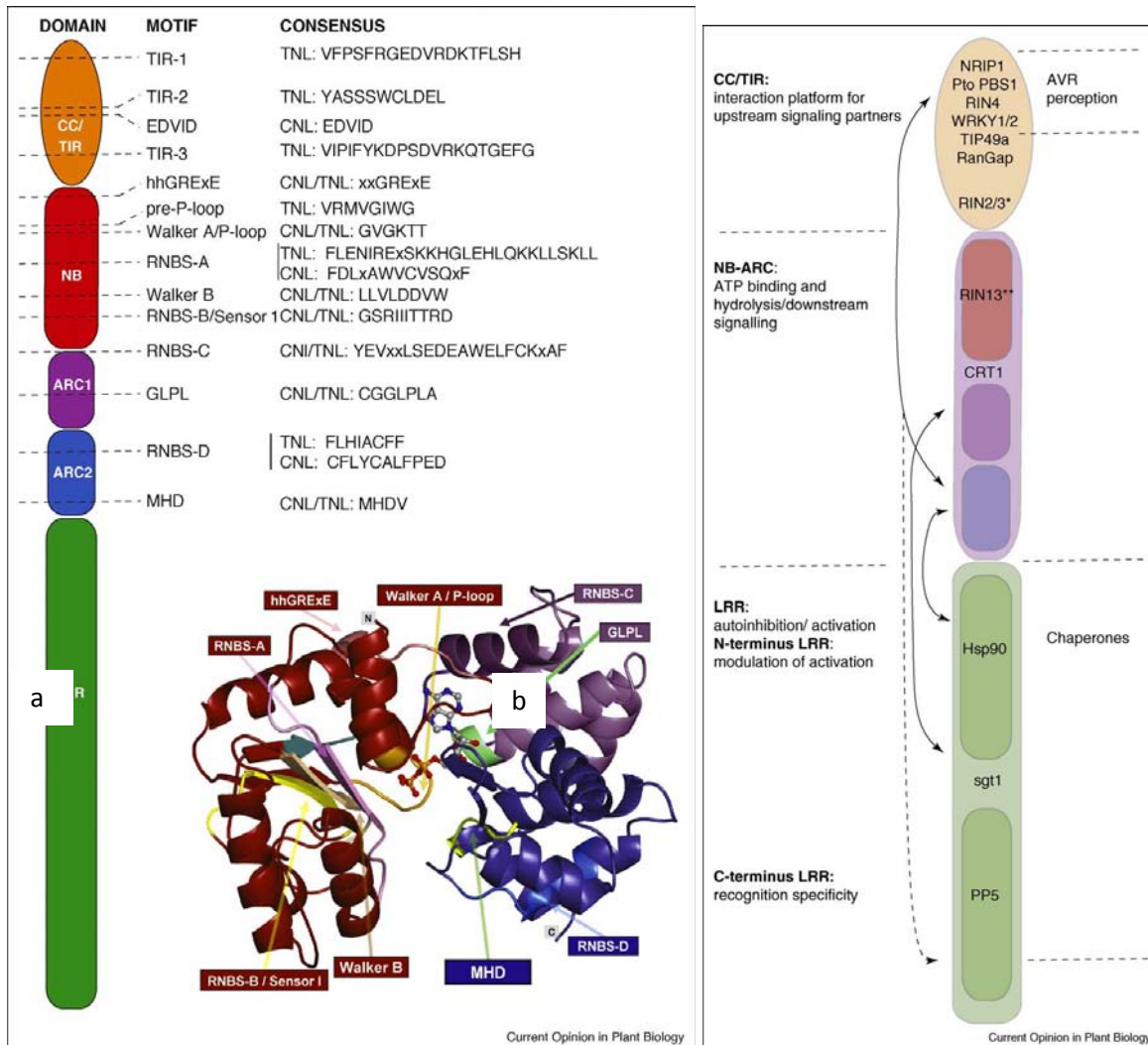


Figura 4: representação esquemática de proteína NB-LRR típica. Os (sub) domínios estão representados como caixas coloridas: domínio CC/TIR (laranja), NB (vermelho), ARC1 (roxo), subdomínios ARC2 (azul) e domínio LRR (verde), enquanto que os motivos conservados estão marcados como linhas. A sequência consenso está escrita ao lado do respectivo motivo. À parte, a estrutura predita em 3D do domínio NB-ARC de I-2 modelada no molde de Apaf1 ligada à ADP (1z6t). Os motivos conservados e terminais N e C estão marcados. Os átomos de Mg e o ADP estão representados por traços bolas (a). Relação esquemática entre as interações intra e intermoleculares encontradas com os domínios NB-LRR. As proteínas NB-LRR consistem de 3 domínios maiores: CC/TIR (laranja), NB-ARC (rosa) e LRR (verde). O domínio NB-ARC (rosa) pode ser subdividido em NB (vermelho), ARC1 (roxo), subdomínios ARC2 (azul) e LRR (green) é dividido entre as partes C e N terminal. As interações intramoleculares entre os domínios são indicadas com setas e ponta dupla. As proteínas que interagem fisicamente com um domínio subespecífico são indicadas na região correspondente na estrutura. RIN2/3* – também requer o motivo hhGRExE no NB. RIN13** – também requer a metade C-terminal do domínio CC (b). (Lukasik e Takken, 2009).

As proteínas STAND funcionam como interruptores moleculares nas vias de sinalização ativadas por patógenos, regulando as respostas celulares por mudanças conformacionais nucleotideo-dependentes (Jones e Dangl, 2006). Estudos de interação e de mutagênese indicam que a parte N-terminal do domínio NB e o sub-domínio ARC2 são essenciais para controlar esse processo por autoinibição (Rairdan e Moffett, 2006). O domínio LRR está envolvido tanto na regulação negativa e também no controle positivo da atividade da proteína R, pois desempenha duplo papel na autoinibição e na transmissão para a proteína do reconhecimento do patógeno (Rairdan e Moffett, 2007). Dados recentes indicam que as interações inter e intramoleculares implicadas no reconhecimento do patógeno podem induzir mudanças conformacionais na proteína R e, assim, desencadear a sinalização de defesa na planta (Lukasik e Takken, 2009). Um modelo proposto para a classe STAND NB-LRR indica que o reconhecimento do efetor patógeno, seja direta ou indiretamente (modelos 'guarda' e *decoy*), permite que o ATP possa gerar o estado ativado de proteínas R (figura 5).

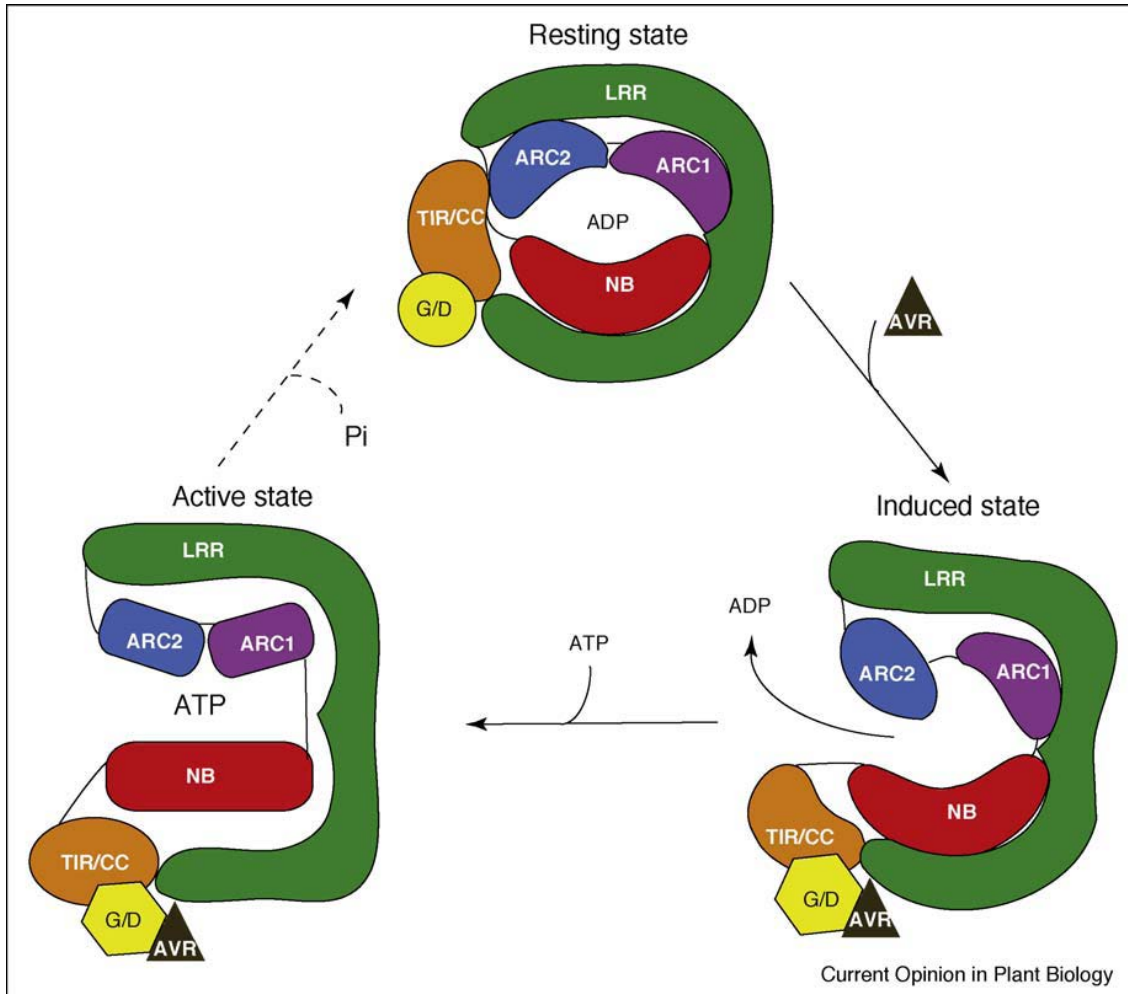


Figura 5: ilustração do modelo de ativação da proteína NB-LRR. Na ausência do patógeno, uma proteína NB-LRR fica em seu estado de descanso (ADP), onde o LRR estabiliza a conformation fechada. A plataforma de reconhecimento para a proteína AVR (triângulo marrom) é provida pela parte C-terminal do LRR junto com o domínio CC/TIR (CC) e depois pode ser ligado a um interator (referido como 'guarda' ou 'decoy' – G/D). A percepção do AVR (direta ou via G/D) muda a interação superficial entre a parte N-terminal do LRR e o subdomínio ARC2, liberando assim a autoinibição conferida pelo LRR. As trocas de nucleotídeos subsequentes provocam uma segunda mudança conformacional, alterando as interações dos domínios NB-ARC com CC e LRR (estado induzido). No estado ativado, o subdomínio NB é acessível na interação com os parceiros de sinalização a jusante. A hidrólise do ATP pode retornar a proteína ao seu estado de descanso. (Lukasik e Takken, 2009).

Desde o estabelecimento do conceito de resistência gene-a-gene, um número crescente de genes R têm sido isolados (Richter e Ronald, 2000). Em geral, o sistema dessas interações está associado à resistência vertical ou específica (Sidhu 1981). A relação dos genes R clonados com os detalhes sobre os primeiros genes isolados de cada classe é acessível no trabalho de revisão sobre genes R de plantas de Hammond-Kosack e Kanyuka, 2007.

Na interação gene-a-gene específica, a resistência (incompatibilidade) é determinada por pares complementares de genes dominantes. As alterações ou perdas tanto do *R* como do *Avr* acarretam a doença (compatibilidade). Esse modelo é válido quando a colonização do patógeno ocorre em tecidos vivos e a reação da hospedeira ao ataque é a resposta de hipersensibilidade (RH), ou seja, inibição da invasão ou progressão do patógeno por morte rápida das células vegetais localizadas no sítio da infecção. Entretanto, em alguns casos a resistência é herdada como caráter recessivo.

Como frequentemente a resistência corresponde a genes dominantes, os programas de melhoramento foram desenvolvidos para identificar germoplasmas resistentes em parentes selvagens das culturas comerciais. Essa estratégia teve sucesso de estabilidade em alguns casos, mas muitos exemplos de quebra de resistência dos genes *R* introgridos são atualmente relatados. O patógeno evolui para escapar do reconhecimento pela hospedeira, enquanto que os genes *R* evoluem para detectar os elicitores patogênicos (*Avr*).

As ligações das proteínas *R* do tipo NB-LRR com os elicitores *Avr* para o reconhecimento do patógeno (figura 6) podem ser diretas ou com a participação de um fator intermediário da hospedeira (Caplan *et al.*, 2008).

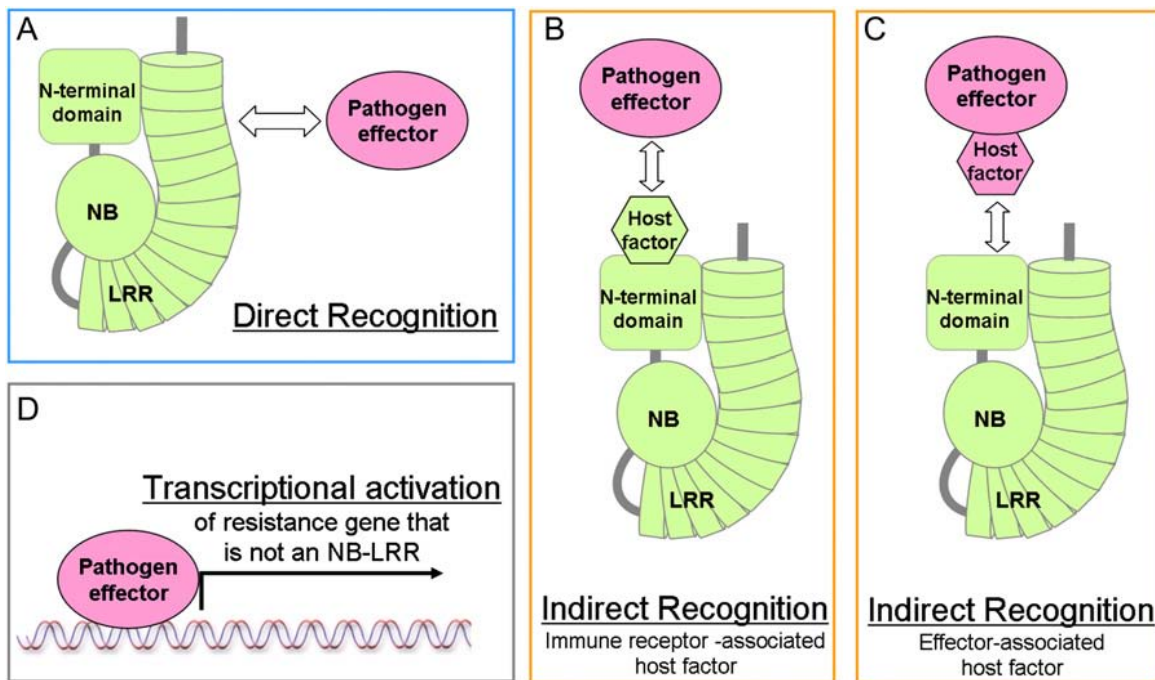


Figura 6: representação do modelo de reconhecimento do patógeno na resistência específica. O reconhecimento do patógeno pode ocorrer se receptores imunes NB-LRR (verde) se ligam diretamente aos efetores patógenos (rosa) (a). Alternativamente, NB-LRRs podem reconhecer indiretamente os patógenos por intermédio do domínio N-terminal (CC ou IR) utilizando um fator hospedeiro intermediário. O fator hospedeiro (também chamado de ‘guarda’) pode ser constitutivamente associado com o receptor imune (b) ou ele pode se associar primeiramente com o efector patógeno (c) e então é subsequentemente reconhecido pelo receptor imune. O terceiro tipo de reconhecimento ocorre quando o efector patógeno mimetiza um fator de transcrição e induz diretamente a expressão de uma proteína de resistência que não seja NB-LRR (d). (Caplan *et al.*, 2008).

O fator intermediário normalmente interage com o domínio N-terminal da proteína R e pode representar tanto um alvo de virulência (agindo como ‘guarda’) como alvo mimetizado (agindo como ‘decoy’) (van der Biezen e Jones, 1998 ; van der Hoorn e Kamaoun, 2008) (figura 7).

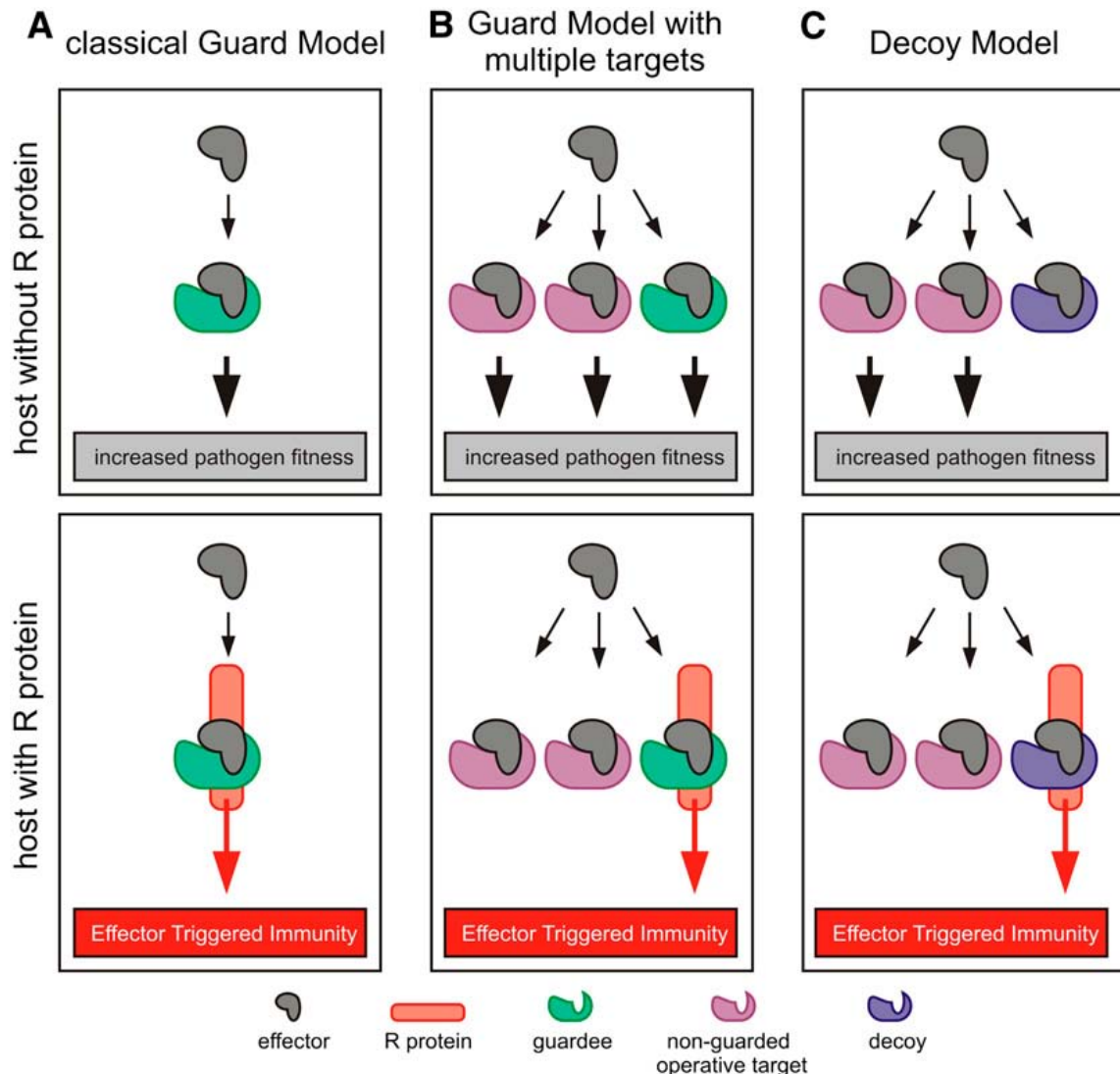


Figura 7: ilustração do modelo ‘guarda’ clássico (a) em contraste com o modelo ‘guarda’ modificado (b) onde o efector visa múltiplas proteínas da planta e o modelo ‘decoy’ (c). Os efetores estão indicados em cinza, os alvos efetores operantes em roxo, proteínas ‘guarda’ em verde ‘decoy’ em azul e proteínas R em laranja. (van der Hoorn e Kamoun, 2008).

No modelo ‘guarda’ (figura 7a), o fator Avr interage indiretamente com a proteína R (Van der Biezen e Jones 1998). Nesse caso, a proteína R age como ‘guarda’ da proteína alvo, denominada ‘guardada’. O efector do patógeno deve desempenhar papel significativo na patogenicidade ao se ligar ao alvo específico da planta suscetível. A ligação compatível entre o efector e a proteína-alvo ‘guardada’ suprime as defesas da hospedeira ou permite a liberação de nutrientes, o que melhora o desempenho do patógeno. Na planta resistente, a resistência inata é induzida quando o efector patógeno se liga à proteína-alvo ‘guardada’ e manipula a proteína R ‘guarda’.

Em termos evolutivos, o modelo ‘guarda’ apresenta um dilema em relação às pressões opostas de seleção exercidas sobre a proteína ‘guardada’ (van der Hoorn e

Kamaoun, 2008). Por um lado, na ausência da proteína R a seleção diversificadora direcionaria a evolução da proteína ‘guardada’ no sentido de evitar a ligação à proteína efetora do patógeno (figura 8). Por outro, na presença da proteína R a seleção deverá favorecer a ligação entre a ‘guardada’ e o efetor porque a imunidade inata vai ser induzida apenas quando estas duas moléculas são compatíveis, por intermédio da proteína R ‘guarda’. São presumidamente considerados clássicos exemplos desse modelo as proteínas RIN4 (*RPM1 interacting protein 4*) e PBS1 de *Arabidopsis* e RCR3 e Pto de tomate (Jones e Dangl, 2006).

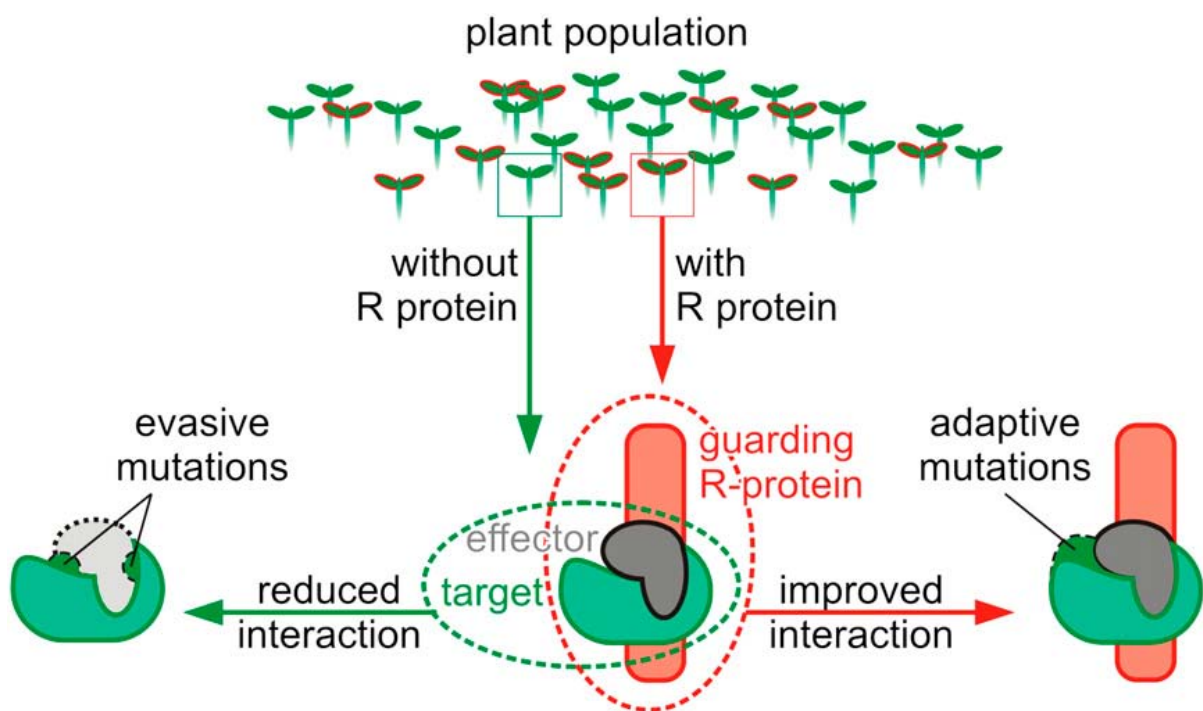


Figura 8: ilustração das forças de seleção opostas que agem sobre os alvos dos efetores que são ‘guardados’ numa população de plantas polimórficas para os genes R. As forças de seleção opostas devem supostamente operar nos alvos dos efetores que são ‘guardados’ com ou sem proteína R associada. Na ausência da proteína R (setas verdes), os alvos estão sob pressão de seleção para reduzir a interação e evadir a manipulação (esquerda). Na presença de proteína R (setas vermelhas), os alvos estão sob pressão de seleção para melhorar a interação com o efector e reforçar a percepção do patógeno (direita). (van der Hoorn e Kamaoun, 2008).

Enquanto que o modelo ‘guarda’ propõe uma proteína-alvo ‘real’ na hospedeira, o modelo chamado ‘decoy’, proposto por van der Hoorn e Kamoun (2008), preconiza a duplicação dos alvos existentes na hospedeira, que cujos genes evoluem para incrementar a percepção do efector e a mimetização da proteína-alvo. A duplicação gênica do efector-

alvo ou a evolução independente para o mimetismo do alvo poderiam reduzir as inconveniências apontadas pelo modelo de efetor ‘guardado’. Assim, os decoy podem estar sob seleção diversificadora para manter a habilidade de reconhecer efetores de patógenos variados ou invariáveis, dependendo do cenário evolutivo simulado. O modelo ‘decoy’ não foi experimentalmente validado, apesar dos dados que sustentam o modelo ‘decoy’ para o reconhecimento dos efetores de patógenos envolvendo Pto (*Ser/Thr kinase that confers resistance to P. syringae strains carrying avrPto*), Bs3 (*R gene in that it encodes a flavin monooxygenase that confers resistance to Xanthomonas campestris pv vesicatoria AvrBs3*), RCR3 (*tomato extracellular cysteine protease inhibited by Avr2 of the fungus C. fulvum*) e RIN4 (*negative regulator of basal defense that is targeted by multiple P. syringae effectors - AvrRpm1, AvrRpt2, and AvrB - and monitored by at least two R proteins - RPM1 and RPS2*) (van der Hoorn e Kamaoun, 2008).

O conhecimento da percepção dos efetores de patógenos em plantas ainda necessita de dados aprofundados sobre a diversidade das sequências gênicas supostamente codificadores das proteínas ‘guarda’ e/ou ‘decoy’ para, então, podermos determinar o modelo de processo evolutivo que atua nos mecanismos de resistência inata.

1.1.1.1.2.2. Associada à reação de hipersensibilidade

A resistência específica associada à resposta hipersensitiva é representativa do modelo clássico de interação *R-Avr* e da RH. Esse tipo de defesa induzida é expressa por diversos genes relacionados à defesa e geralmente envolve a polarização celular, reorganização do citoesqueleto, movimento direcionado de organelas, secreção direcionada e deposição de calose no sítio de contato com o patógeno (Kwon et al, 2008).

A resistência associada à RH também é chamada de raça-específica, pois pode ser restrita no nível intraespecífico. O patógeno invasor é aprisionado no local da reação e seu desenvolvimento é parcial ou completamente inibido. Entretanto, não foi confirmado se a inibição ou morte do patógeno é causada pela indisponibilidade de nutrientes causada pela morte celular do tecido da planta resistente, pois os patógenos necrotróficos também podem ser aprisionados em plantas exibindo RH (Király et al., 2007). Essa característica a torna desvantajosa do ponto de vista prático do melhoramento genético tendo em vista a curta duração da resistência em campo, face à seleção de patógenos resistentes.

1.1.1.1.2.2.1. Resposta hipersensitiva

A resposta hipersensitiva RH causa danos irreversíveis à membrana (Mansfield et al., 1997), cujas características das lesões variam de acordo com os genótipos envolvidos e com o curso da infecção, tanto no nível macro como no microscópico, como no caso dos diferentes morfotipos gerados pela infecção de folhas de tabaco por diferentes cepas de bactérias (Krzyszowska et al., 2007). As variações fenotípicas podem ser parcialmente relacionadas às diferentes estratégias de infecção adotadas pelos patógenos biotróficos que elicitam a RH, como oomicetos, fungos, bactérias, vírus e nematóides (Mur et al., 2008).

A RH é um exemplo de morte celular programada (PCD) que, de acordo com estudos de inibição enzimática, depende de metabolismo ativo e de síntese proteica (Keen et al., 1981; Watanabe e Lam, 2004). O termo (RH) por criado por Stakman em 1915 para o fenômeno observado no primeiro relato científico de resistência em plantas, no caso o fungo *Melampsora lini* do [linho *Linum usitatissimum*](#) (Ward, 1902). A RH consiste em uma área de morte celular dos tecidos da planta atacada, formada no local de infecção do patógeno, que contribui para a limitação do crescimento e invasão do patógeno (Gabriel e Rolfe, 1990). O fenômeno de morte celular localizada está associado à uma miríade de genes de defesa e regulatórios, como na ativação de genes das vias biossintéticas de metabólitos secundários para a síntese *de novo* de fitoalexinas em resposta ao ataque microbiano (Bednarek e Osbourn, 2009).

A primeira reação da planta em resposta ao ataque por patógenos avirulentos ou virulentos é a rápida geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nas interações incompatíveis, ocorre inicialmente a produção não específica de ROS e em seguida uma acumulação de ROS massiva e prolongada, que é intimamente associada à RH (de Gara et al., 2003).

As espécies ativas de oxigênio (ROS) são ligadas aos sinais de morte celular produzidos pela RH (Levine et al., 1996; Doke e Ohashi, 1988) devido ao “burst” oxidativo que ocorre nos estágios precoces da reação de defesa (Lamb e Dixon, 1997) antes da morte celular (Heath, 2000). Consequentemente, as enzimas quelantes de ROS são efetivas no retardo da RH (Doke e Ohashi, 1988). De forma inversa, a redução dos níveis das enzimas quelantes apresenta hiperreatividade quando desafiadas por bactérias avirulentas (Mittler et al., 1999).

A geração de ROS está inimamente ligada ao fluxo de Ca^{2+} (Levine et al., 1996; Grant et al., 2000). O fluxo de íons Ca^{2+} sofre alteração em resposta à aplicação de

proteínas Avr (Atkinson et al., 1996) e inoculação de bactérias elicitoras de RH (Grant et al., 2000). A importância do fluxo de cálcio na RH foi evidenciada pela supressão da morte celular em mutantes *rpg4* de soja insensíveis aos seringolídeos bacterianos AvrD que causam influxo de íons cálcio nas células de plantas resistentes (Levine et al., 1996). Não foi observada RH após aplicação de bloqueador de canais de cálcio em feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) (Xu e Heath, 1998). Em *Arabidopsis*, foi demonstrado que o canal CNGC2 (calcium cyclic nucleotide gated channel), identificado no mutante *defence not death* (*dnd1*) (Clough et al., 2000), conduz os íons cálcio para as células e acarreta a geração de óxido nítrico devido à associação do Ca^{2+} citosólico com a calmodulina (Ali et al., 2007).

Os trabalhos sobre a relação entre o óxido nítrico (ON) e o burst oxidativo indicam que ocorre a geração de ON concomitantemente com a produção de ROS em cultura de soja inoculadas com bactérias avirulentas (Delledonne et al. 2002) e de cevada com fungo (Mur et al., 2007). A importância do ON na RH foi demonstrada em plantas transgênicas expressando dioxigenases ou flavohemoglobinas, onde a redução dos níveis de ON interferiu na RH (Zeier et al., 2004; Boccara et al., 2005). Trabalhos recentes mostram que o ON modula a morte celular induzida por ozônio, a biossíntese de hormônio e a expressão gênica em *Arabidopsis* (Ahlfors et al., 2009). Parece haver um efeito sinérgico entre o ON e ROS (Pinto et al. 2002), pois o ON sozinho não induz a morte celular. Trabalhos recentes apontam que também pode ter sobreposição dos efeitos do ON com os do H_2O_2 (Zago et al., 2006). Apesar do mecanismo de geração de ON não ter sido ainda definido, ocorreram avanços no estabelecimento da S-nitrosilação de proteínas e glutatona como componente regulatório significativo na defesa da planta (Feechan et al., 2005; Rusterrucci et al., 2007). Nesse sentido, é interessante observar que a metacaspase AtMC9 é S-nitrosilada nas cisteínas do seu sítio ativo para suprimir tanto o autoprocessamento da pro-proteína como a atividade proteolítica (Belenghi et al., 2007). Considerando-se que a AtMC9 tenha um papel na RH, pode ser que a ON desempenhe um papel regulatório desta protease.

As peroxidases e amino oxidases parecem estar ligadas ao *burst* oxidativo (Bolwell et al., 2002; Allan e Fluhr, 1997). Nesse sentido, as NADPH oxidases apoplásticas de plantas foram bem caracterizadas em *Arabidopsis* (Torres et al., 2002; Yoshioka et al., 2003), onde foi sugerido que essas enzimas sejam as maiores geradoras de ROS durante a RH. Entretanto, existe a possibilidade de que as ROS sejam geradas indiretamente pelas NADPH oxidases por via de peroxidases (Bolwell et al., 2002).

Ainda não está esclarecido o mecanismo pelo qual as ROS possam agir na morte PCD. A possibilidade mais aventada é a de que ocorra peroxidação lipídica, onde radicais hidroxila (.OH) iniciem uma reação em cadeia à partir de fosfolipídeos (LOOH), levando à peroxidação de grupos não-saturados de cadeias acil (PUFA) de membrana e consequente disruptura da integridade celular. Outra possibilidade de geração de LOOH (7 ou 11-LOOH) é pela ação de lipoxigenases (LOX) (Gobel et al., 2001; Jalloul et al., 2002; Montillet et al., 2002, 2004). Em *Arabidopsis*, os principais fosfolipídeos de cadeia acil são os C18:3 e C16:3, dos quais derivam 9 ou 13-LOOH ou 7 ou 11-LOOH, respectivamente, no caso da ação específica de LOX, e de 14-LOOH e 10 ou 14-LOOH por ação de peroxidases. A importância dos produtos de LOX durante a RH foi demonstrada por Rance et al. (1998), sendo frequentemente relatada a regulação gênica positiva (Gobel et al., 2003; Gao et al., 2008). A influência das LOX na morte celular pode ser pelo dano à membrana (Croft et al., 1990) e também pela geração de produtos citotóxicos (Knight et al., 2001; Alméras et al., 2003).

As modificações *redox* dos antioxidantes também pode ser um fator causal da morte celular. Foi observado que os níveis de glutathione (GSH) se elevam durante a RH (May et al., 1996; Vanacker et al., 1998), onde os antioxidantes devem estar na forma oxidada (May et al., 1996), pois a co-aplicação de GSH reduzida e de bactérias patogênicas suprime efetivamente a RH (Mur et al., 2005; Kiba et al., 2006). A GSH geralmente funciona em associação com o ácido ascórbico (Pavet et al., 2005). Esses dados indicam que componentes celulares sensíveis ao ambiente redox podem desempenhar um papel na RH, o que leva à investigação das mitocôndrias.

O modo como as interações R-Avr estão ligadas aos mecanismos de morte celular ainda não foi esclarecido. Estudos de hibridização demonstraram que existe interação física entre os produtos gênicos de *avrPtoB*, *Pto* e *Prf* na iniciação do processo de RH. Para elucidar o mecanismo pelo qual o complexo *AvrPto* inicia a resistência, Xing et al. (2007) determinaram recentemente a estrutura cristalizada do complexo *AvrPto-Pto*. Ao contrário da hipótese consensual de que *AvrPto* ativa a atividade quinase da *Pto*, os resultados em tomateiro demonstraram que *AvrPto* é um inibidor *in vitro* da quinase *Pto*, de tal maneira que a *AvrPto* desreprime as defesas da hospedeira pela interação com *Pto*. Esse trabalho sugere que a ligação da *AvrPto* age na inibição da forma ativa de *Pto*, ao invés de ativar a forma inativa (figura 9). Outros genes que interagem com *Pto* incluem uma quinase (*Pti*) que é fosforilada por *Pto* e um fator de transcrição associado ao etileno

(Zhou et al., 1995, 1997; Tang et al., 1996), mas não foi encontrada interação direta com efetores da morte celular.

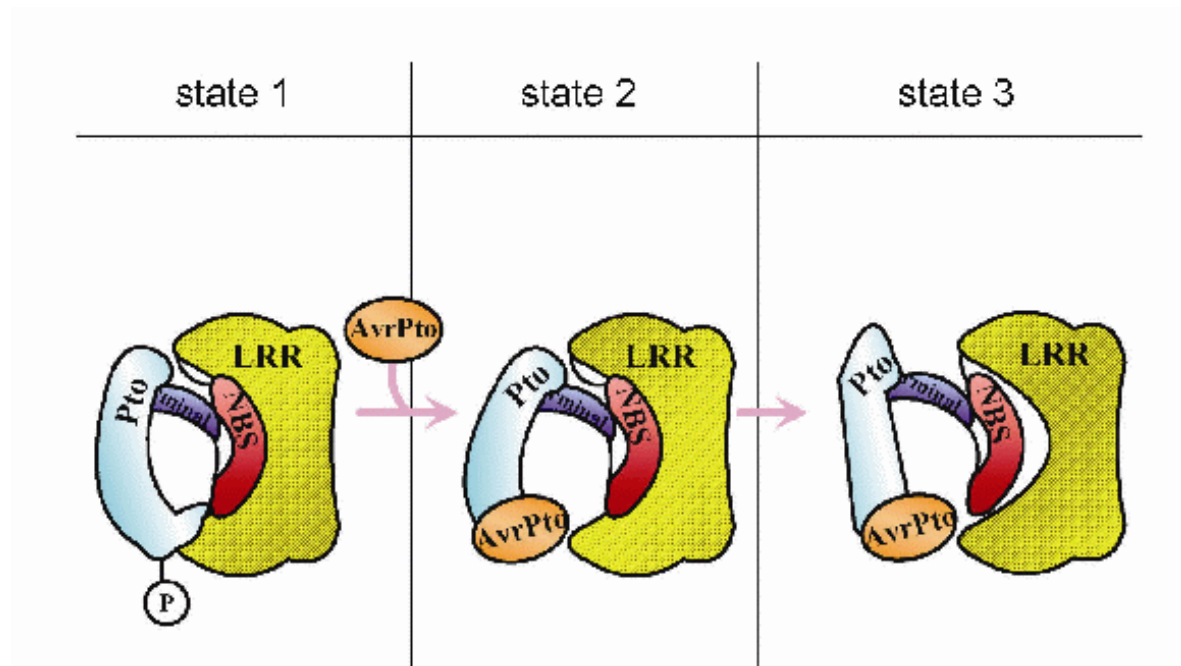


Figura 9: ilustração da base estrutural para ativação da imunidade vegetal pelo efetor proteico bacteriano AvrPto. O mecanismo mostra a ativação de Prf (e consequentemente da RH): o estado normal da Prf (estado 1), compreendendo os domínios N-terminal, LRR e NBS, é inativo e mantido inativado pela interação com a Pto fosforilada. A ligação com a AvrPto causa mudanças conformacionais (estado 2) que resultam no desbloqueio e ativação de Prf (estado 3). (D. M. Szebenyi, Cornell University)

Na hipótese guarda, a Prf é a proteína R guarda de Pto, que reconhece o complexo Pto-AvrPto e inicia a RH. No mesmo sentido, a RIN4 interage tanto com a AvrRpm1 como com as proteínas de resistência RPM1 (*resistance to P. Syringae pv Maculicola1*) e RPS2 (*resistance to P. Syringae2*), para então desencadear a RH. A interação entre as proteínas RAR1 (*required for Mla12 resistance*) e SGT1b (*suppressor of the G2 allele of skp1*) e sua função como desencadeadoras de RH foram identificadas em Arabidopsis, cevada e trigo (Azevedo et al., 2002; Bieri et al., 2004; Tai, 2008). A hipótese atual é que as proteínas RAR1 se ligam a chaperona molecular HSP90 (*heat shock protein 90*) (Takahashi et al., 2003) e estabilizam a RPM1 para permitir a interação com a proteína de guarda SGT1, que por sua vez também interage com a ubiquitina-ligase E3 (figura 10). A ativação da E3 deve marcar supressores de morte celular para dar início à RH (Azevedo et al., 2002). Para validar essa hipótese, estão sendo buscadas as proteínas-alvo da interação SGT1b-E3 (Mur et al., 2008).

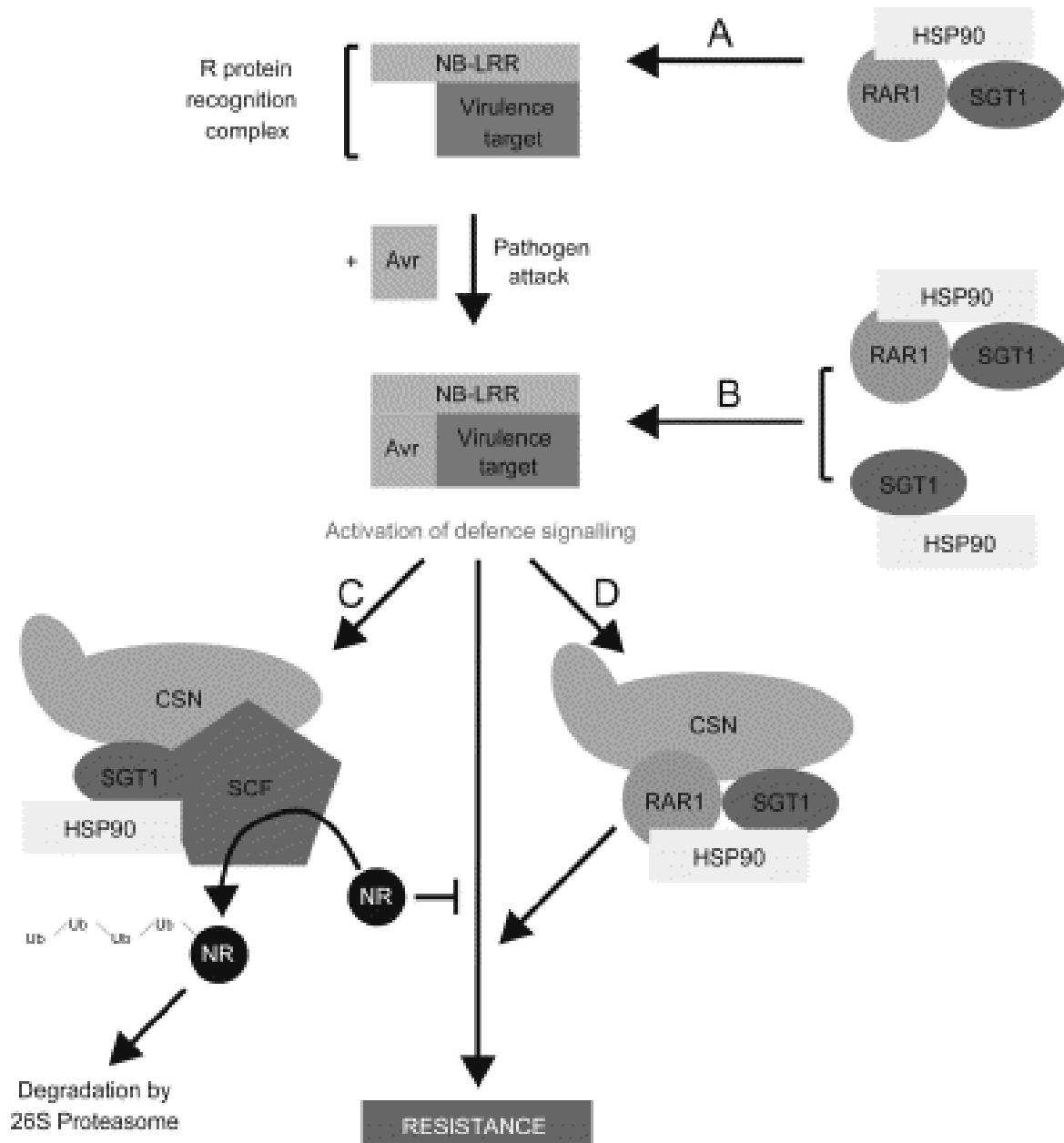


Figura 10: ilustração dos possíveis papéis de SGT1 na resistência mediada por proteínas R. Formação do complexo de reconhecimento, com possível cooperação com RAR1 e HSP90 (a) para regular o dobramento correto ou associações intermoleculares do complexo de reconhecimento da proteína R, seguida de ativação pelo efetor Avr, com possível cooperação com HSP90 +/- RAR1. Uma função a jusante na ubiquitinação mediada por SCF para remover reguladores negativos (NR) da espósta de resistência (c). Uma função a jusante com RAR1 e CSN (*COP9 signalosome closely related to the lid subcomplex of the 26S proteasome, and mediates a number of physiological responses controlled by cullin-based E3 ligases in plants*) possivelmente como parte de um complexo que não seja do tipo E3 ligase SCF. (P. Muskett, J. Parker / *Microbes and Infection* 5 (2003) 969–976) (Muskett e Parker, 2003).

Foram identificadas duas vias de sinalização após a interação R-Avr (Aarts et al., 1998). Uma delas é requerida para a função da classe TIR-NBS-LRR de proteínas R (Wiermer et al., 2005) e dependente de EDS1 (*enhanced disease susceptibility1*) e PAD4 (*phytoalexin deficient 4*), que interagem fisicamente com uma MAPKinase 4 importante na geração de AS e ROS . A outra é utilizada pela classe CC-NBS-LRR e depende de NDR1 (Century et al., 1997; Coppinger et al., 2004), que interage fisicamente com RIN4 na membrana plasmática para induzir a RH (Day et al., 2006).

A sinalização da RH parece ser regida pela coordenação de diversas moléculas sinalizadoras do citoplasma, incluindo Ca^{2+} , óxido nítrico (ON), nucleotídeos cíclicos e calmodulina. Entretanto, os mecanismos de interação entre esses mensageiros citosólicos secundários e seus papéis na cascata de sinalização química produzida durante a RH ainda não foram elucidados.

As investigações sobre a RH, empregando principalmente patógenos bacterianos, seguem diferentes abordagens para o detalhamento das interações dos sinais que geram a morte celular localizada. Modelos recentes (figura 11) sugerem que, além dos componentes citoplasmáticos e apoplásticos discutidos acima, a mitocôndria possa ter um papel principal na integração dos múltiplos sinais da morte celular (Mur et al., 2008; Jones, 2001). Da mesma forma, o cloroplasto também parece contribuir significativamente para a RH (Zeier et al., 2004b; Montillet et al., 2005).

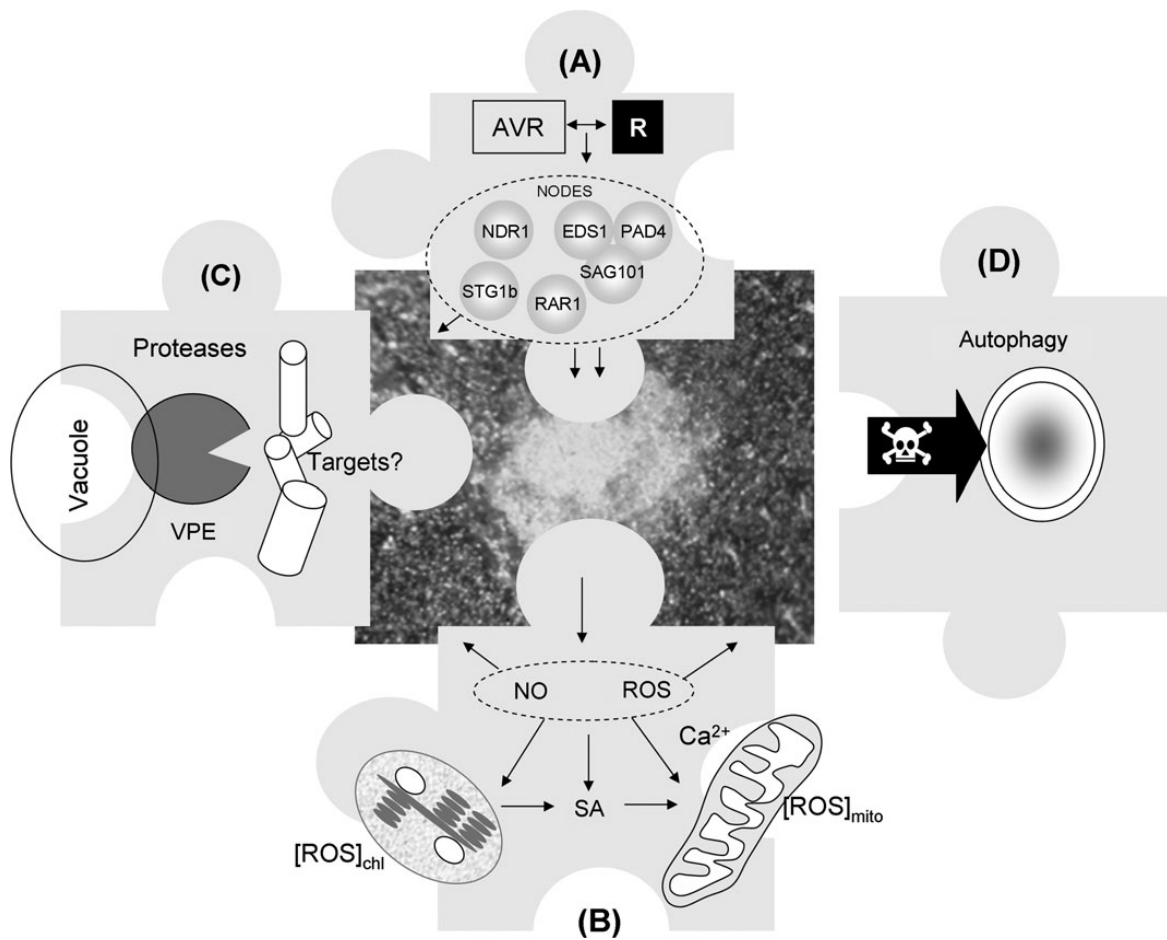


Figura 11: ilustração do ‘quebra-cabeça’ da resposta hipersensiva (RH). A interação do gene de avirulência do patógeno (AVR) com o gene de resistência da planta (R) inicia a RH e também um grande número de defesas associadas. Primeiramente, as abordagens genéticas identificaram nós de sinalização (NDR1, EDS1-PAD4-SAG101, STG1b, RAR1) que são usados por vários produtos de genes R para iniciar as defesas e a RH (a). Por via de mecanismos que são atualmente obscuros, a interação R-avr leva a produção persistente de ROS, ON, AS e fluxo de íons cálcio. Os efeitos nas organelas que resultam em aumento de ROS mitocondriais e de ROS cloroplasmáticas estão em destaque (b). As interações R-avr e a geração de ROS e ON iniciam a atividade das proteases tipo caspase que devem ser enzimas de processamento vacuolar. O mecanismo de ativação de VPEs (*vacuolar processing enzymes*) é ainda obscuro pois eles são alvos proteolíticos. A atividade de VPE pode levar à ruptura do tonoplasto (c). Recentemente (Liu et al., 2005), a contenção da morte celular em torno da lesão causadora da RH foi associada à formação de autofagossomas de dupla membrana que contêm presumidamente fatores elicitores da PCD (d). A imagem de fundo é uma lesão induzida em tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) por TMV a 72 h após inoculação (Mur et al., 2008).

1.1.1.1.2.3. Contra toxinas de patógenos

As toxinas patogênicas específicas (HST) são efetores produzidos por patógenos necrotróficos (Friesen et al., 2008). As HSTs são ativas somente contra as plantas hospedeiras que possuam um gene correspondente de sensibilidade específico (Stukenbrock e McDonald, 2009). A interação gene-a-gene entre a HST e o gene

correspondente de sensibilidade se assemelha à interação *Avr-R*. Porém, ao contrário da *Avr*, a HST precisa ser reconhecida para induzir a necrose na hospedeira. Desta forma, os processos evolutivos interferem no sentido de manter o reconhecimento da toxina-alvo na hospedeira sensível. Assim, as HSTs não somente desempenham um papel na patogenicidade como também são determinantes da especificidade da hospedeira, sendo geralmente herdadas como caráter dominante (figura 12 a).

Pelo lado da hospedeira, a evolução favorece a não-ligação dos genes de sensibilidade às toxinas (figura 12 b). As plantas podem exibir resistência ou tolerância aos efeitos tóxicos de patógenos fúngicos ou bacterianos. Basicamente, três mecanismos são relatados: inativação da toxina, como no exemplo mais estudado da redutase NADPH-dependente codificada pelo gene *HMI* que inativa a toxina HC do fungo *Cochliobolus (Helminthosporium) carbonum* causadora de necrose em folhas de milho; ausência de receptores-alvo específicos da toxina na planta resistente; descarte da toxina por transporte para o meio extracelular. A detoxificação biológica de toxinas fúngicas tem aplicação nos programas de melhoramento de plantas para culturas que apresentam esse tipo de resistência (Karlovsky, 1999; Wolpert *et al.*, 2002).

As reações de RH e apoptose favorecem a nutrição dos patógenos necrotróficos. Consequentemente, é possível que as HST ativem genes *R*, pois as vias ativadas pela RH para proteção contra patógenos biotróficos permitem a proliferação de agentes necrotróficos. Alguns estudos demonstraram que proteínas efetoras podem exercer duplo papel tanto de toxinas e como de indutoras de resistência na hospedeira. Foi demonstrado que o composto chamado vitorina, produzido pelo fungo *Cochliobolus victoriae*, é responsável pelos sintomas de doença e pela sensibilidade conferidos pelo gene *LOVI* em *Arabidopsis* (Lorang *et al.* 2007). O gene *LOVI* codifica uma proteína CC-NB-LRR que causa de perda de função similar à RPM1. Os resultados de sequenciamento de mutantes insensíveis à vitorina sugerem que o gene *LOVI* funcione como gene *R* (Sweat *et al.*, 2008). Outros trabalhos são citados por Stukenbrock e McDonald, 2009 para exemplificar a interação entre os genes de HSTs e aos seus correspondentes de resistência ou de sensibilidade à toxina em plantas podem evoluir por seleção diversificadora da mesma forma que os genes *Avr*. No modelo proposto pelos autores, a seleção favorável ao patógeno é a interação compatível das HST com os genes *R* (figura 12 c).

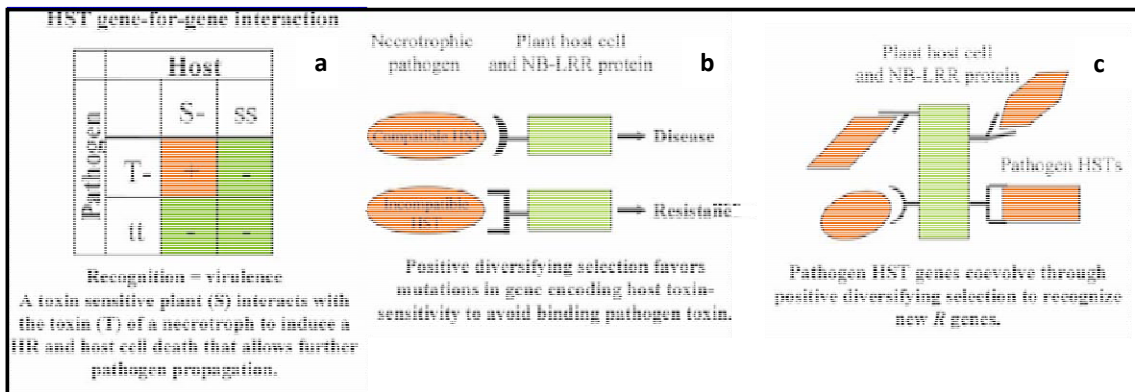


Figura 12: Ilustração da interação gene-a-gene Hst-R: (a) base genética; (b) mecanismos moleculares e (c) evolução molecular (Stukenbrock e McDonald, 2009).

1.1.1.1.2.4. Não-sintomática – resistência extrema

A reação imune, ou resistência extrema, confere proteção completa à planta sem causar sintomas aparentes de necrose ou RH. O exemplo mais estudado desse tipo de resistência é o gene *Rx* de batata efetivo contra o *Potato virus X* (Bendahmane *et al.*, 1999). O mecanismo determinante da resistência conferida pelo gene recessivo *Rx* é tipicamente gene-a-gene, mas o ataque do patógeno é impedido antes mesmo do desenvolvimento da RH.. Entretanto, pode ser que em alguns casos a resposta RH seja forte e altamente localizada, levando à morte somente poucas células em torno do patógeno. De toda forma, ainda não é conhecido o mecanismo bioquímico ou molecular implicado na inibição e aniquilação do patógeno.

1.1.1.1.3. Não-hospedeira

A resistência não-hospedeira é a forma mais durável de resistência. Nesse caso, todos os indivíduos ou linhagens de plantas são resistentes a todas as raças ou cepas de uma determinada espécie de patógeno. Em alguns casos é possível observar sintomas parecidos com a RH ou necrose celular. De acordo com alguns trabalhos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem estar envolvidas na resistência não-hospedeira, como em cevada infectado com oídeos do fungo biotrófico *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Trujillo *et al.*, 2004). Assim, a produção de ROS pode ser a causa do bloqueio da infecção, tanto na interação não-hospedeira como na incompatível (específica). Em trabalho recente (Hafez *et al.*, 2009), folhas de cultivares de trigo inoculadas com o fungo *Puccinia triticina* acumularam alto nível de H_2O_2 na fase precoce da infecção. Da mesma forma, essa ROS se acumulou precocemente em trigo infectado com o fungo inapropriado de cevada *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, acriando uma reação do tipo não-hospedeira.

O impedimento da penetração do patógeno também pode ter relação com a resistência não-hospedeira. As proteínas do tipo inibidor-1 da BAX (BI-1) foram caracterizadas como supressoras da PCD em plantas (Kawai et al.1999; Sanchez et al. 2000). A BI-1 de cevada é um supressor da resistência basal e da resistência mediada por *mlo* ao fungo *B. graminis* f. sp. *Hordei* quando superexpresso nas células epidérmicas de cevada. No trabalho de Eichmann *et al.* (2004), os autores observaram que houve aumento da expressão de BI-1 durante a penetração do oídio inapropriado patógeno de trigo *B. graminis* f. sp. *tritici*. Outros mecanismos podem impedir a penetração de microrganismos normalmente avirulentos, como caracterizado para mutantes fúngicos em *Arabidopsis* (Lipka *et al.*, 2005). Apesar da resistência não-hospedeira ser o tipo mais comum resistência em plantas, o mecanismo que desencadeia esta resposta ainda não foi explicado.

1.1.1.2. Resistência sistêmica

A competência para expressar defesas sistematicamente permite às plantas conter a habilidade das pestes de se locomoverem de um órgão infectado/infestado para causar danos em órgãos adicionais (Shah, 2009). A comunicação entre os órgãos colonizados por pestes e o resto da planta é essencial para a ativação das defesas sistêmicas. Como as plantas estão enraizadas no solo, a comunicação requer um ‘sinal sistêmico’ móvel e um condutor para a translocação deste sinal do órgão colonizado por pestes e o restante da planta. Para se qualificar como um sinal sistêmico, um fator deve ser capaz de influenciar na preparação e na ativação das respostas de defesa e de ser translocado do órgão colonizado por pestes para os órgãos sistêmicos antes da manifestação de defesas nos tecidos sistêmicos. A vascularização provê um excelente canal para o transporte e distribuição de sinais sistêmicos. Os compostos voláteis translocados por via aérea também contribuem para a sinalização sistêmica em uma mesma planta ou entre plantas. Além disso, os sinais voláteis emitidos por plantas infestadas por herbívoros contribuem indiretamente para a defesa atraindo os insetos predadores.

1.1.1.2.1. Adquirida

A ativação da resposta de defesa local nos sítios de infecção do patógeno pode ser acompanhada pela indução da resistência em toda a planta (*systemic acquired resistance* - SAR). A SAR é mantida durante várias semanas e é efetiva na luta contra uma ampla gama de patógenos (Ryals et al., 1996). A resistência sistêmica adquirida (SAR) é uma

forma de resistência indutível que é provocada em tecidos sistemáticos saudáveis de plantas infectadas (Vlot et al., 2008). Com exceção das rizobactérias, geralmente a SAR é induzida em tecidos remotos contra infecções que causam sintomas de necrose. A resposta é duradoura e, algumas vezes, vitalícia. A SAR é efetiva contra um amplo espectro de patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e oomicetos.

O ácido salicílico (salicylic acid - AS) é derivado do ácido benzóico na rota dos fenilpropanóides. O AS geralmente está relacionado à defesa contra patógenos biotróficos. Durante a inicialização da SAR, os níveis de AS aumentam tanto nos tecidos locais como nos sistêmicos, acompanhados da regulação positiva de um grupo de genes relacionados à patogênese (PR). A análise genética de mutantes de *Arabidopsis* deficientes em genes PR permitiu a detecção de um locus *NPR1* (Cao et al., 1994), cujo gene *NPR1* foi clonado (Cao et al., 1997). Foi demonstrado que a proteína NPR1 é requerida para o desenvolvimento da SAR em *Arabidopsis* em resposta à *P. syringae* e *P. parasitica* (Dong, 1998). É interessante notar que, mesmo que a molécula de AS não seja translocada na planta a grandes distâncias do local da infecção do patógeno, a SAR pode ser ativada sistemicamente em *Arabidopsis* (Truman et al., 2007).

Além da acumulação sistêmica de AS, a SAR típica inclui uma variedade de proteínas PR, incluindo quitinases, β -1,3-glucanases (BGL2 ou PR-2) e proteínas tipo taumatina, produção de fitoalexinas e compostos secundários fenólicos antimicrobianos, lignificação aumentada e deposição de calose e expressão aumentada de enzimas associadas a espécies reativas de oxigênio (ROS). As proteínas PR-1 e β -1,3-glucanases são utilizadas como marcadores da SAR.

O etileno é um hormônio vegetal gasoso envolvido em vários processos da planta, incluindo a germinação, a senescência de folhas, e o amadurecimento de frutos. O ET é sintetizado à partir dos precursores S-adenosil metionina e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Várias enzimas estão envolvidas na biossíntese do ET, como as ACC sintases (ACS) e ACC oxidases (ACO). O papel do ET na interação planta-patógeno foi revisado por Broekaert et al. (2006). O ET é percebido por vários receptores associados a membrana em *Arabidopsis*, como o ETR1 (ethylene receptor1) e ETR2, ERS1 (ethylene response sensor1) e ERS2 e EIN4 (ethylene insensitive) (Sakai et al., 1998; Hua et al., 1998). Pela ação do regulador negativo CTR1 (constitutive triple response 1) e do regulador positivo EIN2, a percepção do etileno resulta na indução do gene EIN3 (Hua e Meyerowitz, 1998; Alonso e Stepanova 2004). A proteína nuclear EIN3 é um fator de transcrição que regula os eventos ajusantes na via do ET. Quando ativada, a proteína

EIN3 interage com fatores de transcrição específicos de planta, como o ERF (ethylene response factor) (Solano et al., 1998). A expressão do gene ERF1 é induzida após a infecção com patógeno e a expressão constitutiva do AtERF1 aumenta a resistência de Arabidopsis a vários patógenos necrotróficos, como Botrytis cinerea (Berrocal-Lobo et al., 2002). As vias de sinalização mediadas por ET e AJ são simultaneamente requeridas para a ativação de ERF1, além de terem um efeito sinérgico na expressão da ERF1 (Lorenzo et al., 2003). Esses resultados indicam que algumas respostas de defesa dependem na ação conjunta de AJ e ET e que a ERF1 é uma componente chave da defesa.

O ácido jasmônico (AJ) está envolvido na indução da SAR. O ácido jasmônico e seus derivados, coletivamente chamados de jasmonatos, são oxilipinas que são sintetizadas à partir de ácidos graxos polinsaturados pela ação de lipases, formando o ácido linolênico. Além das lipases, outras enzimas importantes estão envolvidas no processamento do AJ: lipoxigenase (LOX), aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) (Crozier et al., 2000). O papel dos jasmonatos foi descrito para a resposta a ferimentos em tomateiro (Lee e Howe, 2003) e na sinalização sistêmica em Arabidopsis (Truman et al., 2007). Um exemplo clássico de SAR induzida por AJ é a acumulação sistêmica em resposta ao ferimento causado pelo ataque dos parasitas (Farmer e Ryan, 1992). Nesse trabalho, as folhas plantas de tomate atacadas por insetos produzem o peptídeo sistemina, que é translocado pelo floema até folhas superiores. Nas folhas ainda não atacadas, o peptídeo gera a hidrólise de ácido linolênico, que é convertido em AJ para, então, ativar genes codificadores de inibidores de proteinase serínicas de insetos.

1.1.1.2.2. Induzida

A expressão sistêmica da defesa é também observada em plantas colonizadas por microrganismos benéficos. Por exemplo, as rizobactérias que habitam nas raízes e promovem o crescimento das plantas e reforçam a resistência contra patógenos foliares, uma fenômeno referido como 'resistência sistêmica induzida' (ISR) (van Loon et al., 1998; Tuzun e Bent, 1999). A determinação dos níveis de AS em plantas de Arabidopsis expressando resistência sistêmica induzida (ISR) a rizobactérias revelou que este tipo de resistência não está associada ao acúmulo de AS (Pieterse et al., 2000). Várias bactérias não-patogênicas na rizosfera são capazes de induzir resistência não-específica em galhos de algumas plantas. Mais provavelmente, essa forma de resistência pode ser ativa também sob condições naturais, como uma SAR. Entretanto, as rizobactérias não causam sintomas visíveis em plantas, e além disso, elas são capazes de estimular o crescimento da planta.

Algumas rizobactérias ativam ácido salicílico (AS) e outra ativam hormônios vegetais, como o ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (Tuzun and Bent, 2005). De maneira similar, o reforço da resistência à doenças foi descrito em plantas com associações micorrizianas (Pozo e Azcon-Aguilar, 2007).

1.1.1.3. Transdução do sinal de resistência

A resistência localizada em plantas a patógenos biotróficos é classicamente tida como mediada pela sinalização de AS, pois é devida, principalmente, à morte celular programada (PCD). Contrariamente, a resistência a necrotróficos é controlada pelas vias de sinalização de AJ e ET, pois os mesmos se beneficiam da morte celular. Apesar desse modelo ser geralmente válido, existem exceções e complexidades discutidas por Glazebrook (2005).

Para a comunicação entre os órgão colonizados e os não colonizados por patógenos, a vascularização tem um importante papel de condutor na translocação de sinais à longa distância. Os avanços na identificação dos sinais sistêmicos foi recentemente revisada por Shah (2009). O metilsalicilato (MeAS), os jasmonatos, ácido azelaico, e diterpenóides são tidos como ativadores da resistência sistêmica adquirida (SAR), enquanto que as auxinas provavelmente contribuem negativamente para a regulação das defesas sistêmicas. A ligação da sinalização de AS com as respostas de defesa foram revisadas por Loak e Grant (2007). A metilação e a conjugação com aminoácidos em um papel colaborativo na indução das respostas de defesa. As relações com as vias do AJ, ON e ácido abscísico sugerem complexas redes de sinalização que podem regular positivamente ou negativamente o AS. A geração e a transmissão de sinais da SAR foi revisada por Vlot et al. (2008).

A acumulação de AS é requerida para SAR, mas somente no tecido que percebe o sinal sistêmico (Vlot et al., 2008). Foi demonstrado por Vernooij et al. (1994) que o AS não é a molécula translocada no sinal da SAR. Por experimentos de enxertia, esse trabalho mostrou que folhas de plantas de tabaco são capazes de transmitir a SAR, mesmo expressando o gene NahG da salicilato hidrolase (SH). Por outro lado, se a enzima for expressa no tecido atacado, não ocorre a SAR. Estudos recentes indicam que o metil salicilato derivado de AS (MeAS) é um sinal móvel crítico para a SAR (Park et al., 2007) A atividade estereásica da SABP2 (*SA-binding protein 2*) no tecido sistêmico hidrolisa MeAS em AS, provavelmente por retroativação positiva (figura 13). Nos tecidos atacados, o AS inibe a SABP2 para que haja o acúmulo suficiente de sinal MeAS. Por

outro lado, o MeAS não é capaz de induzir a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis* expressando a metiltransferase de arroz OsBSMT1 para AS e ácido benzóico (Koo et al., 2009). As plantas acumularam elevados níveis de MeAS e metilbenzoato, particularmente em resposta à infecção por patógenos, mas não mostraram resposta de defesa significativa nem em resposta à infecção nem a tratamento com AS. Esses resultados confirmaram que MeAS não é biologicamente ativo na defesa.

Alguns trabalhos sugerem que o ET possa ser uma molécula de sinalização da SAR. Ryals et al. (1996) mostraram que o tratamento de plantas com um composto que libera etileno (etefon) resultou no acúmulo de mRNA de proteínas PR. Entretanto, outros trabalhos indicam que em *Arabidopsis* o etileno gasoso não induz a expressão de genes da SAR e que a sensibilidade ao etileno não é condição limitante para a capacidade de desenvolvimento de SAR em resposta aos estresses bióticos e abióticos (Thomma et al., 1998).

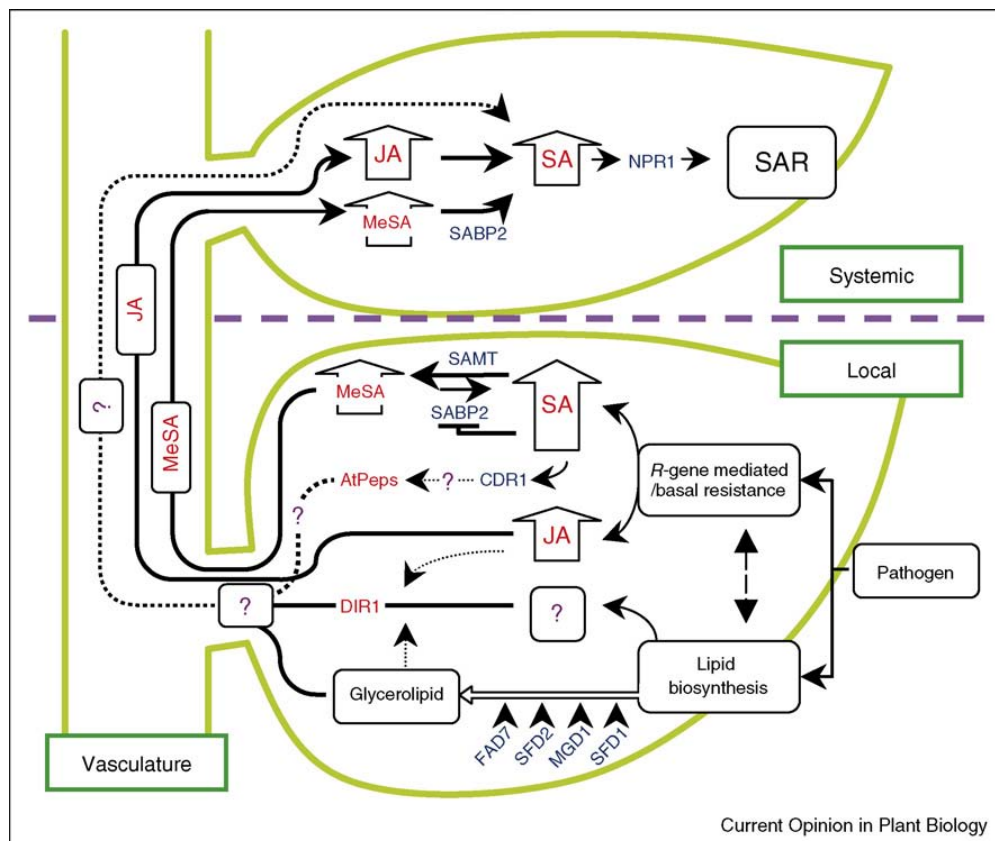


Figura 13 : Esquema ilustrativo da sinalização da SAR: o modelo inclui os componentes MeAS, AJ, fatores derivados de glicerolípídeos e AtPEPs e seu reconhecimento/amplificação sistêmica. As moléculas pequenas são mostradas em vermelho enquanto que as proteínas/enzimas estão em azul. (Vlot et al., 2008)

Os lipídeos parecem estar envolvidos na sinalização. *Arabidopsis* contendo uma mutação DIR1 (defective in induced resistance) que afeta uma proteína transportadora de lipídeos é incapaz de gerar/transmitir a SAR, mas não afeta a resistência na folha inoculada com *P. syringae* avirulenta (Maldonado et al., 2002). A molécula derivada de lipídeo que interage com a DIR1 é desconhecida, mas mutações em diversos genes codificando enzimas envolvidas no metabolismo de galactolipídeos cloroplásticos (FAD7 - fatty acid desaturase 7, SFD1 - suppressor of fatty acid desaturase 1, SFD2, MGD1 - monogalactosyldiacylglycerol synthase 1) aboliram igualmente a SAR sem afetar a resistência basal (Chaturvedi et al., 2008) (figura 13).

A sinalização por peptídeos (Xia et al., 2004) foi proposta pela observação em *Arabidopsis* de indução de SAR à partir da ação da protease aspártica apoplástica CDR1 (constitutive disease resistance 1) (figura 13). O substrato da CDR1 ainda é desconhecido, mas sua função putativa é de transformar as proteínas PROPEP (AtPep1-6) na sua forma ativa (Huffaker et al., 2006). Uma quinase de superfície associado à membrana foi identificada como receptora de AtPep (Huffaker et al., 2007), o que reforça a hipótese de que as AtPeps tenham um papel na sinalização da defesa, mas seu papel na SAR ainda não foi confirmado.

A sinalização pela vascularização é sugerida pela observação de que o ON é gerado nas células do floema de *Vicia faba* após o tratamento com H₂O₂ ou AS (Gaupels et al., 2008). Os autores sugerem que as células ligadas à vascularização possam ser transdutores do sinal sistêmico. Outros sinais possivelmente gerados pelas cascatas de sinalização das MAP quinases, uma vez que algumas dessas enzimas, como a MAP quinase 7 (MKK7) são expressas exclusivamente em tecido vascular de folhas infectadas de *Arabidopsis* (Zhang et al., 2007). O metiljasmonato (MeAJ) também é translocado pela vascularização (Thorpe et al., 2007). O MeAJ funciona como um sinal volátil para carregar o AJ entre tecidos de uma mesma plantas e entre plantas.

1.1.1.1. Silenciamento gênico

O silenciamento gênico é um mecanismo de defesa indutível onde pequenas moléculas de RNA interferentes (siRNA) para atingir especificamente e inativar ácidos nucleicos invasores. O papel dos siRNAs na defesa contra vírus de plantas foi esclarecido há uma década atrás por intermédio de duas descobertas. Primeiro, a infecção viral induz a destruição de RNAs relacionados ao genoma viral invasor, conferindo resistência contra o vírus e sugerindo a existência de um mecanismo de defesa antiviral direcionado

por RNA (Lindbo *et al.*, 1993). Segundo, os vírus de plantas podem codificar potentes repressores do silenciamento como contra-ataque ao sistema de defesa da planta (Kasschau e Carrington, 1998). Atualmente sabe-se que as plantas e outros organismos eucarióticos possuem uma variedade de sRNAs endógenos que partilham características em comum com os si RNAs produzidos durante a infecção viral. Esses sRNAs incluem os microRNAs (miRNAs), *trans-acting* siRNAs, *repeator heterochromatin-associated* siRNAs e *natural antisense transcript* siRNAs (Chapman e Carrington, 2007 ; Vazquez, 2006). Esses sRNAs desempenham funções importantes na regulação gênica de plantas, controlando a programação do desenvolvimento além da resposta aos estresses (Mlotshwa *et al.*, 2008).

O silenciamento de RNA é descrito em eucariotos superiores, mas apresenta características diferentes entre os reinos animal e vegetal e mesmo entre espécies (Mahmood-ur *et al.*, 2008).

As moléculas de RNA pequenas (small RNA ou sRNA) são RNAs não-codantes (ncRNA) que fazem a regulação sequência-específica da expressão gênica de forma. A maioria dos sRNAs são gerados por uma nuclease do tipo Rnase III (Dicer) e funcionam com proteínas Argonauta (AGO) no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), resultando em pequenos RNAs, que por sua vez podem guiar o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) por clivagem/degradação de mRNA ou inibição da tradução, ou então guiar silenciamento gênico transcricional pela metilação e/ou modificação de cromatina. Após a separação dos pequenos RNAs em fita simples, as moléculas de siRNA orientam a clivagem específica do RNA-alvo de sequência complementar.

Com base na estrutura e biogênese de seus precursores, os sRNAs podem ser divididos em microRNAs (miRNAs) e *small interfering* RNAs (siRNAs). Os siRNAs fazem parte do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) que confere resistência aos vírus de plantas (Lindbo *et al.*, 1993). Outros tipos de pequenos RNAs semelhantes aos siRNAs desempenham importante papel na regulação do desenvolvimento de plantas, além da resposta aos estresses: micro RNAs (miRNAs), siRNAs transativos, siRNAs associados a cromatina, e transcritos de siRNAs antisense natural (Mao *et al.*, 2009).

O papel dos sRNAs endógenos de plantas foi recentemente revisado por Padmanabhan *et al.* (2009). O autor discute que embora a defesa mediada por sRNA derivado de vírus seja bem estudada tanto em sistemas animais como vegetais (Ding e Voinnet, 2007), o importante papel dos sRNAs endógenos de plantas no sistema imune

vegetal (Jin, 2008; Voinnet, 2008). Os componentes das vias do miR393 e dos sRNAs têm demonstrado contribuir para a PTI (figura 14 a) (Navarro, 2006). Os patógenos, entretanto, desenvolveram contramedidas, como proteínas efetoras liberadas na célula vegetal, para suprimir a PTI hospedeira e a maquinaria de RNA interferente (figuras 14 b) (Navarro, 2008). Vários siRNAs responsivos a patógenos, como os nat-siRNAs e os Isi-RNAs, desempenham um papel importante nas vias da ETI (figura 14 c). Estudos recentes mostram como os sRNAs endógenos de plantas regulam a imunidade vegetal e como os patógenos inibem a via de silenciamento dos sRNAs, em particular nos patógenos bacterianos. A infecção por patógeno pode alterar a metilação do DNA e modificar a cromatina. Uma hipótese é que a metilação do DNA e a modificação da cromatina possam também serem reguladas por sRNAs endógenos, que contribuem para a evolução dos sistemas imune de plantas em resposta a patógenos.

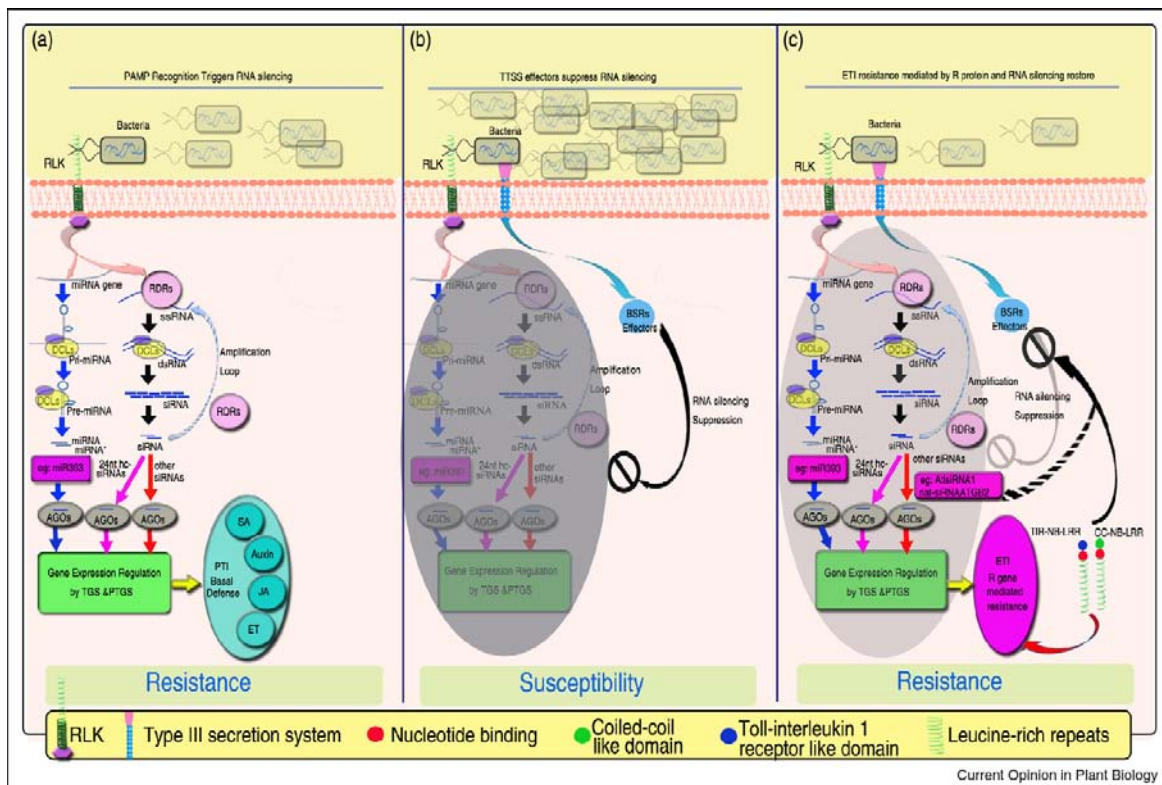


Figura 14: ilustração esquemática da regulação da imunidade inata hospedeira em plantas por pequenos RNAs endógenos. O reconhecimento de MAMPs ou PAMPs provoca as vias dos pequenos RNAs, que são gerados por proteínas DCL (*dicer-like*) e então carregados em proteínas AGO (*argonaute*) para regular transcricionalmente ou pós-transcricionalmente a expressão gênica, o que provoca a PI e as defesas basais (incluindo as vias de AS, auxina, AJ e ET) (a). As bactérias envolveram um sistema BSR (*bacterial silencing repressors*) liberados pela secreção do tipo III nas células hospedeiras para suprimir as vias de pequenos RNAs. (b). As plantas, por sua vez, evoluíram as proteínas R e mais os pequenos RNAs para combater a função dos BSRs (c). (Padmanabhan et al., 2009)

O silenciamento gênico é um mecanismo específico. Ele age apenas em sequências nucleicas homólogas. Então, o silenciamento gênico pode ser visto como uma resistência altamente específica e adaptativa operando no nível de ácidos nucleicos ao invés do nível de proteínas (Király et al., 2007).

O silenciamento gênico desenvolvido por plantas infectadas com determinados vírus pode também agir sistematicamente e ser efetivo em novos galhos das plantas, que exibem resistência a uma segunda infecção viral (Király et al., 2007). Em plantas, o silenciamento não é um evento celular autônomo, sendo que pelo menos dois mecanismos diferentes e separados que podem operar, um para dispersão curta e outro para dispersão sistêmica. O sinal de silenciamento sistêmico é tido como uma molécula de RNA cujas especificidades permanecem alusivas (Kalantidis et al., 2008).

1.1.2. Interação planta-nematoide da galha

Atualmente, poucas informações são disponíveis sobre a interação entre as plantas e os nematoides da galha (RKN), em comparação aos recentes avanços em outras interações planta-patógeno. No caso da *Arabidopsis*, somente a suscetibilidade foi identificada na interação com os RKN, o que torna esta planta-modelo útil nos estudos de compatibilidade com os RKN, mas não nos estudos da incompatibilidade. Assim, uma importante descoberta recente foi a caracterização de um acesso da planta-modelo *Medicago trunculata* resistente à RKN (Dhandaydham et al. 2008). O acesso DZA045 foi resistente à *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla* e não houve diferença temporal na penetração dos nematoides em relação ao acesso suscetível. Entretanto, não foi observada RH na interação incompatível com o acesso DZA045. Apesar disso, menos de 5% da população inicial de nematoides completou o ciclo de vida. Os estudos genéticos do cruzamento do acesso resistente com um acesso suscetível indicam haver um gene responsável pela resistência existente no acesso DZA045. A eventual clonagem do gene *Nem-R* que codifica a resistência em *Medicago* poderá contribuir para o estabelecimento de um sistema-modelo para a interação planta-RKN.

1.1.2.1. Incompatibilidade

Os nematoides parasitas de plantas são parasitas obrigatórios que se alimentam exclusivamente dos compostos citoplasmáticos de células hospedeiras vivas. As interações incompatíveis com os RKN podem ser caracterizadas por morte celular rápida e localizada nos tecidos invadidos, que são sintomas típicos de RH, como em tomateiro

(Dropkin, 1969), pimentão (Pegard et al., 2005) e cafeeiro (Anthony et al., 2005). Os nematoides invasores da fase juvenil 2 (J2) que são circundados por células necróticas não são capazes de se desenvolverem e morrem (Paulson e Webster, 1972).

1.1.2.1.1. A resposta hipersensitiva aos RKN

Permanece obscura a questão sobre se a resposta RH é causa ou consequência da resistência aos nematoides (Williamson e Kumar, 2006). No caso precoce, a RH previne a penetração ou migração do parasita como descrito para o tomateiro (Williamson, 1999). Quando tardia, a RH causa a inibe o desenvolvimento das células gigantes e suprime o desenvolvimento e a multiplicação do parasita, como no caso de amendoineiro *Arachis* (Proite et al., 2008). Entretanto, pode haver resistência ao RKN sem RH, como no trabalho com *Vigna unguiculata* que demonstra a ausência de RH típica no desafio de plantas contendo o gene *Rk* (Das et al., 2008).

Vários autores demonstraram que no local da RH são produzidos ou liberados ROS (Levine et al., 1994, Mellilo et al., 2006), ácido jasmônico (Yoon et al., 2009), óxido nítrico (Ahlfors et al., 2009), compostos fenólicos (Bajaj e Mahajan, 1977, Pegard et al., 2005), fitormônios (Gutierrez et al., 2009) e outros compostos envolvidos na transdução de sinais da resistência. Existem evidências da ligação direta entre o *burst* oxidativo 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 *R Mi* com o RKN *Meloidogyne incognita* (Zacheo e 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 nas interações tomateiro-RKN.

A regulação temporal e a localização da RH variam de acordo com o patossistema, conforme descrito para os genes *Me1* e *Me3* de pimenteira *Capsicum annuum* (Bleve-Zaccheo, et al., 1998), onde a RH em resposta ao nematoide ocorre mais precocemente na presença do *Me3*. Observações histológicas revelaram que os três genes de resistência de amplo espectro de pimenteira (*Me1*, *Me3* e *Me7*) induzem padrões diferentes de resposta a infecção por RKN, conforme a interação entre a linhagem de pimenteira e a espécie de RKN invasora (Pegard et al., 2005).

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 (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 nematoídeos tentaram estabelecer sítio de nutrição. Os estudos ultraestruturais dessa interação incompatível mostraram a reação das células selecionadas pelo nematoídeo 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* var. IAPAR59 (Anthony et al., 2005). Nesse estudo, 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 a acumulação de compostos fenólicos; coloração rosa do material fibroso intercelular, indicando grandes quantidades de pectina. Outra observação interessante é que ocorre formação de alguns sítios de alimentação pouco desenvolvidos, que foram relacionados a nematoídeos colapsados, sugerindo uma ativação tardia da RH. Apesar de todos os indícios, resta confirmar se as reações observadas em cafeeiro são RH características.

1.1.2.1.2. Genes Nem-R

Dos genes de resistência a nematoídeos (Nem-R) clonados (Fuller et al., 2008), o único com que confere resistência à RKN é o *Mi-1* de tomateiro. O primeiro nem-R clonado foi o *HsIpro-1* de beterrabeira, que confere resistência contra o nematoídeo do cisto *Heterodera schachtii* (Cai et al., 1997), mas cuja proteína codificada não tem semelhanças evidentes com genes R de plantas conhecidas (figura). No entanto, os outros genes Nem-R clonados são muito semelhantes aos outros genes R de plantas NBS-LRR (Dangl e Jones, 2001), como o *Mi-1* de tomateiro contra RKN (Vos et al., 1998), *Hero A* de tomateiro contra *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* (Ernst et al., 2002), *Gpa2* de batata contra *G. pallida* (van der Vossen et al., 2000) e *Gro1-4* batata contra *G. rostochiensis* (Paal et al., 2004). Os genes *Mi-1*, *Gpa2* e *Hero A* são membros da classe NBS-LRR de vegetais R-genes que não contêm domínio TIR, enquanto o *Gro1-4* contém a região TIR N-terminal. Os outros membros Nem-R clonados são Rhg1 e Rhg4, que codificam em soja proteínas de resistência a *Heterodera glycines* que possuem motivos extracelulares de LRR (Meksem et al., 2001)

Dentre os primeiros relatos de resistência aos nematoides, estão a descrição de uma variedade de feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) resistente aos RKN (Weber e Orton, 1902) e a resistência aos RKN em cafeeiro (Zimmerman, 1897). Em feijão-fradinho foram feitos o primeiro estudo de herdabilidade (Nilsson-Ehle, 1920) e de mecanismo de resistência (Barrons, 1939) à RKN. O maior avanço na resistência aos RKN foi a introgressão dos *loci* contendo o gene *Mi* em tomateiro *Lycopersicon esculentum* (Smith, 1944). O gene *Mi-1* e. No locus *Mi* são transcritos dois genes, *Mi-1.1* e *Mi-1.2*, com 91% de homologia entre si. O gene *Mi-1.2*, referido como *Nem-R Mi-1*, confere resistência contra os RKN *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Martinez de Ilarduya et al., 2001) e foi clonado por Milligan et al. (1998). Através desse gene foi determinado o papel na regulação da morte de celular localizada da região rica em leucina e do domínio amino-terminal (Hwang et al., 2000).

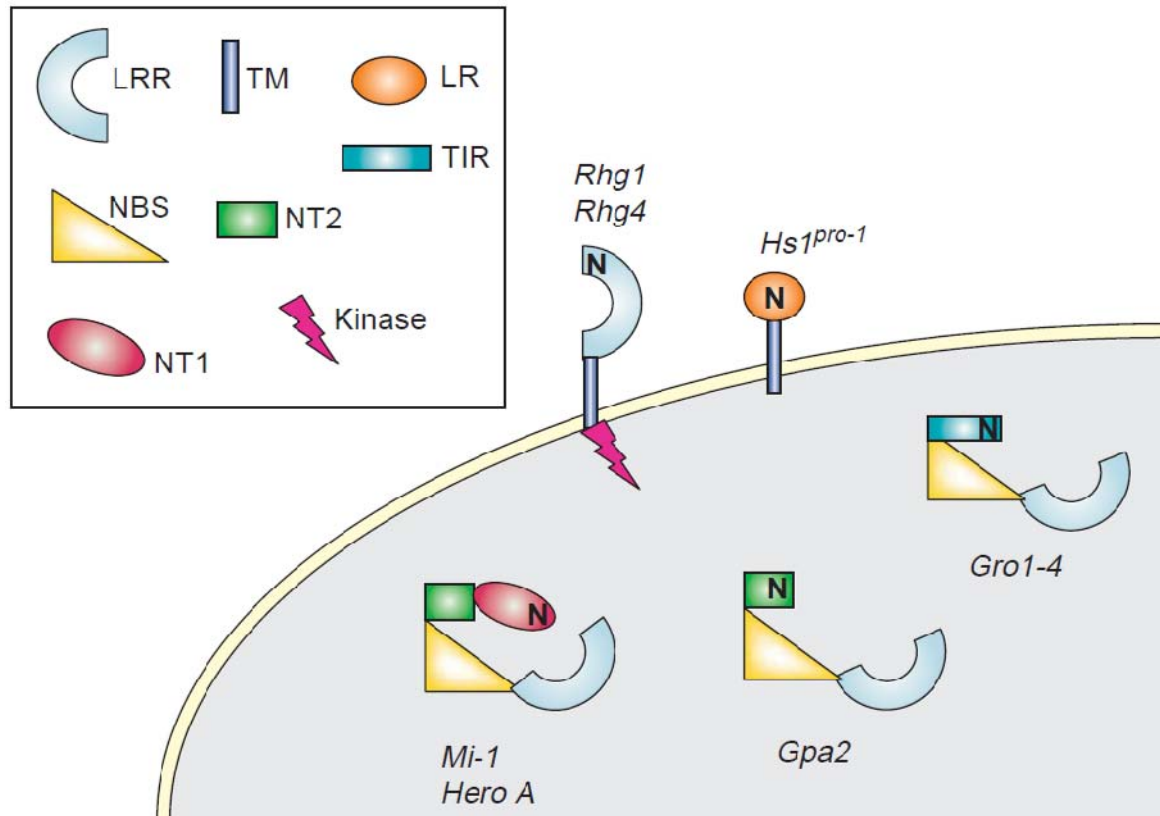


Figura 15: ilustração da comparação entre as estruturas preditas de produtos genes Nem-R. As 5 classes de estruturas de proteínas estão mostradas na sua localização celular predita. As linhas amarelas representam a membrana celular e a área cinza representa o citoplasma. Os genes Nem-R Mi-1, Hero A, Gpa2 e Gro1-4 são preditos como citoplasmáticos, enquanto que Rhg1, Rhg4 e Hs1^{pro-1} são preditos na membrana celular. Os motivos de proteínas são mostrados no quadro em destaque (no alto à esquerda). Abreviações: LR indica uma região rica em leucina; TM, um domínio transmembrânico; LRR, uma região rica em repetições de leucina; kinase, um domínio de proteína quinase; NBS, um motivo conservado contendo um sítio de ligação a nucleotídeo; TIR, domínio receptor do tipo *toll-interleukin*; NT-1, domínio aminoterminal dos genes NBS-LRR com longas regiões N-terminais; NT2, região imediatamente N-terminal à região NBS de genes NBS-LRR não-TIR. O motivo contendo a letra N dentro é no terminal amino da proteína. (Williamson e Kumar, 2006).

Outros genes Nem-R contra RKN foram mapeados mas ainda não foram clonados: Mi-3 (Yaghoobi et al., 2005) e Mi-9 (Ammiraju et al., 2003) de tomateiro, Ma de ameixeira *Myrobolan plum* (Claverie et al., 2004), Rmia de pêssigo *Prunus* (Dirlewanger et al., 2004) Me3 de pimenteira (Dijan-Caporalino et al., 2001) e Rmc1 de batateira (Roupe et al, 1999), CaMi de pimenteira (Chen, et al., 2007).

Em cafeeiro Robusta (*Coffea canephora*) foi identificado o gene *Mex-1* que confere resistência ao RKN *M. exigua* (Noir et al., 2003). Os resultados sugerem que esse gene apresenta dominância incompleta. Posteriormente, marcadores do tipo AFLP foram usados para confirmar a existência de introgressão do *Mex-1* em progênes derivadas do

Híbrido de Timor (Diniz et al., 2005). Cinco dos marcadores usados confirmaram a possibilidade se serem utilizados na seleção assistida (MAS) pois detectaram a presença do fragmento associado à resistência do *Mex-1*.

1.1.2.1.3. Efeitores e genes de avirulência de elicitores do nematoide

A caracterização das secreções expelidas pelos RKN durante a infecção pode contribuir para a melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos nas interações planta-RKN (Abad et al., 2003). As investigações focalizam as espécies partenogênicas *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica*. Embora esses nematoides sejam organismos clonais que se reproduzem assexuadamente por partenogênese mitótica (Triantaphyllou, 1985), genes de expressão diferencial foram identificados em linhagens quase isogênicas (NIL) do RKN *M. incognita* (Neveu et al., 2003). Os resultados desse trabalho indicaram 3 sequências de cDNA putativamente secretadas que podem estar envolvidas na avirulência desse patógeno.

Recentemente foi identificado um transcrito de *M. javanica* candidato a gene efetor de avirulência correspondente ao gene *Nem-R Mi-1* (Gleason et al., 2008). O fragmento de cDNA denominado Cg-1 foi expresso somente na linhagem avirulenta de *M. javanica*. Foi observada a aquisição de virulência após o silenciamento do gene Cg-1 da linhagem *Mi-1*-avirulenta pela técnica de *soaking*. Os resultados indicam que o Cg-1 é requerido na resistência mediada por *Mi-1*.

1.1.2.2. Compatibilidade

Como os nematoides patógenos de plantas são parasitas obrigatórios, as pesquisas sobre as relações planta-nematoide têm sido focalizadas na resposta da planta ao parasitismo, seja nas complexas modificações que alguns nematoides induzem nas células da planta hospedeira ou na resposta de defesa nas plantas resistentes. Atualmente, a tendência é explorar o lado do patógeno na relação, buscando identificar as proteínas do parasitismo à invasão da planta (Bellafiore et al., 2008). Os genes relacionados ao parasitismo do nematoide podem ser ativos em qualquer uma, ou mais de uma, fase do ciclo parasítico, incluindo os estádios anteriores (Davis et al., 2000).

Os RKN causam nas células das raízes das plantas suscetíveis modificações dramáticas para transformá-las em células de alimentação, chamadas células gigantes. Para a formação desses sítios de alimentação, são induzidas mudanças complexas de modulação que alteram a morfologia, a função e a expressão gênica das células da

hospedeira (Bird, 1996; Gheysen and Fenoll, 2002). O crescimento anormal de células seguido de mitoses repetitivas dissociadas da citocinese produz as células gigantes. Essas grandes células de alimentação multinucleadas possuem paredes espessadas que são remodeladas para formar trabéculas, além de citoplasma denso e granular com número aumentado de organelas subcelulares e pequenos vacúolos (figura 16).

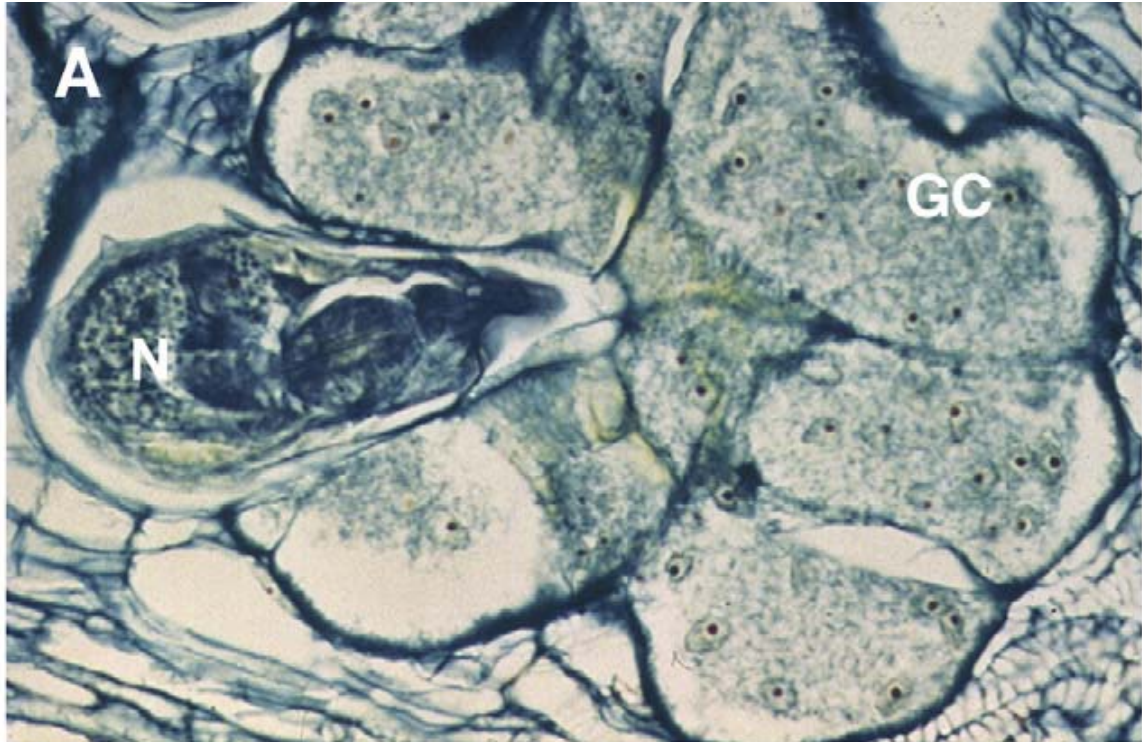


Figura 16: Fotografias de cortes de microscopia de células de alimentação induzidas nas raízes de plantas por neoides sedentários endoparasitas. Células gigantes multinucleadas (GC) induzidas pelo RKN *Meloidogyne incognita*, derivadas da cariocinese desacoplada da citocinese de células de raiz parasitadas adjacentes à cabeça do nematoide (N) (Davis et al., 2004).

Para se alimentarem das células vegetais, os nematoides fitoparasitas são providos de estilete protátil e esôfago com marcantes adaptações morfofisiológicas (figura 17). O esôfago tem um metacorpo muscular contendo uma câmara de bombamento trirradiada (Saunders e Burr, 1978) e três grandes e complexas glândulas secretoras (Endo, 1984; Hussey e Mims, 1990). Essas glândulas são as principais fontes de secreções envolvidas no parasitismo de vegetais. Cada glândula é uma única célula secretora grande e especializada que contém um grande núcleo lobado com nucléolo proeminente, abundantes de corpúsculos de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, grânulos de secreção e outras organelas típicas de células secretoras (Burgess e Kelly, 1987). As glândulas terminam em uma ampola de armazenamento que é conectada ao lúmen

esofágico por uma válvula. As proteínas de secreção são sintetizadas na região nuclear da glândula e armazenadas em corpúsculos de Golgi que são transportados ao longo de microtúbulos até a ampola. Durante a secreção, as proteínas secretoras armazenadas nos grânulos são liberadas para a válvula, de onde são injetadas através do estilete no tecido da hospedeira.

A função das secreções produzidas pelas células glandulares esofágicas evoluíram junto com os glândulas para habilitar os nematoides a se alimentarem de células vegetais e modificá-las em complexos sítios de nutrição (Hussey, 1989; Davis et al., 2000). Alterações morfológicas e ultraestruturais nas glândula esofágicas são correlacionadas com as fases de desenvolvimento do ciclo de vida dos nematoides endoparasitas sedentários. As glândulas subventrais são as mais ativas durante o segundo estágio infeccioso juvenil (J2), mas após o aparecimento de parasitismo (penetração nos tecidos da planta de hospedeira e criação de sítios de alimentação), a glândula dorsal é que predomina nas fases parasitárias. Essas alterações nas glândula esofágicas durante o ciclo parasitário indicam várias funções para as proteínas secretadas pelas glândulas duranteas diferentes fases do parasitismo.

Mesmo sendo bastante estudado, o processo de indução de células gigantes ainda está longe de ser entendido. A exigência temporal de um sinal específico indutivo é desconhecida. No modelo de desenvolvimento “switch” (Bird, 1996) uma indução transitória é suficiente, mas alguma interação contínua entre o parasita e células gigantes é necessária pois a remoção do RKN leva à dissolução do sítio de alimentação. O estímulo constitutivo pode ser simplesmente um efeito fisiológico causado pelo esgotamento metabólico da alimentação (Jones e Northcote, 1972) ou algo mais específico.

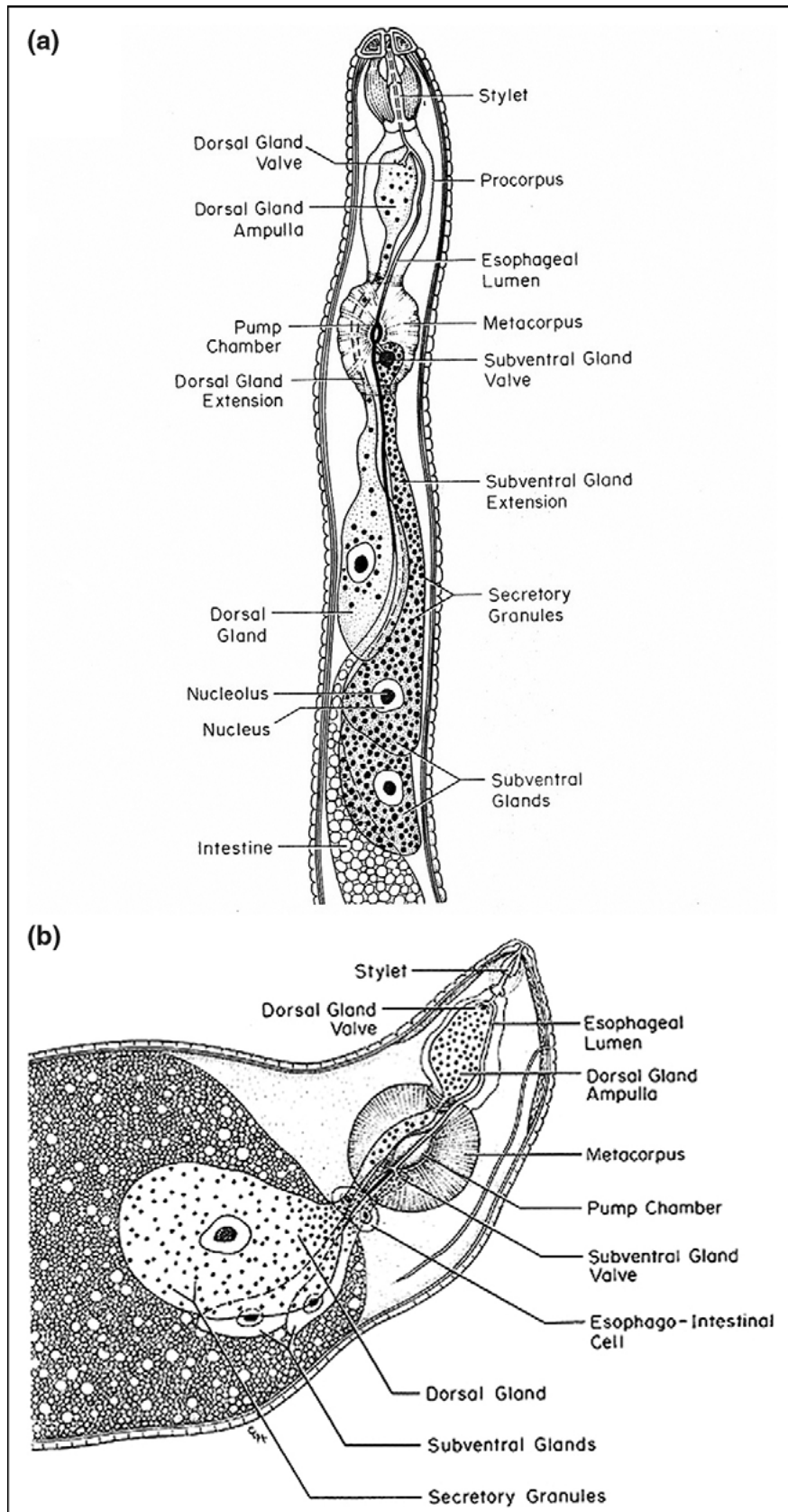


Figura 17: parte anterior de nematoide fitoparasita mostrando em (a) juvenil do segundo estágio com glândulas subventrais aumentadas e (b) fêmea com a glândula dorsal aumentada (Hussey, 1989).

1.1.2.2.1. Genes do parasitismo e efetores de virulência dos RKN

A forma infectiva J2 invade a raiz por meio de enzimas que degradam as paredes celulares dos tecidos epidérmicos e corticais. Uma vez estabelecido na raiz, o nematóide deve produzir enzimas detoxificadoras, seguidas pelos efetores adicionais que induzem a formação da célula gigante. Diversas hipóteses foram propostas explicar como *M. incognita* estabelece a compatibilidade com a hospedeira. Uma abordagem para a identificação de proteínas secretadas é a estratégia do gene do candidato, baseada no conhecimento do parasitismo da planta por bactérias, fungos e nematoides. Tais genes podem ser isolados por PCR usando-se oligonucleotídeos degenerados baseados nos motivos conservados das proteínas, ou identificados nos bancos de ESTs ou no genoma completo do *M. incognita*. Essa estratégia permitiu, por exemplo, o isolamento dos genes que codificam celulases e as pectinases de *M. incognita* (Abad *et al.*, 2003). À partir do cDNA de *M. incognita* no estágio juvenil 2 (J2), foi recentemente clonada e caracterizada (Fragoso *et al.*, 2009) uma proteinase aspártica tipo catepsina D de (Mi-asp1). O gene da enzima b-1,4 endoglucanase de *M. incognita*, que faz parte das enzimas modificadoras de parede celular vegetal, foi caracterizado por Ledger *et al.* (2006).

O conteúdo predominantemente proteico das moléculas secretadas das glândulas esofágicas de diversas espécies de nematóides de planta foram monitoradas com anticorpos (Hussey e Davis, 2004). Outros estudos mostraram a redução da patogenicidade de *Meloidogyne* spp. após o silenciamento dos genes expressos nas glândulas subventrais (Rosso *et al.*, 2005 ; Shingles *et al.*, 2007). A identificação das proteínas secretadas por *M. incognita* pode facilitar a descoberta dos efetores e de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Atualmente ainda não foram relatados PAMPs de metazoários como os RKN. O estudo dos efetores pode esclarecer como os RKN reprogramam as células da planta para transformá-las em células gigantes que irão constituir as galhas na raiz.

Os genes efetores patogênicos geralmente mostram alto nível de polimorfismo, o que reflete a luta co-evolutiva entre a hospedeira e o patógeno (Boller e He, 2009). As proteínas do parasita efectoras de virulência constituem alvos potenciais para a investigação molecular com a finalidade de controlar o desenvolvimento da infecção por RKN. Dentre os candidatos de proteínas do parasitismo secretadas pelos nematoides (Davis *et al.*, 2008), estão incluídas as enzimas modificadoras de paredes celulares, reguladores do ciclo celular e do metabolismo da hospedeira, proteínas nucleares das

células gigantes, supressores de defesa da hospedeira, proteínas mimetizadoras de moléculas vegetais.

A calreticulina de *M. incognita* (Mi-CRT), isolada de glândulas esofágicas de J2, é secretada durante as fases migratória e sedentária do RKN (Jaubert et al., 2005) e se acumula ao longo da parede celular das células gigantes. Os resultados desse trabalho sugerem que a Mi-CRT possa ter um papel no estabelecimento do parasitismo.

A abordagem *in silico* foi utilizada para a análise do secretoma (conjunto de transcritos de proteínas secretadas) do *M. chitwoodi* (Roze et al., 2008). Foram identificados 11 candidatos a genes do parasitismo de RKN. Por posterior hibridização *in situ* com os membros mais abundantes do secretoma resultaram na identificação de genes específicos de glândulas subventrais, 1 específico de glândula dorsal, 2 específicos de intestino e 1 da região caudal.

Para viabilizar os estudos do secretoma do *M. incognita*, Bellafigliore et al. (2008) recolheram a secreção J2 e submeteram as proteínas desse material à espectrometria de massa. As análises bioinformáticas das proteínas candidatas confirmaram a presença de factores já descritos como produzidos e segregados pelas glândulas subventrais de nematoide. Além desse resultado, foram encontrados novos factores que podem desempenhar um papel importante na supressão dos mecanismos de defesa das plantas e no controle da expressão gênica células gigantes, tais como: chaperonas; enzimas modificadoras de parede celular, de detoxificação oxidativa; proteínas direcionadas para expressão no núcleo vegetal e proteínas reguladoras da proliferação celular de células vegetais. A maioria das proteínas secretadas foi localizada nas glândulas subventrais por experimentos de hibridização *in situ*. Certos factores potenciais encontrados possuem sequências para a localização nuclear e poderiam agir sobre remodelagem da cromatina da célula vegetal.

A regulação das células hospedeiras por RKN pode ocorrer no nível transcricional, de acordo com os resultados obtidos com o peptídeo de secreção 16D10 de *M. incognita* (Huang et al., 2006a). Foi demonstrado que o efector 16D10 estimula o crescimento da raiz interagindo diretamente com dois factores de transcrição do tipo SCARECROW da planta. A regulação dos factores de transcrição pela proteína do parasita pode afetar a transcrição de genes da transdução de sinais envolvidos na proliferação das células. O 16D10 é conservado nas espécies de RKN e parece mediar um evento de sinalização precoce em interações nematóide-hospedeira. Testes *in vitro* e *in vivo* de RNAi foram utilizados para silenciar este gene do parasitismo em RKN (Huang et al., 2006b). Foi

demonstrado que plantas transgênicas de *A. thaliana* expressaram e processaram o dsRNA homólogo aos transcripts de 16D10, gerando siRNAs de 21 bp. A infecção destas plantas transgênicas com quatro espécies de RKN resultou em menor produção de galhas e ovos. Os resultados validaram a função essencial do gene *16D10* no parasitismo do RKN em plantas, resultando na infectividade reduzida do nematóide. Assim, a expressão de dsRNA do 16D10 em *Arabidopsis* resultou na resistência efetiva contra as quatro espécies principais de RKN.

Uma grande quantidade de informações que concernem os RKN estão sendo disponibilizadas, sob a forma de sequências expressas (EST)(Neveu et al., 2003, Dubreuil et al., 2007; Fosu-Nyarko et al., 2009) ou genomas completos (Abad et al., 2008; Bird et al., 2009). Para alargar os limites do conhecimento sobre os nematóides fitoparasitas, diferentes estratégias estão sendo adotadas para explorar as informações fornecidas por sequências gênicas. A genômica comparativa busca associar os novos genes identificados com o modo de vida parasitário. A análise funcional de genes procura avançar para estudar os perfis de expressão em larga escala. A interferência por RNA (RNAi) visa a validação funcional de genes em plantas e no nematóide. Com os novos resultados a serem obtidos, futuramente deverão ser desvendados os genes participantes no estabelecimento e desenvolvimento das células gigantes e sítios de alimentação.

1.1.2.2.2. Genes da suscetibilidade da planta

Genes de plantas com funções conhecidas ou putativas foram encontrados com sua expressão ativada ou suprimida, sugerindo que os RKN e nematoides do cisto induzem alterações transcricional nas células de alimentação parasitadas (Bird, 1996; Gheysen e Fenoll, 2002; Wang et al., 2003) (figura 18).

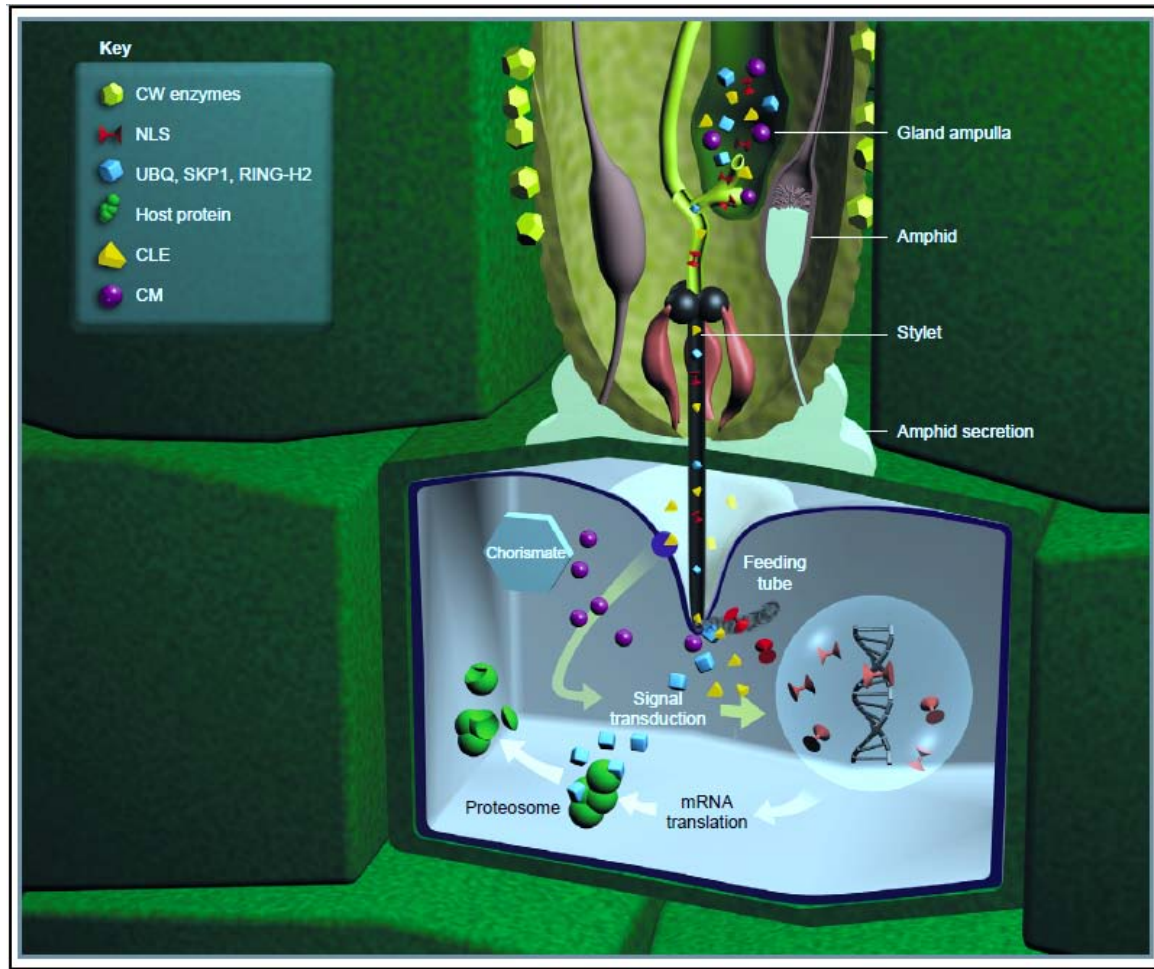


Figura 18: ilustração do modelo das interações potenciais dos produtos secretados dos genes de parasitismo dos fitonematoídeos nas células hospedeiras. As secreções da glândula esofágica são liberadas através de válvulas dentro da ampola para o transporte para for a do estilete (canal de alimentação) nos tecidos hospedeiros. As proteínas modificadoras de parede celular (CW), que são as endoglucanases, enzimas pectinolíticas, xilanases e expansinas, podem ser secretadas para ajudar a migração dos juvenis infectivos através dos tecidos da hospedeira. Outras secreções glandulares de nematoídeo podem ter múltiplos papéis na formação de células de alimentação especializadas pelo nematoídeo, incluindo: efeitos no metabolismo da hospedeira pela corismato mutase secreta (CM); sinalização pelos peptídeos secretados pelo nematoídeo, como os homólogos de CLAVATA3/ESR (CLE); degradação seletiva das proteínas através da via ubiquitina-proteossoma (UBQ), proteína associada à fase S (Skp-1) e RING-H2 secretada pelo nematoídeo; efeitos potenciais das proteínas secretadas pelo nematoídeo que contêm sinais de localização nuclear (NLS) dentro do núcleo da célula hospedeira. (Davis et al., 2004).

O RPE de *Arabidopsis*, que codifica uma enzima similar à RPE (*D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase*), foi o primeiro gene de suscetibilidade à RKN isolado (Favery et al., 1998). Esse gene é essencial na etapa precoce da formação dos sítios de alimentação do *M. incognita*. A acumulação da RPE em sítios de alimentação foi confirmada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) de transcritos de células gigantes de batateira.

No processo de formação das células gigantes, os RKN induzem a modificação do ciclo celular (de Almeida Engler et al., 1999; Favery et al., 2002) e a reorganização do citoesqueleto de actina e dos microtúbulos (de Almeida-Engler et al., 2004; Favery et al., 2004; Jammes et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado em *Arabidopsis* por avaliação da expressão gênica, RNAi e imunoprecipitação *in situ* que o fator de despolimerização da actina (ADF) é essencial para a infecção por RKN e para o desenvolvimento normal da planta. Os resultados mostraram o aumento do nível transcricional de 5 genes *ADF* em galhas, particularmente do *ADF2* entre os dias 14 e 24 após a infecção. Além disso, a estabilização da F-actina causada pela redução dos níveis celulares de ADF interferiu no crescimento celular e no desenvolvimento das galhas.

Os flavonoides podem ser dispensáveis para a formação de células gigantes pelos RKN (Wasson et al., 2009). Utilizando RNAi para silenciar genes da via biossintética dos flavonóides em *M. trunculata*, foi estudada a formação de células gigantes em galhas de raízes deficientes em flavonóides. Os autores observaram células gigantes normais, embora as galhas fossem menores e caracterizadas por um número reduzido de ciclos de divisão pericíclica.

Os genes de vias metabólicas importantes para a formação de células gigantes foram discutidos por de Almeida Engler et al. (2005). Foram sugeridos os hormônios auxina (Koltai et al., 2001; Karczmarek et al., 2004) e citocinina (Lohar et al., 2004; Bird, 2004), sequências reguladoras do tipo heat shock (Escobar et al., 2003), enzimas envolvidas na modificação de paredes celulares (Goellner et al., 2001; Vercauteren et al., 2002; Mitchum et al., 2004) e do metabolismo geral (Wang et al., 2003).

1.1.2.3. A sinalização da interação planta-nematoide

Como não foram encontrados genes de resistência naturais em *Arabidopsis*, uma vasta coleção de ferramentas moleculares e recursos genéticos desta planta-modelo não estão disponíveis para o estudo da interação planta-nematoide.

Dentre os elementos transdução de sinais da resistência conferida pelo gene *Mi-1*, foi estudada a mutação recessiva chamada *rme1* (resistance to Meloidogyne species), que é localizada em um único locus distinto do *Mi-1* (Martinez de Ilarduya et al., 2001). Entretanto, essa mutação é capaz de abolir completa e especificamente a resistência mediada pelo *Mi-1* (Martinez de Ilarduya et al., 2004). Nesse trabalho, os autores sugerem que o produto gênico RME1 deve ser uma proteína quinase que age anteriormente em relação ao *Mi-1*, ou precocemente na via de transdução de sinais da

resistência. Essa hipótese levanta a possibilidade de que RME1 seja alvo para efetores AVR de diferentes patógenos, e que desta forma o produto de *Mi-1* poderia detectar mudanças em RME1 derivadas da interação com os efetores.

A implementação de VIGS (*virus-induced gene silencing*) foi utilizada na identificação de potenciais candidatos que possam funcionar na cascata da transdução de sinal da resistência conferida pelo gene *Mi-1* aos RKN (Bhattarai et al., 2007; Schaff et al., 2007). No trabalho de Schaff et al. (2007), os autores observaram que na ausência de RKN apenas um gene, codificando uma glicosiltransferase, foi diferencialmente regulado entre os transcriptomas de planta sensível e resistente (contendo o *Mi-1*). O silenciamento da expressão dessa glicosiltransferase restituiu a suscetibilidade ao *M. incognita* na planta resistente, indicando que a função dessa enzima é necessária para a resistência mediada pelo *Mi-1*. Os autores sugerem que a glicosiltransferase possa ter um papel na resistência aos RKN. Essa proteína parece estar implicada na biossíntese de carboidratos e associada ao estresse na planta e às respostas de defesa (Dixon, 2001; Qi et al., 2005; Vogt and Jones, 2000) e na síntese de parede celular (Egelund et al., 2004; Lao et al., 2003). Foi estudado por Bhattarai et al. (2007) o silenciamento dos genes *Rar1*, que age na sinalização de respostas de resistência induzidas por fungos e vírus (Liu et al., 2002); *Sgt1*, que interage com *Rar1* na resistência mediada por genes R (Azevedo et al., 2002) e HSP90, envolvidos nas respostas de genes R. A HSP90 demonstrou ser um componente necessário para a resposta de resistência aos RKN, pois os patógenos foram capazes de sobreviverem e se alimentarem de tecidos com níveis atenuados de HSP90 (Takahashi et al., 2003). O silenciamento de *Sgt1* não comprometeu o desenvolvimento dos RKN, resultado que foi discutido como um artefato da atenuação incompleta desse gene. Nesse trabalho foi sugerido um modelo de transdução de sinal do gene *Mi-1* onde o AS tem um papel ajuante na resistência.

O papel dos fitormônios ET e auxina na mediação do desenvolvimento dos sítios de alimentação e na interferência do parasitismo dos nematoides foram revisados por Gutierrez et al. (2008). Dos trabalhos citados, apenas a investigação feita por Karczmareck et al. (2004) obteve resultados para os RKN. Utilizando um promotor que responde à auxina artificial, os autores observaram que no início do desenvolvimento das células de alimentação pelos RKN ocorreu acúmulo localizado de auxina. A partir desses resultados, juntamente com a resposta semelhante obtida para o nematoide do cisto, a auxina foi considerada um importante indicador da indução das células gigantes.

Os avanços recentes relativos às sinalizações pelo AJ e AS nas interações raiz-biotróficas foi revisada por Gutjahr e Paszkowski (2009). De acordo com essa revisão, os efeitos de AJ e AS nas associações explorativas com nematoides são ainda pouco conhecidas. Em relação ao AS, foi demonstrado que a pulverização foliar de AS em quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) causou a diminuição da infecção por RKN (Nandi et al., 2003). Em trabalho recente em plantas suscetíveis de tomateiro transformadas com o gene da salicilato hidrolase (NahG), Bhattarai et al. (2008) mostraram que baixos níveis de AS são suficientes para mediar a resistência conferida pelo gene *Nem-R Mi-1*. Nesse mesmo trabalho, foi sugerido que o AJ não é requerido para a resistência em tomateiro carregando o gene *Mi-1*, mas ao contrário, pode promover a suscetibilidade em plantas mutantes *jai1* (defective in the JA-Ile receptor component COI1). De forma resumida, o entendimento sobre a sinalização no parasitismo de nematoides indica que AS geralmente promove a defesa de maneira similar à interação folha-biotrófico, enquanto que o papel do AJ parece favorecer o parasitismo. Entretanto, a SAR não se mostrou efetiva contra a indução de SAR em tomateiro tratado com análogos sintéticos de AS conhecidos por induzirem os genes PR (Sanz-Alférez et al; 2008). Após a aplicação de INA (ácido 2,6-dicloroisonicotínico) e BHT (ácido benzol (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico S-metilester), as plantas tratadas exibiram infestação de *M. javanica*, embora o número de galhas tenha sido significativamente reduzido. Os genes marcadores de SAR PR-1b e PR-2, além do PR-3, foram induzidos pelo tratamento químico com INA e BHT. Porém, a expressão desses genes foi reprimida após a infecção com o RKN, o que os autores sugerem que possa ter causado a baixa redução da produção de galhas (25%). O gene PR-5, de maneira inversa, não foi afetado pelo tratamento com os elicitores de SAR, mas a infecção induziu a expressão desse gene de defesa.

1.2. A transformação genética na resistência do cafeeiro

O melhoramento genético do cafeeiro é limitado por algumas características intrínsecas à sua cultura, como o longo ciclo de vida e diferentes formas de reprodução. Apesar da maioria das espécies de café serem alógamas, a espécie *C. arabica* é autógama (Davis et al, 2006), o que limita a possibilidade de exploração da variabilidade genética existente, principalmente no que se refere ao potencial representado pela heterozigose. Assim, a incorporação de técnicas biotecnológicas como cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética podem favorecer sobremaneira o melhoramento de

genótipos de cafeeiro, permitindo a identificação e introdução de genes em novas variedades com maior produtividade e qualidade de bebida.

A transformação genética permite a agregação de valores em plantas de interesse agrônômico. Atualmente, culturas de plantas geneticamente modificadas são cultivadas em 25 países (figura 1), dos quais 15 são países em desenvolvimento (ISAAA, 2008). O Brasil ocupa a terceira posição na lista dos maiores produtores de transgênicos, com 15,8 milhões de hectares cultivados de soja, algodão e milho.

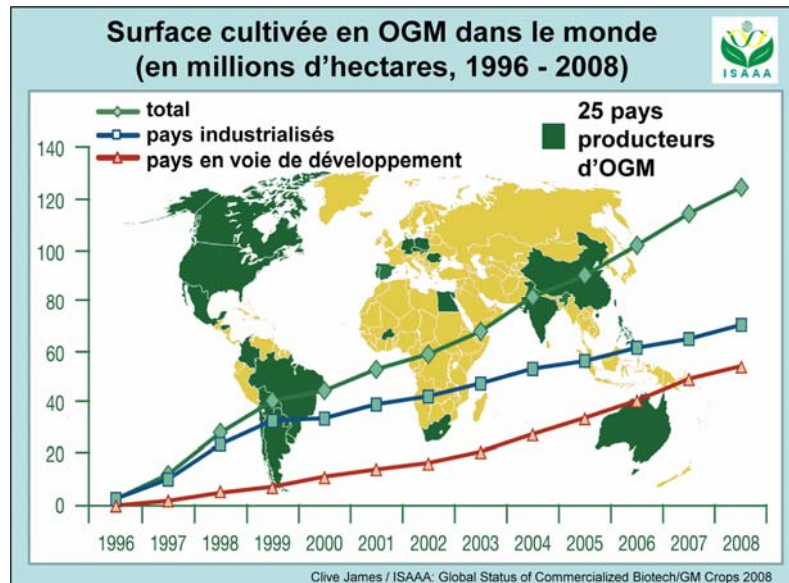


Figura 1: Levantamento da superfície agrícola com culturas geneticamente modificadas no mundo de 1996 a 2008.

O fato de o cafeeiro ser uma planta perene resulta numa exposição prolongada a diversos estresses bióticos e abióticos, facilitando enormemente o aparecimento de novas doenças e pragas e sensibilidade às adversidades ambientais. Assim, o foco da pesquisa biotecnológica do cafeeiro visa o aumento de resistência a estressesna planta e da qualidade de bebida (Etienne *et al.*, 2002). Existe uma grande quantidade de informação sobre o perfil de expressão gênica em cafeeiro sob condições ambientais variadas, após desafio com patógenos e em diferentes fases de desenvolvimento de frutos. As informações se encontram em bancos de sequências expressas (ESTs) produzidos por grupos de pesquisa interessados em identificar genes candidatos ao melhoramento de *C. arabica* (Fernandez *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2006). Os dados derivados dos bancos de ESTs estão sendo estudados com o intuito de isolar e validar a função de genes do cafeeiro. Para tanto, a transformação genética de cafeeiro, em especial de *C. arabica*, constitui uma ferramenta importante para o estudo funcional de genes e a obtenção de plantas transformadas.

1.2.1. Transformação genética de plantas lenhosas

A regeneração de plantas lenhosas *in vitro* apresenta dificuldades em relação à cultura de tecidos. O tempo necessário para a obtenção das plantas e formação de progênes torna a transformação genética um processo lento e trabalhoso. Dentre as lenhosas, existem poucos relatos em transformação de plantas frutíferas de uso comercial. Um dos exemplos é a introdução do inibidor de proteinase de *Nicotiana glauca* (*Na-PI*) na cultivar 'Royal Gala' de macieira (*Malus x domestica* Borkh), o que confere resistência à lagarta de *Epiphyas postvittana* (Maheswaran *et al.*, 2007). Outro exemplo é das sequências senso e anti-senso do gene da ACC oxidase (*ACO*) que foram introduzidas em pera (*Pyrus communis* cv. 'La France') para o controle da maturação do fruto (Gao *et al.*, 2007). A expressão dos transgenes nesses trabalhos foi avaliada em tecidos vegetativos, mais precisamente nas folhas de macieira e nos ramos de pereira transformada. Por outro lado, resultados recentes de modificação genética de videira (*Vitis vinifera* L.) da expressão de álcool desidrogenase (*Adh*) foram avaliados nos bagos de uva (Torregrosa *et al.*, 2008). As análises revelaram resultados interessantes, pois houve contraste entre o conteúdo de compostos fenólicos e voláteis das folhas e dos frutos derivados de uma mesma planta transformante. Os autores sugeriram que a alteração da expressão genética possa induzir respostas variáveis entre diferentes órgãos de um indivíduo, como demonstrado para as folhas e frutos de videira transgênica.

O gene marcador *uidA*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) (Jefferson *et al.*, 1987), continua sendo de grande valia para os estudos de expressão transiente, de promotores espécie ou tecido-específicos e também para o aprimoramento da transformação genética de plantas lenhosas. Algumas espécies de frutas comerciais, como o pêssego (*Prunus persica*), mostraram que a taxa de recuperação de transformantes à partir de explantes de sementes foi superior com a seleção por GUS comparada com GFP (Green Fluorescent Protein, Haseloff, 1995) (Padilla *et al.*, 2006). A expressão transiente em protoplastos obtidos à partir de tecidos do fruto imaturo de pêssego foi analisada por GUS (Honda *et al.*, 2006). Recentemente, Maghuly *et al.* (2008) estudaram o nível de expressão do promotor CaM do gene da calmodulina (*CaM*) de macieira em fusão com o gene *uidA* em *P. incisa* \times *serrula*. A estabilidade a longo prazo (9 anos) do gene *uidA* sob o controle do promotor 35S em lenhosas foi descrita no trabalho de Maghuly *et al.* (2007) em cerejeira ornamental (*P. subhirtella*). O gene *uidA* foi utilizado na obtenção das primeiras plantas transgênicas de cafeeiro, primeiramente com *A. rhizogenes* e depois

com *A. tumefaciens* (Spiral *et al.*, 1999; Hatanaka *et al.*, 1999), resultando em plantas expressando a proteína GUS.

1.2.2. Transformação genética de cafeeiro

As metodologias de transformação genética dependem da cultura de tecidos *in vitro* para a regeneração de células transformadas. A regeneração via embriogênese somática foi bastante documentada a partir de 1970 para várias espécies e genótipos de café (Starisky, 1970), sendo este sistema *in vitro* considerado modelo por sua alta eficiência (Sondahl e Loh, 1988). A embriogênese somática pode ocorrer de forma direta, na qual os embriões são formados diretamente do explante ou com pouca formação de calos primários, ou por via indireta, onde há formação de calos secundários de onde surgem os embriões (Sondahl e Sharp, 1977; Dublin, 1984; Pierson *et al.*, 1983). Os principais fatores que determinam que as células sigam a via direta ou indireta da embriogênese são os reguladores de crescimento. Estudos realizados em café mostram que reguladores de crescimento tipo citocininas, como 2iP (2-isopenteniladenina) e BAP (6-benzilaminopurina), induzem a embriogênese direta, como relatado por Yasuda *et al.* (1985), trabalho no qual foi utilizado 5 μM de BAP para produzir embriões somáticos em explantes foliares de *C. arabica*. Por outro lado, reguladores de crescimento tipo auxinas são necessários para a indução de calos e posteriormente de embriões; este efeito foi observado em café, no qual a utilização de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) resulta em embriogênese indireta (Sondahl & Sharp, 1977). A indução de embriogênese indireta de alta frequência foi obtida com sucesso em *C. arabica* cv Catuaí vermelho (Teixeira *et al.*, 2004) com doses aumentadas de 2,4-D (20 μM).

A alteração genética de características de interesse agrônomo para o cafeeiro foi relatada em poucos trabalhos. O gene da endotoxina *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência ao bicho-mineiro (*Perileuoptera coffeella*), foi inserido por intermédio de co-cultivo com *A. tumefaciens* em *C. canephora* e *C. arabica* (Leroy *et al.*, 2000). O conteúdo de cafeína nas células embriogênicas e de plântulas de *C. canephora* foi reduzido pela estratégia de interferência da expressão gênica (RNAi) do gene da xantosina metiltransferase (XMT) da via de biossíntese de cafeína de cafeeiro, que codifica a CaMXMT1 (Ogita *et al.*, 2004).

Existe grande demanda para o melhoramento de variedades de *C. arabica* devido à sua qualidade de xícara superior. A transformação genética de células e tecidos da

espécie *C. arabica* foi demonstrada (Van Boxtel *et al.*, 1995; Fernandez-Da Silva & Menéndez-Yuffá, 2003; Rosillo *et al.*, 2003). A metodologia mediada por *Agrobacterium* permitiu a obtenção de plantas de *C. arabica* transformadas, mas resultou em baixa eficiência em relação aos resultados na espécie *C. canephora* (Leroy *et al.*, 2000). A transformação direta pelo método de bombardeamento foi demonstrada para a espécie *C. canephora* por Ribas *et al.* (2005), onde foram obtidas plantas expressando os genes de resistência à fosfotricina e de GUS.

Desta forma, pode-se afirmar que atualmente é possível utilizar a transgenia no melhoramento de variedades de cafeeiro. Essa ferramenta molecular deverá auxiliar: a caracterização funcional dos genes envolvidos nos mecanismos da resistência, a formação de bancos de mutantes, o desenvolvimento de marcadores genéticos, o aumento ou silenciamento da expressão genes e a introdução de genes implicados na defesa aos patógenos. Podemos vislumbrar o esclarecimento dos mecanismos gênicos da resistência do cafeeiro aos nematóides por intermédio da transformação genética, bem como na geração de novas variedades com resistência durável aos nematoides.

2 FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese é composta por três capítulos. Ao final da tese são apresentadas a Discussão Geral e a Bibliografia Completa.

Capítulo 1. Identificação e caracterização da resistência à *M. incognita* em cafeeiro

- 1A. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in
Coffea arabica

Este manuscrito está no prelo da revista European Journal of Plant Pathology.

Article DOI: 10.1007/s10658-010-9603-3

Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*

Erika Valéria Saliba Albuquerque^{a,c}, Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro^a, Poliene Martins Costa^a; Ana Cristina Meneses Mendes Gomes^a, Marcilene Santos^a, Antonio Alves Pereira^b, Michel Nicole^c, Diana Fernandez^{c*} and Maria Fatima Grossi-de-Sa^a

^a*Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, 70849-970, Brazil;*

^b*CRZM, EPAMIG, Viçosa-MG, 36570-000, Brazil;*

^c*IRD- Institut de Recherche pour le Développement - UMR-186 IRD-Cirad-UM2 "Résistance des Plantes aux Bioagresseurs", BP 64501, Montpellier-Cedex 5, 34394, France;*

*Corresponding author. Fax : +33 467 41 6283 ; *E-mail address:* Diana.Fernandez@ird.fr

Keywords: *Coffea arabica*, hypersensitive-like response, *Meloidogyne*, resistance, root-knot nematode.

Abstract

Root-knot nematodes (RKN) are obligate parasite species of the genus *Meloidogyne* that cause great losses in Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) plantations. Identification of resistant genotypes would facilitate the improvement of coffee varieties aiming to an environmental friendly and costless nematode control. In this work, the *C. arabica* genotype 'UFV 408-28' was found to be resistant to the most destructive RKN species *M. incognita*. Pathogenicity assays indicated that the highly aggressive populations of *M. incognita* races 1, 2 and 3 were not able to successfully reproduce on 'UFV 408-28' roots, displaying a low gall index (GI=2). An average of 87 % reduction of *M. incognita* population was observed on 'UFV 408-28' when comparing to the susceptible cultivar 'IAC 15'. Differently, 'UFV 408-28' was susceptible to the related species *M. exigua* and *M. paranaensis* (GI= 5 and 4, respectively). Histological observations performed on sections of UFV408-28 roots infected with *M. incognita* race 1 showed that nematode infection could be blocked right after penetration or during migration and establishment stages, at 6, 7 and 8 days after infection (DAI). Fluorescence and bright field microscopy observations showed that root cells surrounding the nematodes exhibited HR-like features such as accumulation of phenolic compounds and a necrotic cell aspect. In the susceptible 'IAC 15' roots, 6 DAI, feeding sites contained giant cells with a dense cytoplasm. Necrotic cells were never observed throughout the entire infection cycle. The HR-like phenotype observed in the 'UFV 408-28' - *M. incognita* interaction suggests that the coffee resistance may be mediated by a *R* gene-based immunity system and may therefore provide new insights for understanding the molecular basis of RKN resistance in perennial crops.

Introduction

Root-knot nematodes (RKN) of the genus *Meloidogyne* are biotrophic plant parasites with a broad host range encompassing most of the crop plants (Trudgill, 1997). RKN form characteristic galls on the root system where they establish, feed and reproduce. Infective second-stage juveniles (J2) of RKN penetrate roots and migrate intercellularly to reach the vascular cylinder where they become sedentary and establish their permanent feeding site (Williamson & Hussey, 1996). Via the stylet, juvenile nematodes inject oesophageal gland secretions in five to seven selected undifferentiated procambial host cells, inducing a specialized nourishing site (giant cells) active during their whole life cycle (Bird & Kaloshian, 2003). Galling occurs by hypertrophy of these giant cells and probably by cell division within the vascular. Heavy infection in host plant roots may result in the induction of multiple galls resulting in large and lumpy swellings (Noe, 2004).

Among the non-chemical methods available for managing RKN in infested crop fields, host plant resistance is a preferred strategy and is an environmentally safe alternative. Nowadays, only a few specific RKN resistance (*R*) genes were cloned, notably from tomato, potato, sugar beet and soybean (Fuller et al., 2008). Other RKN-specific *R* genes have been mapped but remain to be cloned, including the *Mex-1* gene conferring resistance to *M. exigua* in coffee (Noir et al., 2003). The plant immune system is modulated by a series of molecular interactions between host and pathogen components (Jones & Dangl, 2006). The specific recognition of the pathogen by the plant may lead to a resistance reaction known as the hypersensitive response (HR), accompanied by rapid cell death in and around the initial infection site (Lam et al., 2001). Early HRs have been observed in *Mi-1*-mediated resistance in tomato (Williamson, 1999), *Mex-1*-mediated resistance in coffee (Anthony et al., 2005), *Me3*-mediated resistance in pepper (Pegard et al., 2005), and wild peanut (Proite et al., 2008).

However, there was no typical HR in the *Rk*-mediated incompatible cowpea–RKN interaction, where nematodes failed to reach maturity and did not lay eggs in resistant roots (Das et al., 2008). It is thus likely that several resistance mechanisms are operating to arrest nematode development in plant roots.

One serious problem limiting the production and quality of coffee is the damage caused by RKN infection. The coffee plant (*Coffea* spp.) is an upright, evergreen shrub from the *Rubiaceae* family with a long biological cycle. *Coffea arabica* L. is a species of significant economic importance especially in Latin America. Root infection with *Meloidogyne* species induce foliar chlorosis, reduce growth, cause leaf fall and a general plant weakening, or even plant death (Campos & Villain, 2005). Together, *M. incognita* and *M. paranaensis* can cause serious damage in *C. arabica* plantations, destroying up to 80% of the root system within five years of planting (Bertrand & Anthony, 2008). *M. incognita* race 1 is the most widespread nematode on coffee plants followed by race 3 and 2 in Paraná and São Paulo States in Brazil. *M. exigua* Goeldi causes 10 to 20% drop in yield due to the general weakening of the tree (Bertrand et al., 1997).

Coffee breeding for durable resistance to RKN is now a major goal in coffee producing countries. A few years ago, a simply inherited major gene (*Mex-1*) from the related coffee species *C. canephora* was found to control resistance to *M. exigua* in *C. arabica* (Noir et al., 2003). Upon avirulent RKN infection, *Mex-1*-carrying coffee plants show HR-like symptoms around 4–6 days after inoculation (DAI) preventing the majority of giant cells to form (Anthony et al., 2005). Recently, in an initial greenhouse screening of *C. arabica* accessions, the genotype ‘UFV 408-28’ was identified as putatively resistant to *M. incognita* (Lima, R.D., unpublished data). The objective of the present work was to assess the resistance of ‘UFV 408-28’ to the main *Meloidogyne* spp. parasitizing coffee roots. In this study, standard pathogenicity assays showed that the ‘UFV 408-28’ genotype presented resistance to three highly aggressive races of *M. incognita*. We have

then examined the histological alterations in susceptible and resistant coffee genotypes following infection with *M. incognita* in order to study the resistance mechanisms that are operating to control this nematode infection in roots.

Materials and methods

Resistance characterization assays

The *Coffea arabica* plant material used in this study were the cultivar Catuaí vermelho 'IAC15' (Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo-Brazil), a susceptible control, and the genotype 'UFV408-28' (derived from Hybrid of Timor CIFC 1590/9, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brazil).

The populations of root-knot nematodes from coffee were characterized and identified by esterase phenotypes (Est) and SCAR (sequence-characterized amplified region) markers using the methods reported by Carneiro & Almeida. (2001) and Randig et al. (2002). The three races of *M. incognita* were characterized according to Hartman & Sasser (1985). We tested six nematode populations from 5 states in Brazil: *M. incognita* (Est I1) race 1 from Avilândia, São Paulo; *M. incognita* (Est I2) race 2 from Jaguaré, Espírito Santo; *M. incognita* (Est I2) race 3 from Londrina, Paraná; *M. exigua* (Est E1) from Bom Jesus de Itabapoana, Rio de Janeiro; *M. exigua* (Est E2) from Lavras, Minas Gerais; *M. paranaensis* (Est P1) from Apucarana, Paraná. The nematode populations used in this work were all originated from infected coffee roots. The populations were first multiplied on coffee cv. Catuaí Vermelho 'IAC 15' and then on tomato (*Lycopersicon esculentum* group Santa Cruz cv. Santa Clara) roots under greenhouse conditions. To recover eggs, 3-month-old tomato roots or 6-month-old coffee roots were cut into 1-2 cm segments and blended for 1 minute in a 0.5% sodium hypochlorite solution (Boneti & Ferraz, 1981). Eggs were rinsed thoroughly and counted in 1 ml aliquots in Peter's

counting slide. Single coffee plants, with 2 or 3 pairs of leaves, grown in 3-liter plastic pots, were inoculated with approximately 5,000 eggs of each nematode. The inoculum in water suspension was pipetted around the stem base. Eight replicates were arranged in a randomized block, factorial design. Plants were grown with regular watering and fertilization. Eight months after inoculation, roots were analyzed using the method described by Hartman & Sasser (1985). The number of galls was counted and the gall index (GI) number assigned according to the scale: 0= no galls, 1= 1-2 galls, 2= 3-10 galls, 3=11-30 galls, 4=31-100, 5=over 100 galls. The final population (FP) was considered as the total number of eggs and second-stage juveniles (J2) per plant, counted under a light microscope using Peters slides. The reproduction factor (RF) was calculated by dividing the FP by the initial population (IP = 5000 eggs) (Roberts & May, 1986). The percentage of population reduction (PR) was calculated by comparing the RF to the susceptible control, using the following formula: $PR=100-(RF_{UFV408-28}/RF_{IAC15} * 100)$. Genotypes were classified for resistance or susceptibility using the scale of Moura & Regis (1987): 0-25%= highly susceptible (HS), 26-50% = susceptible, 51-75% = low resistance (LR), 76-95% = moderately resistant (MR), 96-99% = resistant (R), 100 = immune (I).

Histopathological analysis

The eggs were extracted using Hussey & Baker's methodology (1973) and the hatching of second-stage juveniles (J2) was done using the modified Baermann funnel technique (Whitehead & Heming, 1965). The nematode suspension was concentrated in 50 ml Falcon tubes by centrifuging at 3000 rpm for 5 min. The root systems of coffee plants at the first true leaf stage (3-4 months) were inoculated with approximately 10,000 J2 per plant. Roots were harvested at 2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 28, 34, and 49 days after inoculation (DAI) and carefully washed. A set of root segments were excised from each plant, immediately stained with acid fuchsin and observed using stereo and light microscopy

under bright field optics (Byrd et al., 1983). Another set of 20 root segments was excised from the same plant and fixed and embedded in the epoxy resin Technovit 7100 (Kulzer Friedrichsdorf, Germany) according to Pegard et al. (2005). Around 8 embedded samples were sectioned in 4µm slices for each time point. Unstained root sections were mounted on glass slides and fluorescence was observed after UV excitation (UV filter set A2 Zeiss 02; 488002-0000). The same sections were subsequently stained (1min at 60°C) with 0.5% toluidine blue in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 5.5 and observed using a light microscope.

Results

Root galling and reproduction of *Meloidogyne* spp.

Six *Meloidogyne* spp populations were chosen based on their ability to infect coffee: *M. incognita* (Est I1) race 1, *M. incognita* (Est I2) race 2, *M. incognita* (Est I2) race 3, *M. exigua* (Est E1), *M. exigua* (Est E2) and *M. paranaensis*. The reproductive behaviors of the six RKN populations were compared on the 'UFV 408-28' and the 'IAC 15' genotypes in greenhouse tests (Table 1).

Eight months after inoculation, the gall indexes reached their maximal level (5) for all RKN tested in the cultivar IAC15. In contrast, gall indexes were lower in 'UFV 408-28' for *M. paranaensis* (4) and, in particular, for the three races of *M. incognita* (only 2).

Significant differences concerning the reproduction factor were registered among the RKN species (Table 1). On 'IAC 15', the virulent *M. exigua* (E1) population reproduced significantly more than all other populations, and, to the opposite, *M. paranaensis* showed the lowest reproduction ability. On 'UFV 408-28', the *M. paranaensis* and *M. exigua* E1 and E2 populations displayed the same reproduction capacities as for 'IAC 15'. However, the population of virulent *M. exigua* reproduced significantly better than the avirulent population on both coffee genotypes. On the

contrary, the *M. incognita* populations were significantly reduced on 'UFV 408-28' when compared to 'IAC 15'. The percentage of reduction in the reproduction of *M. incognita* races 1, 2 and 3 ranged from 86 to 89 % on UFV 408-28 (Table 1). Together, these results led us to conclude that the 'UFV 408-28' genotype can be defined as i) moderately resistant (MR) to *M. incognita*, ii) highly susceptible (HS) to *M. exigua*, and iii) susceptible (S) to *M. paranaensis* (Table 1).

Histological response to infection

Histological features from approximately 9000 root sections were observed in both susceptible (Fig. 1) and resistant (Fig. 2) *C. arabica* genotypes inoculated with *M. incognita* race 1. Nematode-infected roots were compared with non-inoculated controls (data not shown).

The compatible interaction

Microscopic observations of the infected 'IAC 15' root sections showed that the penetration of J2 in 'IAC 15' was detected starting from 2 DAI in the apical meristem (Fig.1a) and many J2 were observed within the root at 6 DAI. From 6 DAI to 49 DAI, we detected the presence of nematodes in the root cortex (Fig.1a), elongation zone (Fig.1c) and vascular cylinder (Fig.1b, d, e, f). Feeding sites were mainly observed from 6 DAI on (Fig.1b, c, and d). Dividing and asymmetrical perivascular cells were observed (Fig.1b, c, d, e, and f), pushing the cortex outwards and causing the enlargement of the roots. Infected roots of 'IAC 15' had around 5 well defined giant cells associated to each nematode at 6 DAI (Fig. 1b). Giant cells were hypertrophied, oval shaped, and presented a highly vacuolated and dense cytoplasm containing various nuclei (Fig.1b, c and d). As gall developed (14DAI) juveniles enlarged and apparently molted to J3/J4 before becoming females. Galls containing females were observed around 34 DAI and were located inside the central cylinder. Growth of females caused mechanical damage of parenchyma and vascular tissue, marked by the presence of dark-stained tissues and

collapsed cells (Fig. 1e). At 49 DAI, the development of females caused the cracking of the root cortex, finally exposing the egg masses to the exterior of the infected root.

Incompatible interaction

Whilst nematode infection of 'UFV 408-28' at 2 DAI and 4 DAI was not observed by microscopy in the fixed root samples, and rarely detected by macroscopic observation of fuchsine stained roots, after 6 DAI, many J2 were visible by microscopy forming clusters in root apex (Fig. 2a). Microscopic observations of the 'UFV 408-28' - infected samples at similar time points showed that nematodes were able to reach the vascular cylinder but no gall induction was observed (10 DAI). From approximately 4,500 resistant root sections analyzed from 2 to 34 DAI, neither giant cell induction nor feeding site establishment was observed. Moreover, only J2 stage were detected, indicating that the great majority of the invading nematodes were not capable to molt into more advanced stages of development in the resistant roots.

Fluorescence microscopy using UV excitation of root sections harvested at 6-8 DAI showed a strong yellow autofluorescence around the nematodes in all infection sites examined (Fig. 2c, f). The same sections visualized under bright field after toluidine staining showed a purple coloring, indicating necrosis of the cells in contact with the nematodes. (Fig. 2d,e). These HR-like lesions were found around all nematodes after they penetrated the epidermis (Fig. 2c) or migrated through the cortex (Fig.2b, e, and f) or when they reached the vascular cylinder (Fig. 2d). Some longitudinal sections contained almost entire bodies of nematodes completely surrounded by autofluorescence or toluidine dark-stained components (Fig. 2e and f).

Discussion

In the current study, characterization of the *C. arabica* genotype 'UFV 408-28' showed that this strain was moderately resistant to *M. incognita* races 1, 2 and 3 (Table 1), and displayed an HR-like phenotype upon *M. incognita* race 1 infection (Fig. 2 c-f). In contrast, 'UFV 408-28' was susceptible to *M. paranaensis* and highly susceptible to *M. exigua* (Table 1). This suggests that the resistance to *M. incognita* is controlled by specific gene(s) in 'UFV 408-28'.

M. incognita races 1, 2 and 3 showed low GI and RF in UFV408-28. The resistance of 'UFV 408-28' to *M. incognita* was confirmed and characterized at the histological level. Many J2 penetrated the resistant genotype, but none developed further, therefore never J3/J4 or female stages were detected in infected roots. HR-like symptoms were detected during nematode infection in resistant roots. Necrosis of plant cells in contact with penetrating or migrating juveniles were clearly found in sections of roots at 6 to 8 DAI and probably resulted in the arrest of nematode development. This finding suggests that an active defense system may operate upon *M. incognita* penetration in the 'UFV 408-28' roots to prevent nematode development and reproduction.

The timing and localization of the resistance response differ according to the type of plant-pathogen interaction. In pepper (*Capsicum annuum*), Pegard et al. (2005) showed by comparative histological studies that the three broad-spectrum resistance genes (*Me₁*, *Me₃* and *Me₇*) induced different response patterns to nematode infection therefore distinct histological responses. Observed HR responses of different pepper lines harbouring the different *Me* genes apparently blocked most of migrating nematodes when entering the epidermis (1 DAI), or later in the cortex (up to 5 DAI; Pegard et al., 2005). In coffee, the HR triggered by *M. exigua* infection in the *Mex1*-carrying genotype IAPAR59 did not prevent formation of a few giant cells and

nematodes and feeding sites did not develop further (Anthony et al., 2005). In the 'UFV 408-28' - *M. incognita* interaction, no giant cells were recorded but the HR could be observed around a number of nematodes which succeeded to arrive to the vascular cylinder (Fig. 2d), indicating that the plant immunity system was not fully efficient to suppress all infective J2 penetration and migration. Although no females were found in sections of roots of 'UFV 408-28', a low RF was still recorded for *M. incognita* race 1 in this genotype during infection tests. Although never observed in sections, some juveniles were able to develop, considering that few galls and eggs were recorded 8 months after inoculation. No 'UFV 408-28' roots containing developing nematodes were sampled because the population was very low after the first cycle and few *M. incognita* J2 overcame the resistance after 8 cycles. It is also possible that some *C. arabica* individuals from the progeny analyzed were heterozygotes to the resistance trait due to open pollination.

In the compatible interaction between 'IAC 15' and *M. incognita* race 1, juveniles induced well-defined feeding sites (Fig.1b-d). As already stated by Vovlas & Di Vito, (1991) giant cells induced by *M. incognita* were undersized when compared with the *C. arabica* cells induced by *M. exigua* infection (Anthony et al., 2005) although feeding cells were similar to *M. incognita* infection in tomato (Bird, 1961). The presence of one large vacuole was evident, accompanied by other smaller ones compressing the cytoplasm and nuclei to the periphery of giant cells. Nuclei had an irregular shape, while nucleoli were round as described for the *M. exigua* infection of *C. arabica*, in contrast to the nuclei ultrastructural changes which reported when coffee roots were infected with *M. megadora* (Rodrigues et al., 2000). At 34 DAI, females were located inside the central cylinder (Fig.1e) and caused mechanical damage to the root tissues, as described by Negrón & Acosta (1987). The complete life cycle inferred under green house conditions

(20-25 °C) was around 40 days. This is similar to the evaluation of eleven generations per year obtained in coffee plants as described by Jaehn (1991) for *M. incognita* race 1.

Among the *R* genes conferring resistance against phytonematodes, *Mi-1* is the only cloned gene conferring resistance to a *Meloidogyne* species (Vos et al., 1998). *Mi-1.2* mediated resistance is characterized by a rapid localized cell death that occurs near the anterior end of the nematode in the region of the root where feeding site initiation occurs (Williamson, 1999). In nematode-resistant tomatoes, neither a feeding site is established nor nematodes develop. Nematode resistance is clearly associated with HR symptoms, but whether this response is a cause or consequence remains unclear (Williamson & Kumar, 2006). In coffee, the HR of ‘UFV 408-28’ root cells triggered upon *M. incognita* infection may be indicative of a specific gene-for-gene recognition system between the host plant and the parasite. This would suggest that the ‘UFV 408-28’ resistance to *M. incognita* is controlled by a resistance gene that could be used to produce new coffee varieties resistant to *M. incognita*. A segregating population has been built for mapping and further investigation of the resistance gene(s) that could control the ‘UFV 408-28’-*M. incognita* interaction. Improvement of coffee plants to achieve RKN resistance is vital for most of the producing countries and could be even more urgent in the near future, according to risk analysis studies on climate changes (Ghini et al., 2008). Traditional breeding programs usually rely on the related diploid species *C. canephora* or *C. racemosa* as sources of resistance to RKN (Maluf, 2008). However, the crossing limitations of this strategy demand elevated costs and long-term investments to develop new arabica cultivars combining good cup quality and resistance to parasites. Using the tetraploid Arabica ‘UFV 408-28’ genotype as donor would greatly facilitate resistance gene transfer to elite susceptible coffee varieties.

The *C. arabica* 'UFV 408-28' genotype resistant to *M. incognita* races 1, 2 and 3 could also be useful as a model for studying host-nematode relationships in perennial plants. Recent studies showed that nematodes secrete specific effector proteins to manipulate the host plant during infection. Several putative virulence effectors were already identified in *M. incognita* (Bellafiore et al., 2008). However, the study of *M. incognita* avirulence effectors is limited by the availability of suitable *R*-gene mediated incompatible interactions. The interaction between coffee and *M. incognita* could also be a promising alternative to the tomato *Mi*-mediated resistance system for the molecular analysis of plant-nematode incompatible interactions in perennial crops.

Acknowledgements

We thank Dr M. Eira (Embrapa, Brazil) for assistance in preservation and germination of grains, and Dr. L. Villain (Cirad, France) for manuscript reviewing. This work was funded by *Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café*, Embrapa, UCB, CNPq and CAPES-Cofecub (project Sv 555/07).

References

- Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M., Nicole, M. and Silva, A. R. (2005). Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology*, 54, 476-482.
- Bellafiore S, Shen Z, Rosso M-N, Abad P, Shih P, Briggs S, 2008. Direct Identification of the *Meloidogyne incognita* Secretome Reveals Proteins with Host Cell Reprogramming Potential. *Public Library of Science Pathology*, 4 (10), e1000192. DOI 10.1371/journal.ppat.1000192.
- Bertrand, B. & Anthony, F. 2008. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In (R. M. Souza (Eds.), Plant-parasitic nematodes of coffee (pp. 165-190), Berlin: Springer).
- Bertrand, B., Aguilar, G., Bompard, E., Rafinon, A. and 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.
- Bird, A. F. (1961). The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 11, 701-715.
- Bird, D. M. & Kaloshian, I. (2003). Are roots special? Nematodes have their say *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 115-123.
- Boneti J. I. S. & Ferraz, S. (1981) Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Byrd, J. D. W., Kirkpatrick, J. and Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15, 142-143.
- Campos, V. P. & Villain, L. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. In (M. Luc, R. Sikora and J. Bridge (Eds.), Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (pp. 529-579), Wallingford: CAB International).

- Carneiro, R. M. D. G. & Almeida M. R. A. (2001). Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25, 34-44.
- Das, S., DeMason, D. A., Ehlers, J. D., Close, T. J. and Roberts, P. A. (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.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J. and Urwin, P. E. (2008). Nematode resistance. *New Phytologist*, 180, 27-44.
- Ghini, R., Hamada, E., Júnior, M. J. P., Marengo, J. A. and Gonçalves, R. R. V. (2008). Risk analysis of climate change on coffee nematodes and leaf miner in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 187-194.
- Hartman, K. M. & Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In (K. R. Barker, C. C. Carter and J. N. Sasser (Eds.), *Advanced Treatise on Meloidogyne* (pp. 69 -77), Raleigh: North Carolina State University).
- Hussey, R. S. and Baker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
- Jaehn, A. (1991). Estimativa do número de gerações de três raças de *Meloidogyne incognita* em cafeeiro para o estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, 15, 143-151.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411, 848-853.
- Maluf, M. P. 2008. Genomic tools for the development of engineered *Meloidogyne*-resistant coffee cultivars. In (R. M. Souza (Eds.), *Plant-parasitic nematodes of coffee* (pp. 191-205), Berlin: Springer).

- Moura, R. and Regis, E. M. O. (1987). Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. *Nematologia Brasileira*, 11, 215-225.
- Negron, J. and Acosta, N. (1987). Studies on host-parasite relationships of *Meloidogyne incognita* and *Coffea arabica* cv Borbon. *Nematropica*, 14, 71-78.
- Noe, J. 2004. Plant-parasitic nematodes. In (W. M. Trigiano RN, Windham AS (Eds.), *Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises* (pp. 413), Boca Raton: CRC Press).
- Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M. C. and 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.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. and Djian-Caporalino, C. (2005). Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95, 158-165.
- Proite, K., Carneiro, R., Falcao, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P. and Bertioli, D. (2008). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57, 974-980.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R. M. D. G. and Castagnone-Sereno, P. (2002). Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil as inferred from RAPD analysis and development of SCAR markers specific for the coffee damaging species *Genome Research*, 45, 862-870.
- Roberts, P. A. and May, D. M. (1986). *Meloidogyne incognita* resistance characteristics in tomato genotypes developed for processing. *Journal of Nematology*, 18, 383-359.
- Rodrigues, A., Abrantes, I. M. D., Melillo, M. T. and Bleve-Zacheo, T. (2000). Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica*, 30, 201-210.

- Trudgill, D. L. (1997). Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology*, 46, 26-32.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J. and Zabeau, M. (1998). The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology*, 16, 1365 - 1369.
- Vovlas, N. and 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 mediteranea*, 19, 253-258.
- Whitehead, A. G. and Heming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55, 25-38.
- Williamson, V. M. (1999). Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 327-331.
- Williamson, V. M. and Gleason, C. A. (2003). Plant–nematode interactions *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 327-333
- Williamson, V. M. and Hussey, R. S. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8, 1735-1745.
- Williamson, V. M. and Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics*, 22, 396-403.

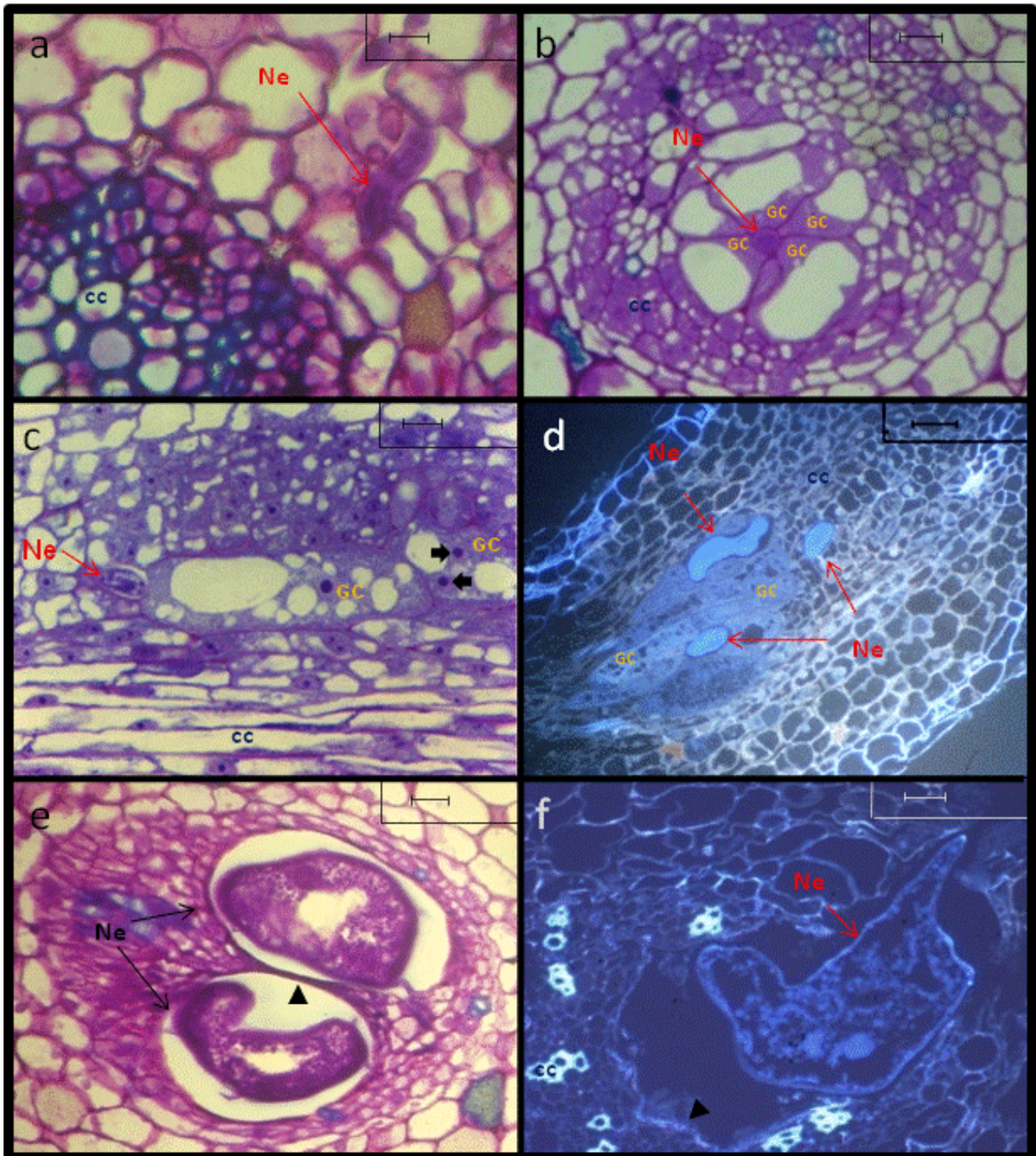


Figure 1: Sections from roots of *C. arabica* cv. 'IAC 15' (susceptible control) infested with *M. incognita* race 1. (a) localization of a J2 in the root cortex near the vascular central cylinder (2 DAI). Bar = 10 μ m; (b) highly vacuolated giant cells surrounding the nematode within the central cylinder (6 DAI). Bar = 20 μ m; (c) gall containing giant cells with a dense cytoplasm and large vacuoles (arrowheads) and a nematode (8 DAI) . Bar = 20 μ m; (d) feeding site containing several nematodes (14 DAI). Bar = 40 μ m; (e,f) galls containing females compressing the parenchyma as indicated by arrowheads (34 DAI and 49 DAI, respectively) . Bar = 20 μ m. (d,f) Sections were visualized under UV and (a, b, c, e).bright field after blue toluidine staining. Ne = nematode, GC = giant cells, cc = central cylinder. Xylem elements appear in blue (toluidine) or white (UV).

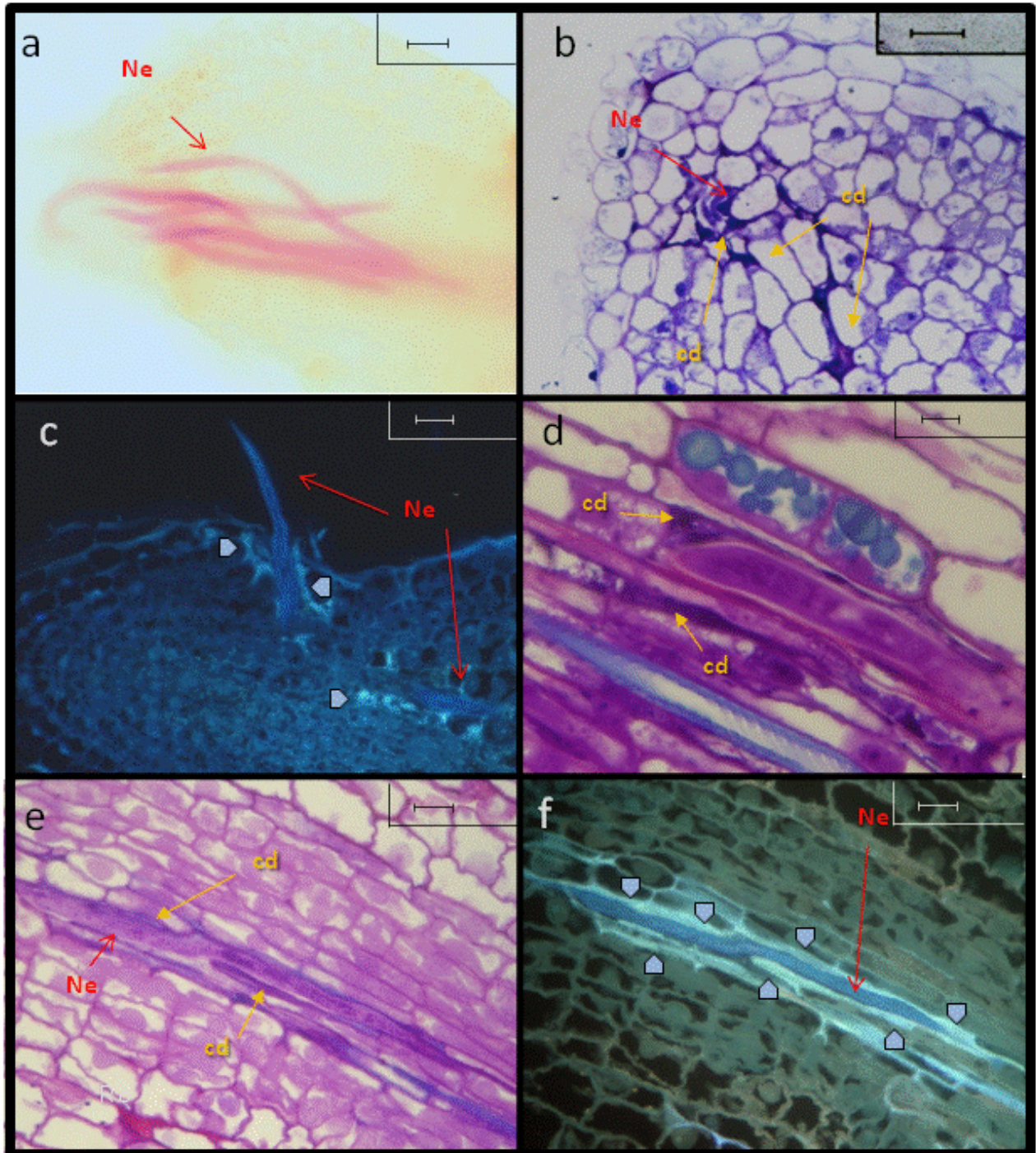


Figure 2: Sections from roots of *C. arabica* 'UFV408-28' (resistant genotype) infested with *M. incognita* race 1. (a) Numerous juvenile nematodes inside the root tip (3 DAI). Bar = 20 μ m; (b) root apex containing infecting nematodes (6 DAI). Bar = 40 μ m; (c) juveniles invading the sub-apical area of the root. Host Cells close to the nematode display necrotic-like features, characterized by yellow autofluorescence (7 DAI). Bar = 15 μ m; (d) juveniles inside dark-stained material from necrotic like host cells, close to xylem vessels (8 DAI). Bar = 5 μ m; (ef) Juveniles surrounded by necrotic cells (8 DAI). (f) autofluorescence corresponding to necrotic sites. Bar =150 μ m. (c, f) Sections were visualized under UV and (b, d, e) bright field after blue toluidine or (a) fucsiene staining. Ne = nematode, cd= cell death, arrowheads = HR-like autofluorescent material. Xylem elements appear in blue (toluidine) or white (UV).

Table 1. Gall index (GI), reproduction factor (RF) and percentage of population reduction (PR) of *Meloidogyne* spp. in *C. arabica* 'IAC 15' and 'UFV 408-28' genotypes at 240 days after inoculation.

<i>RKN species</i>	<i>IAC 15</i>		<i>UFV 408-28</i>			
	GI ^a	RF ^b	GI ^a	RF ^b	PR ^c	Phenotype ^d
<i>M. exigua</i> E1	5	101.5 a	5	105.0 a	0	HS
<i>M. exigua</i> E2	5	45.2 b	5	53.9 b	0	HS
<i>M. paranaensis</i>	5	26.1 c	4	18.3 c	30	S
<i>M. incognita</i> race 1	5	55.4 b	2	7.8 d	86	MR
<i>M. incognita</i> race 2	5	58.5 b	2	6.6 d	89	MR
<i>M. incognita</i> race 3	5	47.5 b	2	6.2 d	87	MR

^a Mean value of Gall Index.

^b Mean value of Reproduction Factor. Different lower-case letters indicate significance at P<0.05 according to the Scott and Knott (1974) test.

^c Percentage of Population Reduction

^d Based on the scale of Moura & Regis (1987) HS = highly susceptible, S = susceptible, MR = moderately resistant.

Capítulo 2. Estudo da resposta molecular do cafeeiro à infecção por *M. incognita*

2.1 Introdução

2.2 Material e métodos

2.3 Resultados

2.4 Discussão

2.5 Bibliografia

2.1 Introdução

1. Justificativa para a caracterização molecular da resposta do cafeeiro às interações com *M. incognita*

Dentre as estratégias de controle de pragas e doenças, o melhoramento de variedades por aumento da defesa ou diminuição da suscetibilidade aos patógenos representa a alternativa de caráter mais favorável dos pontos de vista econômico, social e ambiental. Para tanto, os estudos sobre as respostas do sistema imune vegetal aos estresses bióticos buscam a clonagem e a análise funcional de genes envolvidos tanto nas interações compatíveis como incompatíveis.

Os relatos das interações planta-nematoide indicam haver clara associação dos sintomas de resistência do tipo HR (Williamson & Kumar, 2006). O único gene R de resistência aos do gene nematoídeos sedentários é o *Mi-1* de tomateiro (Vos et al., 1998). Entretanto, a resistência conferida pela introgressão do *Mi-1* pode ser contornada pelos RKN em poucos ciclos de vida do nematoide (Goggin et al., 2004). Assim, aliada à introgressão de genes específicos da resistência, a modificação de genes de defesa não-específicos é visada para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável e de amplo espectro.

Em cafeeiro, o método de hibridização por supressão subtrativa (SSH; Diatchenko et al., 1996) foi utilizado para a geração do primeiro catálogo de ESTs de *C. arabica* (Fernandez et al., 2004), onde foram identificados genes cuja expressão é regulada durante os eventos precoces da infecção pela ferrugem *Hemilea vastatrix*. A técnica de SSH também foi utilizada na construção de bibliotecas de genes expressos em plantas de cafeeiro (*C. arabica* x *C. racemosa*) em resposta ao ataque do bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Mondego et al., 2005). Nesse mesmo sentido, foram construídas bibliotecas SSH na tentativa de isolar genes exclusivos da resistência ou da suscetibilidade de *C. arabica* em resposta ao ataque de *M. exigua* (comunicação pessoal).

2. Estado da arte em cafeeiro da análise de expressão de genes candidatos por qPCR

A detecção e quantificação dos transcritos de RNA mensageiro por PCR quantitativa em tempo real (qPCR; Heid et al., 1996) foi utilizada para monitorar as respostas moleculares da resistência de cafeeiro à ferrugem *Hemilea vastatrix* (Ganesh et al., 2006). Da mesma forma, foi feito um levantamento transcricional das redes que governam o desenvolvimento da semente em cafeeiro, onde os autores afirmam que a qPCR apresenta vantagens na detecção dos genes expressos em relação a análise por

arranjos de cDNA (Salmona et al., 2008). Mais recentemente, a qPCR foi utilizada na identificação de genes de cafeeiro expressos durante a SAR e na interação incompatível com *H. vastatrix* (Guzzo et al., 2009)

Recentemente foram identificados genes viáveis como controle dos estudos de expressão em cafeeiro *C.arabica* sob diferentes condições experimentais (Barsalobres-Cavallari e al., 2009). Uma avaliação semelhante dos genes de cafeeiro referências para a expressão relativa por qPCR foi feita por Cruz et al. (2009). O gene da ubiquitina (UBQ) mostrou variação na comparação entre diferentes tecidos, mas está entre os genes mais estáveis de raiz.

3. Estratégia de seleção dos genes candidatos para o estudo da interação

Com o intuito de verificar o perfil de expressão de genes reconhecidamente implicados nas vias de defesa ou de sinalização da resistência vegetal, foram feitas amplificações por qPCR a partir de iniciadores desenhados em trabalhos anteriores da equipe de pesquisa do IRD. Foram escolhidos genes com pressuposta função nas interações planta-patógeno, bem como alguns genes do metabolismo geral. Os iniciadores dos genes previamente selecionados basearam-se nas sequências provenientes de ESTs de cafeeiro disponíveis nos seguintes bancos: bibliotecas subtrativas (SSH) de raízes infectadas com *M. exigua* (IRD, dados não publicados); bibliotecas subtrativas (SSH) de folhas infectadas com *H. vastatrix* ; NCBI ; CafEST(Embrapa, acesso restrito). Também foram incluídas nas análises sequências das bibliotecas subtrativas com função desconhecida (*unknown*) ou não reconhecidos nos bancos de dados (*no hit*). Após seleção preliminar dos iniciadores com amplificação satisfatória, foram utilizados 91 pares de iniciadores correspondentes a diferentes sequências de genes de interesse (GOI).

2.2 Material e métodos

1. Material biológico

1.1. Material vegetal

Os genótipos de *C. arabica* selecionados foram escolhidos com base nos fenótipos de resistência à *M. incognita* raça 1 fenótipo esterase II :

- Catuaí vermelho IAC15– variedade híbrida de *C. arabica* derivada de um cruzamento entre Caturra Amarelo 476 × Mundo Novo 374-19, comercializada no Brasil desde 1971. Fenótipo suscetível (S) , conforme resultados cap.1 da tese (Albuquerque *et al.*, submetido).
- UFV408-28 – acesso derivado do cruzamento com o Híbrido de Timor CIFC 1590/9, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais-Brazil (gentilmente cedido pela Epamig). Fenótipo resistente (R), conforme resultados cap.1 da tese (Albuquerque *et al.*, submetido).

Os nematoides foram multiplicados em plantas de tomateiro:

- Naine Morte – variedade de *Lycopersicon esculentum* da França, extremamente sensível aos RKNs.

1.2. Material fitopatógeno

Foi utilizada uma população de *M. incognita* raça 1 fenótipo esterase II isolada em Avilândia - São Paulo. Essa população foi caracterizada e identificada para o perfil de esterase e por marcadores do tipo SCAR (sequence-characterized amplified region) de acordo com as técnicas propostas por Carneiro *et al.* (2004) e Randig *et al.* (2002). A raça da população foi caracterizada conforme metodologia descrita por Hartman & Sasser (1985).

2. Técnicas de trabalho empregadas

2.1. Multiplicação dos nematoides

A reprodução dos nematoides para amplificação do inóculo em plantas de tomateiro foi feito nas mesmas condições controladas de cultivo das mudas de cafeeiro a serem testadas (70% umidade relativa, 16 h de iluminação, 24°C).

Uma dúzia de plantas de tomateiro com 1 mês de idade, previamente germinadas em vermiculita e aclimatadas em solo, foram inoculadas com massas de ovos da

população de *M. incognita* preservadas em solução salina (0,9%). Após 3 meses de cultivo, as raízes dos tomateiros foram processadas para a coleta dos ovos de nematoide.

2.2. Preparação do inóculo de nematóides

Para a extração dos ovos de *M. incognita*, as plantas tomateiro infestadas foram retiradas do solo, a parte aérea descartada e as raízes lavadas em água corrente. Os ovos foram extraídos das raízes com hipoclorito de sódio 0,5% pelo método de Hussey e Barker (1973). O sistema radicular foi totalmente recortado em segmentos de 2-5 cm e batido no liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5%. O material processado foi peneirado em um conjunto de peneiras de 100 mesh (0,150 mm) e de 500 mesh (0,025 mm) para a coleta dos ovos. Na última peneira (500) os ovos foram lavados com água corrente exaustivamente até não mais haver formação de espuma. Os ovos lavados foram transferidos para um bécker com o auxílio de uma pisseta contendo água filtrada

Para extração de juvenis de segundo estágio (J2), a suspensão de ovos foi submetida à técnica do funil de Baermann modificado (Whitehead & Hemming, 1965) em recipiente com água destilada de 2 a 14 d à temperatura de 25-27 °C. A massa contendo os ovos foi distribuída em peneiras forradas com papel absorvente úmido e colocada dentro de um pote plástico com água destilada. O volume de água foi completado diariamente para que a massa de ovos permanecesse úmida. Os potes com as massas de ovos foram incubados e a eclosão monitorada diariamente por observação sob a lupa do fundo do pote.

Para a inoculação das plantas de cafeeiro, as larvas de J2 foram concentradas por centrifugação de 5 min a 3000 rpm, na temperatura ambiente. O excesso de sobrenadante foi descartado por aspiração e o sedimento contendo os J2 vivos foi quantificado em lâmina de Peters. A contagem de cada amostra de inóculo foi repetida 3x e a média das contagens considerada para a padronização do inóculo. Cada indivíduo de cafeeiro foi inoculado com uma suspensão de aproximadamente 5.000 J2 em água.

2.3. Cultivo das mudas de cafeeiro

As sementes de cafeeiro foram enviadas pela EPAMIG despulpadas e secas com o pergaminho. Após serem descascadas para retirada do pergaminho, as sementes (300) foram imersão em água destilada (0,5 l) por 1 h com agitação (500 rev/min). Os restos de película prateada foram eliminados por enxágue (2x) em 0,5 l de água destilada. As sementes foram então desinfestadas em 0,5 l de hipoclorito de sódio 2% (v/v) com

agitação (500 rev/min) por 30 min e em seguida enxaguadas 3x com o mesmo volume de água destilada. As sementes lavadas foram secas em papel absorvente e incubadas em magentas previamente preparadas com 14 g de vermiculita umidecida por 16 h com 40 ml de água filtrada MilliQ. As magentas fechadas e mantidas por 3 semanas no escuro em sala de cultura a 28°C. As plântulas germinadas foram transferidas para casa de vegetação tipo S2, onde foram transplatadas em potes de 200 ml contendo solo e incubadas em condições controladas (70% umidade relativa, 16 h de iluminação, 24°C). As plantas permaneceram por 4 meses na casa de vegetação até serem utilizadas nos experimentos de inoculação com nematoides.

2.4. Desenho experimental

Foram utilizadas 150 plantas de cada um dos genótipos de *C arabica* cv . Catuaí Vermelho (CV) e UFV 408-28 (UFV) com 5 meses de idade, apresentando 2 a 3 pares de folhas verdadeiras (figura 1). As plantas foram transferidas do solo para areia como substrato, entre 1 e 7 d antes do dia da inoculação. Para cada genótipo, 75 plantas foram inoculadas com larvas de *M. incognita*, enquanto que outras 75 não inoculadas serviram como controle (testemunhas).



Figura 1: plantas de cafeeiro cultivadas em areia desafiadas ou não com *M. incognita*.

Os tempos 4, 5 e 6 dias após inoculação (dpi) foram escolhidos para a coleta de amostras das raízes, inoculadas ou controle, relativos ao período da penetração e início dos sintomas do tipo HR (conforme dados mostrados anteriormente). Para cada tempo (dpi), foram coletados ao acaso 5 indivíduos inoculados de cada genótipo, bem como 5 indivíduos de controle não inoculado (figura 2). Foram realizados 3 experimentos independentes para cada tempo/genótipo.

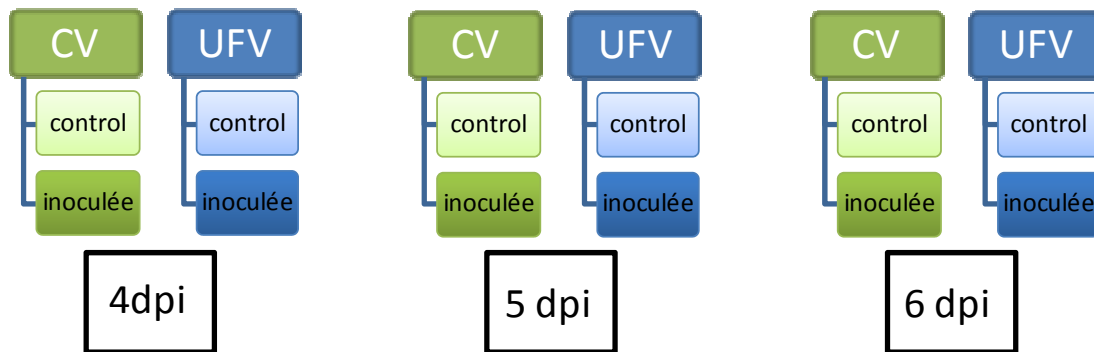


Figura 2: Esquema representativo dos experimentos de inoculação com *M. incognita* de plantas de cafeeiro resistentes (UFV) e suscetíveis (CV) para coleta de amostras a 4, 5 e 6 dias após inoculação (dpi).

2.5. Coleta de raízes de cafeeiro para os ensaios moleculares

Os segmentos terminais das raízes, aproximadamente 5 mm de comprimento, correspondem aos sítios de infecção dos J2 de *M. incognita* em cafeeiro, como observado em experimentos anteriores de histologia. As coletas de pontas de raízes foram efetuadas a 4, 5 e 6 dpi à partir das plantas de cafeeiro lavadas em água corrente para eliminação do substrato areia. Após a lavagem, as pontas foram cortadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As raízes de cada grupo de 5 indivíduos foram regroupadas em somente um tubo, constituindo assim uma amostra. As amostras foram armazenadas a -80°C .

3. Análises moleculares

3.1. Análise bioinformática:

Uma investigação bibliográfica foi feita procurando os genes implicados na resistência contra os agentes patogênicos, em especial na resistência aos nematoides. Uma análise bioinformática foi realizada em seguida a fim de procurar homólogos destes genes nas seguintes bases de dados de ESTs:

- a) banco de hibridização subtrativa (SSH) à partir de raízes de *C. arabica* cv. Caturra (S) e cv. IAPAR59 (R) infectadas com *M. exigua* (Lecoals *et al.*, 2006);
- b) banco SSH à partir de folhas de *C. arabica* cv. S4Agaro infectadas com o fungo da ferrugem alaranjada *Hemileia vastatrix* (Fernandez *et al.*, 2004);
- c) banco à partir de folhas e frutos em desenvolvimento de *C. canephora* (Lin *et al.*, 2005);
- d) banco Brasileiro Genoma Funcional de Café - CafEST (Vieira *et al.*, 2006).

As sequências codificando proteínas implicadas nas vias de sinalização da resistência (MAP quinases, peroxidases, lipoxygenases, etc...), bem como factores de transcrição (de tipo WRKY, bZIP, AP2) conhecidos por ativar a expressão de numerosos genes de proteínas de resistência (PRs). Essas sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, DM. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando o programa protein query vs translated database (tblastn) (Nelson, *et al.*, 1997). As sequências de homologia altamente significativa foram consideradas como tendo o *e-value* inferior à 10^{-20} . Os ESTs seleccionados também foram comparados por homologia ao NCBI utilizando o programa tblastx (Altschul *et al.*, 1990). A presença de domínios proteínicos conhecidos foi verificada no banco de dados Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>).

3.2. Desenho dos iniciadores de PCR

Os iniciadores (*primers*) foram desenhados com auxílio do programa Beacon Designer 5.0 (Premier Biosoft Internacional, Palo Alto, CA, EUA), com uma temperatura de fusão (TM) de 58°C, comprimento de iniciador entre 18 e 25 pb, e tamanho do amplicon compreendido entre 75 e 200 pb. Os iniciadores *forward* (F – esquerda) e *reverse* (D - direito) foram sintetizados por Eurogentec (Eurogentec, Angers, França) e utilizados na concentração final de 200 nM. A eficiência dos iniciadores foi determinada pela amplificação de uma gama padrão de DNA para cada gene dentro do amplitude de Ct (*threshold cycle*) das amostras. O valor da eficiência foi calculado pela equação: $E = [10^{(1-\text{inclinação})}] - 1$ (Ginzinger, 2002). Para cada gene o valor E era compreendido entre 0.8 e 1.2.

3.3. Extração de RNA total e RT-PCR

Os RNAs totais foram extraídos com o RNeasy extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), compreendendo uma etapa de digestão pelo DNase I. A quantidade de RNA foi estimada por espectrofotometria (260nm) utilizando-se o Spectronic Genesys 8 UV/Visible Spectrophotometer (Spectronic Instruments, Cheshire, England) e a qualidade do RNA foi visualizada em gel de agarose (1%). O DNA fita simples foi sintetizado partir de 1.5 µg dos RNAs totais em 20 µl de solução final, com o Omniscript RT kit (Qiagen) e iniciadores oligo-dT (18) - MN (Eurogentec, Angers, França), de acordo com as instruções do fabricante.

Protocolo de digestão pelo DNase I

Solução estoque: DNase estoque: DNase I - 1500 kunitz units (Qiagen) diluída em 0.55 ml de água RNase-free (fornecida com o kit)

Solução de trabalho: 10 µl de solução estoque para 70 µl de tampão RDD.

Método adaptado: a solução de trabalho (80 µl) é depositada sobre a membrana da coluna de extração, seguida de uma incubação de 20 min à temperatura ambiente.

A verificação da ausência de contaminação por DNA nas amostras de RNAs foram realizadas por PCR do gene de ubiquitina de cafeeiro (*CaUbi*), seguindo-se o procedimento descrito abaixo :

A 1µg deRNA total, foram adicionados :

tampão 10x	2.5 µl
MgCl ₂ 25mM	2.0 µl
iniciador F à 10 µM	2.5 µl
primer R à 10 µM	2.5 µl
dNTP à 5 mM	1.0 µl
DNA Polymerase*	0.08 µl

H₂O MilliQ até obter um volume final de 25 µl

*(Hot Gold Star Eurogentec, Angers, France)

Programa da PCR :

95°C /10 min

Ciclos 30x : 95°C /30 sec ; 58°C /30 sec ; 72°C /30 sec.

72°C /10 min

Visualização das bandas de DNA em gel de agarose (1%). Interpretação dos resultados: a ausência de bandas (não amplificação do gene) no gel indica que não há DNA genômico contaminante na amostra.

3.4. PCR quantitativa

A técnica de RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*) em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) tornou-se o método principal de quantificação da expressão dos genes. Ao oposto do PCR clássico, que permite a visualização da quantidade de DNA (ou cDNA derivado de RNA) em ponto final (patamar de saturação) e por conseguinte na fase não exponencial da curva de amplificação, o qPCR permite uma medida dos produtos de PCR acumulados durante cada ciclo de amplificação. A tecnologia é baseada na medida da fluorescência emitida por fluorocromos específicos num termociclador. Os fluorocromos utilizados podem ser ligados à sondas oligonucleotídicas específicas de uma sequência (tecnologias TaqMan e Light Cycler*), sondas em conformação tridimensional (*hairpins*) fluorescentes (LUX **) ou agentes intercalantes específicos do DNA dupla fita (SYBER Green).

Nós optamos pela tecnologia do SYBR Green por ser aplicável aos diversos iniciadores de genes a serem amplificados por qPCR. As moléculas de SYBR Green são incorporadas ao produto da amplificação de RT-PCR e emitem um forte sinal de fluorescência, cuja medida permite a quantificação do DNA dupla fita sintetizado. Os fatores que limitam essa técnica são a inespecificidade da marcação, bem como a sua dependência da massa de DNA dupla fita produzido na reação. No entanto, em relação às sondas específicas, os agentes intercalantes são menos onerosos e de simples utilização. Como os problemas derivados da amplificação indistinta de RNAs podem ser contornados pela análise das curvas de dissociação, e que a massa de DNA é mais importante no estudo de expressão relativa, escolheu-se a técnica SYBR Green para a avaliação da expressão dos genes durante as interações cafeeiros/nematoides.

*TaqMan ; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA et Light Cycler ; Roche, Indianapolis, IN, USA

** LUX - Light Upon eXtension, Invitrogen, Calrsbad, CA, USA

3.4.1. Metodologia adotada

As reações de qPCR foram conduzidas num termociclador MX3005P (Stratagene, LaJolla, CA, USA) utilizando-se o MESA GREEN Master Mix for SYBR Assay NO

ROX (Eurogentec) nas quantidades por amostra e nas condições de reação descritas abaixo:

tampão de reação 2x	7,5 μ L
iniciadores F+R (10 μ M)	0.6 μ L
H ₂ O MilliQ filtrada a 0.2 μ m	1,9 μ L
cDNA (0,5ng/ μ L)	5,0 μ L

Programa da qPCR :

10 min /95°C

Ciclos 40x:

15 s /95°C

20 s /60°C

40 s /72°C

Curva de dissociação

1 min /95°C

30 s /60°C

30 s /95°C

As reações foram realizadas em duplicata com a inclusão de um controle sem molde (NTC) que contem água no lugar do DNA, e do controle sem adição de água (NAC). O gene *Ubi9* (Mueller *et al.*, 2009) foi utilizado como controle interno em todos os ensaios (gene normalizador). Para testar a eficiência dos iniciadores, foram feitas diluições seriadas entre 32,5 e 1200 vezes de amostras de cDNA de raiz de cafeeiro.

Os reagentes para a RT-PCR foram misturados em um tubo em quantidade suficiente para 100 reações. A mistura foi então uniformemente distribuída nos 96 poços da placa de Elisa, e as amostras de cDNA aplicadas de acordo com o esquema abaixo (figura 3).

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sc 4.1 Unknown	Si 4.1 Unknown	Rc 4.1 Unknown	Ri 4.1 Unknown	Sc 4.2 Unknown	Si 4.2 Unknown	Rc 4.2 Unknown	Ri 4.2 Unknown	Sc 4.3 Unknown	Si 4.3 Unknown	Rc 4.3 Unknown	Ri 4.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
B	Sc 4.1 Unknown	Si 4.1 Unknown	Rc 4.1 Unknown	Ri 4.1 Unknown	Sc 4.2 Unknown	Si 4.2 Unknown	Rc 4.2 Unknown	Ri 4.2 Unknown	Sc 4.3 Unknown	Si 4.3 Unknown	Rc 4.3 Unknown	Ri 4.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
C	Sc 5.1 Unknown	Si 5.1 Unknown	Rc 5.1 Unknown	Ri 5.1 Unknown	Sc 5.2 Unknown	Si 5.2 Unknown	Rc 5.2 Unknown	Ri 5.2 Unknown	Sc 5.3 Unknown	Si 5.3 Unknown	Rc 5.3 Unknown	Ri 5.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
D	Sc 5.1 Unknown	Si 5.1 Unknown	Rc 5.1 Unknown	Ri 5.1 Unknown	Sc 5.2 Unknown	Si 5.2 Unknown	Rc 5.2 Unknown	Ri 5.2 Unknown	Sc 5.3 Unknown	Si 5.3 Unknown	Rc 5.3 Unknown	Ri 5.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
E	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
F	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown	Sc 6.3 Unknown	Si 6.3 Unknown	Rc 6.3 Unknown	Ri 6.3 Unknown
	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
G	NAC	NAC	NAC	32.5 Standard	32.5 Standard	32.5 Standard	75 Standard	75 Standard	75 Standard	150 Standard	150 Standard	150 Standard
	GENE	GENE	GENE	4.50e+001	4.50e+001	4.50e+001	2.30e+001	2.30e+001	2.30e+001	1.10e+001	1.10e+001	1.10e+001
H	300 Standard	300 Standard	300 Standard	600 Standard	600 Standard	1200 Standard	1200 Standard	1200 Standard	1200 Standard	NTC	NTC	NTC
	5.00e+000	5.00e+000	5.00e+000	2.00e+000	2.00e+000	2.00e+000	1.44e+000	1.44e+000	1.44e+000	GENE	GENE	GENE

Figura 3: distribuição das amostras em placa de 96 poços para a qPCR.

3.4.2. Análise dos dados de qPCR

3.4.2.1. Quantificação relativa da expressão dos genes

As expressões relativas foram calculadas pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (figura 4), que permite a quantificação relativa à partir da medida dos ciclos limite Ct. A fórmula de cálculo da quantificação relativa é descrita abaixo :

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct \text{ gene cible} - Ct \text{ gene calibrator}) \text{ traité } x - (Ct \text{ gene cible} - Ct \text{ gene calibrator}) \text{ contrôle } x]}$$

Figura : base matemática do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

A diferença comparativa do Ct entre o gene de interesse e o controle interno em cada amostra permite uma comparação quantitativa relativa entre as amostras. A invariabilidade do controle interno entre amostras é uma condição essencial desta técnica.

3.4.2.2. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados de acordo com um dispositivo em bloco factorial, consideradas as variáveis independente as médias dos Ct dos 3 experimentos independentes e as categoriais o genótipo resistente R ou suscetível S e o dia após inoculação (dpi). As variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o programa STATISTICA (versão 7.1 StatSoft Inc.).

2.3 Resultados

1.1. Análise da expressão de genes candidatos por qPCR

As 91 sequências de genes analisados foram categorizadas de acordo com sua pressuposta função em 14 classes, denominadas de A a N. As categorias foram atribuídas aos genes em estudo de maneira arbitrária e correspondem às funções principais destacadas na literatura. Não foram levadas em conta as sobreposições de função para os efeitos práticos das análises quantitativas dos resultados obtidos. As pressupostas correlações entre os genes de diferentes categorias serão abordadas na discussão.

1.2. Avaliação global dos resultados estatísticos

Todas as amostras das raízes de plantas resistentes R (UFV408-28) e suscetíveis S (Catuaí vermelho), que foram coletadas a 4, 5 e 6 dias pós-inoculação, apresentaram amplificação com os iniciadores dos genes de interesse listados. A eficiência da amplificação (EFC) foi estimada entre 75 e 120 % nas condições de reação utilizadas.

Os valores de Ct por qPCR dos 91 genes foram normalizados pela dedução do valor de Ct obtido com os iniciadores de ubiquitina (UBI), dando origem aos valores de «dCt». A diferença entre o «dCt» das amostras inoculadas e as amostras controle gerou os resultados de «-ddCt». As análises de perfil de expressão baseadas nos valores de «-ddCt» indicaram que para a grande maioria dos genes (80%) a expressão relativa dos três experimentos biológicos foi semelhante (dados não mostrados).

Nas análises dos estatísticas dos resultados de qPCR, os valores obtidos foram testados por ANOVA para diferenças significativas acima de 95% ($<0,05$) e pelo teste de Tuckey. A avaliação conjunta dos «ddCt» de todos os genes do fator genótipo (R ou S) revelou que a variação foi significativa somente para o gene CaWRKY11. Em relação aos tempos de coleta, a análise geral indicou variação significativa entre 4, 5 e/ou 6 dias.

1.3. Análises dos genótipos em resposta à inoculação

De acordo com os resultados anteriores de histopatologia, foi estabelecido que o pico de penetração das larvas J2 utilizadas para a inoculação das plantas deve ocorrer em 5 dias. Desta forma, para avaliar o efeito da inoculação de *M. incognita* sobre a expressão

dos genes, foram feitas análises por ANOVA das diferenças entre os «dCt» das amostras controle e inoculada de cada genótipo nos diferentes dias.

Dos 90 genes de interesse testados, 43 deles apresentaram aumento ou diminuição da expressão relativa ao controle após a inoculação com *M. incognita* (tabela 1). Estão listados os valores de significância ($p < 5\%$) das diferenças de expressão normalizada (dCt) entre as amostras inoculada e não-inoculada de cada genótipo nos 3 dias de coleta.

Para cada gene de expressão diferencial também foram verificados os valores de quantidade relativa (QR). Esses valores foram calculados à partir da diferença (ddCt) entre os valores de «dCt» de cada genótipo e a eficiência de amplificação dos respectivos iniciadores do gene em questão. A QR indica se houve aumento ou diminuição da expressão das amostras. Pode-se verificar que 39 amostras apresentaram ativação, enquanto que outras 18 apresentaram repressão. Os valores da QR estão indicados na tabela 1 em diferentes cores para destacar em: vermelho, ativação $> 2x$ ($QR \geq 2$); verde escuro, repressão $> 2x$ ($0,0 < QR \leq 0,5$); laranja, ativação $> 1x$ ($1 \leq QR < 2$); verde claro, repressão $> 1x$ ($0,5 < QR < 1$). Em amarelo estão destacados os valores inferiores a 0,001 ($p < 0,1\%$), que possuem os maiores distanciamentos entre as médias das amostras inoculada e não inoculada.

As amostras de 4 dias apresentaram alteração de expressão de somente 2 genes (CAFsy e GSTr) que foram reprimidos nas plantas R e S, respectivamente.

Em 5 dias houve expressão diferencial de 17 genes, sendo a maioria (12) no genótipo S. Entretanto, 2 desses genes diferenciais foram comuns a R e S e apresentaram o mesmo perfil para ambos os genótipos, quais sejam ativação do 13LOX e repressão do PALc. Nas plantas R, houve 3 genes ativados e 2 genes reprimidos. Em plantas S, quase todos apresentaram ativação (10) e apenas 2 repressão.

Em 6 dias foi observado o maior número de alterações do perfil de expressão. Foram registrados 38 genes diferenciais, sendo aproximadamente a metade em R (20) e metade em S (18). Tanto em R como em S, a maioria foi ativada (12 e 14, respectivamente), mas R apresentou o dobro de genes reprimidos (8) do que S (4). Desses genes reprimidos, 3 são comuns a R e S (bZIPc, PAL1 e SLR). No genótipo R o único gene que foi expresso anteriormente a 6 dias foi o OOMT, que foi reprimido em 5 e 6 dpi (0,5 e 0,3x, respectivamente). No genótipo S, 4 genes foram ativados em 5 e 6 dias: CaWRK6 (3,9 e 3,7); CYTin (4,5 e 4,7); DBP (1,7 e 2,6); SCW (1,9 e 1,9).

Os genes com maior significância ($p < 0,1\%$) foram CaWRKY11 (ativado 1,9x) e P450 (reprimido 0,5x), ambos expressos em R somente no dia 6.

Os 47 genes analisados que não sofreram alterações foram agrupados na tabela 2 ,que mostra os dados de classificação e eficiência de amplificação dos iniciadores. As classes *Modificação de paredes celulares* (H) e *Via dos fenilpropanóides* (L) não estão incluídas na tabela 2 por apresentaram alteração em todos genes representados.

Tabela 1: Análises das diferenças entre amostra inoculada e não inoculada dos genótipos resistente (R) ou suscetível (S) em cada dia de coleta: quantidade relativa de expressão do gene e valor de significância das diferenças de «dCt».

GENE	4		5		6				
	R	S	R	S	R	S			
	FC	p	FC	p	FC	p			
CaWRKY14					2,2	0,0366	2,1	0,0132	
CaWRKY6				3,9	0,0233		3,7	0,0438	
CYTin				4,5	0,0059		4,7	0,0196	
DBP				1,7	0,0301		2,6	0,0417	
bZIPa							6,7	0,027	
CDR							2,1	0,0425	
COPIN							5,8	0,011	
DEA1							2,4	0,0123	
LITAF							2	0,0442	
NRP							2,6	0,0343	
PR2a							3,2	0,0088	
SCW				1,9	0,0303		1,9	0,017	
bZIPb							1,7	0,0045	
CATH							1,5	0,007	
bZIPc						0,4	0,027	0,6	0,0102
R8							0,8	0,04	
PAL1						0,5	0,0122	0,5	0,0479
SLR						0,1	0,0058	0,4	0,0494
CAFsy	0,8	0,029		1,4	0,0232	2,4	0,0426		
ERF1						2,8	0,0408		
PR1b						5,9	0,0157		
RAR1						2,3	0,0177		
CaWRKY11						1,9	0,0003		
LEA						1,8	0,0383		
OBP						1,9	0,0189		
PAD4						1,9	0,009		
POX1						1,6	0,0237		
PR10						1,7	0,0411		
RAR1a						1,4	0,0474		
C4H				0,6	0,0339	0,5	0,0175		
OOMT			0,5	0,0036		0,3	0,0413		
COMT						0,3	0,0453		
GERM						0,3	0,0324		
P450						0,5	0,0004		
13LOX			3,3	0,038	5,5	0,0165			

		4		5		6	
		R	S	R	S	R	S
DIO					4,2	0,039	
EDR1					6,3	0,0319	
XTR					9,7	0,0014	
CYT					1,7	0,0237	
PALc				0,4	0,0094	0,5	0,0416
GLP				2	0,005		
MIRAC				6,4	0,0237		
GSTr			0,6				0,033
Total	57		1	1	5	12	20
39	ativação > 2x	25	0	0	3	6	5
	ativação > 1x	14	0	0	0	4	7
18	repressão > 2x	13	0	0	2	1	8
	repressão > 1x	5	1	1	0	1	0

Tabela 2: Descrição dos genes analisados que não tiveram expressão relativa alterada significativamente após infecção com *M. incognita* nos genótipos resistente (R) ou suscetível (S).

Nome	Classe	Descrição	EFC
UBI	O	ubi9 <i>C. arabica</i> mRNA AF297089.1	90
BURST	A	respiratory burst oxidase protein E / NADPH oxidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	105
PEROX	A	Perox	99
ALL	B	allinase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	91
CHI	B	acidic chitinase [<i>Glycine max</i>]	81
LTP	B	lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]	76
SNK	B	snakin-1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	102
XYLin	B	putative xyloglucanase inhibitor [<i>Solanum tuberosum</i>]	94
ARGO	C	putative argonaute protein	91
EDS1	D	EDS1-like protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	87
FOM2	D	Fom-2 protein [<i>Cucumis melo</i>]	79
HIN1	D	harpin-induced protein-related / HIN1-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	98
NDR1	D	NDR1-like protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	98
NIM1	D	NIM1-like protein 1 [<i>Helianthus annuus</i>]	83
P31D	D	nematode resistance-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	103
P3-2F	D	putative late blight resistance protein [<i>Solanum demissum</i>]	85
RAR1b	D	Rar1 protein [<i>Platanus x acerifolia</i>]	88
CaWRKY12	E	transcription factor WRKY 53 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	100
ERF	E	ERF-like transcription factor [<i>Coffea canephora</i>]	84
TUBBY	E	putative tubby protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	104
7E09	F	unknown	87
1B03	F	unknown	93
5F08	F	unknown	89
7H08	F	unknown	75
ACP	G	enoyl ACP reductase [<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i>]	73
PHD	G	phospholipase D [<i>Nicotiana tabacum</i>]	92
BAXin	I	Bax inhibitor [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	91
ELMO	I	phagocytosis and cell motility protein ELMO1-like	98
IFA	I	Macrophage migration inhibitory factor family protein	100
LIP	I	putative lesion-inducing protein [<i>Capsicum annuum</i>]	81
SENA	I	putative senescence-associated protein [<i>Oryza sativa</i>]	100
ACIN	J	acid invertase [<i>Citrus unshiu</i>]	94
SEPIM	J	nucleotide sugar epimerase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	94
HSP60	K	chaperonin hsp60 [<i>Zea mays</i>]	92
HSP80	K	heat-shock protein 80 [<i>Euphorbia esula</i>]	88
PAD3	K	cytochrome P450 [<i>Solanum tuberosum</i>]	89
9LOX	M	9-lipoxygenase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	85
ACC	M	ACC oxidase [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i>]	90
GST	M	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	100
GT	M	UDP-xylose phenolic glycosyltransferase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	102
PHYsy	M	N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	73
CaPK	N	calcium dependent protein kinase	73
LRK1a	N	serine/threonine-specific kinase like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	92

1.4. Análises dos perfis de expressão por dia de coleta

Em porcentagem, os resultados dos genes alterados para cada genótipo por dia de coleta estão representados no gráfico 1. No dia 4 houve repressão (100%) nos dois genótipos. Nos dias 5 e 6 foi mantida uma proporção de 60:40 na porcentagem de genes ativados e reprimidos, respectivamente, para o genótipo R. De forma semelhante, houve uma proporção de aproximadamente 80:20 na porcentagem de ativação e repressão, respectivamente, no genótipo S. De forma geral, a maioria dos genes é ativada em 5 e 6 dias.

Em porcentagem de genes alterados por dia de coleta em relação aos 43 genes de expressão diferencial, foi observada um claro aumento do número de genes com expressão diferencial quanto maior foi tempo após inoculação (gráfico 2). Podemos observar que a porcentagem de genes alterados segue a relação $6 > 5 > 4$ nos dois genótipos. Os genes foram mais ativados do que reprimidos em R nos dias 5 (7%) e 6 (28%), assim como observado para S nos dias 5 (23%) e 6 (33%). Assim, a maior porcentagem de ativados foi no dia 6 para ambos os genótipos. Entretanto, as diferenças mais marcantes entre as ativações e repressões dos dias 5 e 6 ocorre no genótipo S.

Gráfico 1: Porcentagem de alteração de ativação ou repressão dentre os genes alterados nos diferentes dias de coleta.

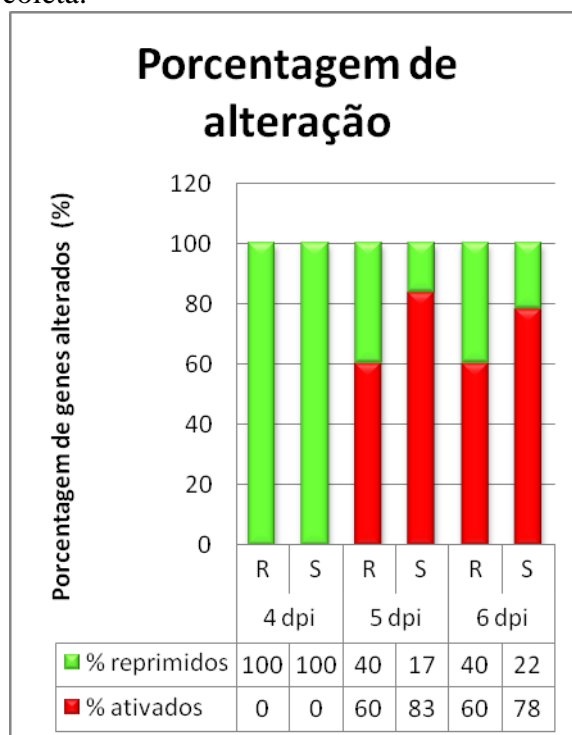
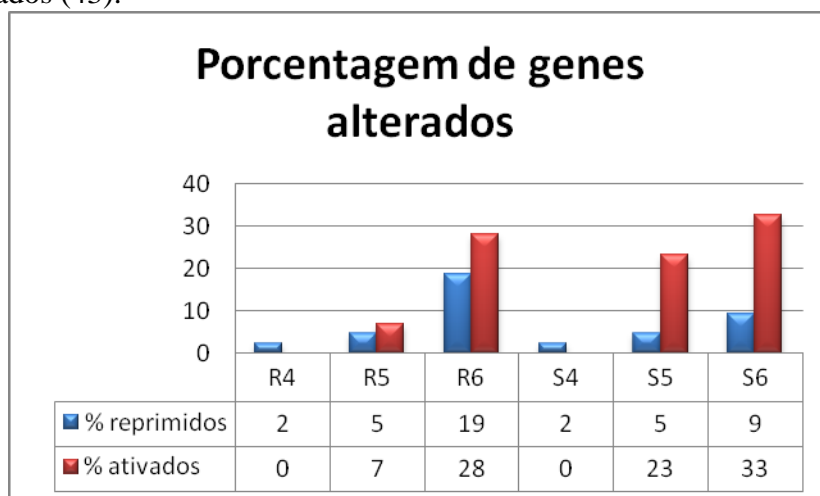


Gráfico 2: Porcentagem de genes ativados ou reprimidos em relação ao total de genes alterados (43).



1.5. Análises dos perfis de expressão por classe de genes

Os perfis de expressão dos 43 genes alterados foram agrupados por genótipo R ou S juntamente com as informações das respectivas classes, descrições e eficiência de amplificação dos iniciadores dos genes (tabela 3). Os perfis dos genes foram indicados por cores: cor de vinho os ativados somente em R (12), vermelho os ativados em R ou S (2), laranja os ativados somente em S (17), verde claro os reprimidos somente em R (4),

verde escuro os reprimidos somente em S (2), azul os reprimidos em R ou S (5) e amarelo está marcado o gene CAFsy que apresentou repressão e ativação em R ao mesmo tempo, bem como ativação em S. No total, foram somente ativados 31 genes e somente reprimidos 11 genes. As únicas classes que não possuem representante com expressão diferencial são *Resposta aos estresses* (K) e *Transdução de sinal* (N).

Os resultados estatísticos revelaram diferenças entre a porcentagem de genes que apresentou expressão alterada em cada uma das 14 classes (tabela 4). Em porcentagem, podemos verificar que as classes *Defesa* (B), *Fatores de transcrição* (E) e *Via dos fenilpropanóides* (L) detêm a maior parcela dos 43 genes alterados, com 14, 23 e 14%, respectivamente. Assim, o maior número de genes alterados (10) provem dos *Fatores de transcrição* (E).

Foi observada alteração em 100% dos genes das classes da *Via dos fenilpropanóides* e *Modificação de paredes celulares* (H e L). As 5 classes que apresentaram mais da metade dos genes alterados foram: *Choque Oxidativo* (A), *Defesa* (B), *Degradação e modificação de proteínas* (C), *Fatores de transcrição* (E) e *Outros* (J).

Também são apresentados na tabela 4 o resumo dos valores de alteração de cada genótipo, somando-se os resultados dos 3 dias de coleta. Os genes das classes A e J foram distribuídos entre ativados em R ou S e suprimidos em S. Os das classes B e E sofreram ativação e repressão em ambos os genótipos. Nas classes *Degradação e modificação de proteínas* (C), *efetores de resistência* (D), *função desconhecida ou não classificada* (F) e *vias de AS, AJ, etileno e fitoalexinas* (M) os resultados demonstraram somente ativação em ambos os genótipos. Na classe *Metabolismo de lipídeos* (G) ocorreu a ativação em R e na de morte celular (I) a ativação em S. A classe da *Modificação de paredes celulares* (H) teve tanto ativação como supressão em S. Na classe *Via dos fenilpropanóides* (L) todos os genes foram reprimidos em R, mas também alguns foram reprimidos em S.

Na tabela 5 pode-se observar os mesmos resultados de alteração de cada genótipo, somando-se os resultados dos 3 dias de coleta, são convertidos em porcentagem. Esta análise mostra a distribuição da expressão ativada e da reprimida para cada genótipo em cada classe. O genótipo resistente foi ativado (9) nas classes A, B, C, D, E, F, G, J e M. O genótipo S foi ativado nas classes H e I, mas também nas mesmas classes de R, ou seja, A, B, C, D, E, F, J e M, menos na G. A repressão ocorreu para R nas classes B, E e L, ao passo que para S ocorreu em A e K e também para B, E e J.

Tabela 3: perfis de expressão nos genótipos R e S e respectivas classes e eficiência de amplificação dos genes diferenciais.

Gene	EFC	Classe	Descrição	Perfil
Choque Oxidativo				
DIO	97	A	pathogen-inducible alpha-dioxygenase	S
GSTr	103	A	glutathione S-transferase	S
POX1	99	A	peroxidase	R
BURST	105	A	respiratory burst oxidase protein E / NADPH oxidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
PEROX	99	A	Peroxidase	
Defesa				
CYTin	86	B	cysteine proteinase inhibitor	S
GERM	108	B	germin-like protein	R
GLP	99	B	germin-like protein 2	R
PR10	101	B	pathogenesis-related protein 10	R
PR1b	93	B	pathogenesis-related protein PR1b	R
SLR	98	B	S-like ribonuclease	R/S
ALL	91	B	allinase family protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
CHI	81	B	acidic chitinase [<i>Glycine max</i>]	
LTP	76	B	lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]	
SNK	102	B	snakin-1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	
XYLin	94	B	putative xyloglucanase inhibitor [<i>Solanum tuberosum</i>]	
Degradação e modificação de proteínas				
COPIN	113	C	copine-related	S
LEA	100	C	late embryogenesis abundant protein	R
ARGO	91	C	putative argonaute protein	

Efector de Resistência

EDR1	101	D	EDR1 like (protein kinase family protein)	S
PAD4	103	D	PAD4 (phytoalexin-deficient 4-1 protein)	R
PR2a	102	D	tospovirus resistance protein D	S
RAR1a	76	D	Rar1	R
EDS1	87	D	EDS1-like protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	
FOM2	79	D	Fom-2 protein [<i>Cucumis melo</i>]	
HIN1	98	D	harpin-induced protein-related / HIN1-related [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
NDR1	98	D	NDR1-like protein [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	
NIM1	83	D	NIM1-like protein 1 [<i>Helianthus annuus</i>]	
P31D	103	D	nematode resistance-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	
P3-2F	85	D	putative late blight resistance protein [<i>Solanum demissum</i>]	
RAR1b	88	D	Rar1 protein [<i>Platanus x acerifolia</i>]	

Fatores de transcrição

bZIPa	96	E	TGA10 transcription factor	S
bZIPb	97	E	bZIP transcription factor	S
bZIPc	113	E	transcription factor PERIANTHIA	R/S
CaWRKY11	92	E	transcription factor WRKY 30 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	R
CaWRKY14	94	E	transcription factor WRKY 54 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	R/S
CaWRKY6	98	E	transcription factor WRKY 15 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	S
DBP	94	E	putative RNA binding protein	S
ERF1	63	E	ERF-like transcription factor	R
RAR1	96	E	bZIP protein	R
SCW	78	E	SCARECROW-like transcription factor	S
CaWRKY12	100	E	transcription factor WRKY 53 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	
ERF	84	E	ERF-like transcription factor [<i>Coffea canephora</i>]	
TUBBY	104	E	putative tubby protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	

Genes de função desconhecida ou não classificada

DEA1	110	F	arachidonic acid-induced DEA1	S
LITAF	85	F	LITAF-domain-containing protein	S
MIRAC	73	F	miraculin-like protein	R
CA_ME1_007_e09	87	F	No hit	
CA_ME1_001_b03	93	F	predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	
CA_ME2_005_f08	89	F	No hit	
CA_ME2_007_h08	75	F	No hit	

Metabolismo de lipídeos

OBP	98	G	oxysterol-binding protein	R
ACP	73	G	enoyl ACP reductase [<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i>]	
9LOX	85	G	9-lipoxygenase [<i>Fragaria x ananassa</i>]	
PHD	92	G	phospholipase D [<i>Nicotiana tabacum</i>]	

Modificação de paredes celulares

NRP	73	H	N-rich protein	S
R8	116	H	2-hydroxyisoflavone dehydratase	S
XTR	75	H	xyloglucan endotransglucosylase XTH3	S

Morte Celular

CATH	103	I	cathepsin B-like cysteine proteinase	S
CDR	107	I	cell death-related protein	S
BAXin	91	I	Bax inhibitor [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	
ELMO	98	I	phagocytosis and cell motility protein ELMO1-like	
IFA	100	I	Macrophage migration inhibitory factor family protein	
LIP	81	I	putative lesion-inducing protein [<i>Capsicum annuum</i>]	
SENA	100	I	putative senescence-associated protein [<i>Oryza sativa</i>]	

Outros

CAFsy	76	J	Caffein synthase	R/S
CYT	104	J	cytochrome-c oxidase chain I	S
ACIN	94	J	acid invertase [<i>Citrus unshiu</i>]	
SEPIIM	94	J	nucleotide sugar epimerase-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	

Resposta aos estresses

HSP60	92	K	chaperonin hsp60 [<i>Zea mays</i>]	
HSP80	88	K	heat-shock protein 80 [<i>Euphorbia esula</i>]	
PAD3	89	K	cytochrome P450 [<i>Solanum tuberosum</i>]	

Via dos fenilpropanóides

P450	87	K	p-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase	R
C4H	96	L	cinnamate 4-hydroxylase [<i>Salvia miltiorrhiza</i>]	R/S
COMT	97	L	caffeic acid O-methyltransferase II [<i>Nicotiana tabacum</i>]	R
OOMT	94	L	putative orcinol O-methyltransferase	R
PAL1	90	L	phenylalanine ammonia-lyase	R/S
PALc	104	L	phenylalanine ammonia-lyase	R/S

Vias de AS, AJ, Etileno e fitoalexinas				R/S
13LOX	89	M	13-lipoxygenase	
ACC	90	M	ACC oxidase [Populus tremula x Populus tremuloides]	
GST	100	M	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase [Nicotiana tabacum]	
GT	102	M	UDP-xylose phenolic glycosyltransferase [Lycopersicon esculentum]	
PHYsy	73	M	N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase [Arabidopsis thaliana]	
Transdução de sinal				
CaPK	73	N	calcium dependent protein kinase	
LRK1a	92	N	serine/threonine-specific kinase like protein [Arabidopsis thaliana]	
LRK1b	86	N	lectin-like receptor kinase 7;2 [Medicago truncatula]	
R50m	93	N	putative CLAVATA 1 receptor kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	
SiPKa	92	N	wound induced protein kinase [Nicotiana tabacum]	
SiPKb	96	N	Mitogen-activated protein kinase NTF3 [Nicotiana tabacum]	
SNAP	120	N	SNAP25A protein [Arabidopsis thaliana]	
TOTAL	43			
			Ativado somente em R	12
			Ativado (R ou S)	2
Ativados	31		Ativado somente em S	17
			Reprimido somente em R	4
			Reprimido (R ou S)	5
Reprimidos	11		Reprimido somente em S	2
Ativ/rep	1		Ativado e reprimido em R e ativado em S	1

Tabela 4: Análise do número de representantes (Rep) apresentando alterações de expressão (Alt) ou não (NA) nas 14 classes de genes e o número de amostras ativadas ou reprimidas nos genótipos resistente (R) ou suscetível (S) para cada classe. Estão em negrito as porcentagens correspondentes do número de representantes alterados (Rep Alt%) em relação ao total de 43 genes alterados e da porcentagem de representantes alterados de cada classe (Alt%).

Genes							Ativados		Reprimidos	
Classe	Função atribuída	Rep	NA	Alt	Rep Alt(%)	Alt(%)	R	S	R	S
O	Normalizador	1	1		0	0				
A	<i>Choque Oxidativo</i>	5	2	3	7	60	1	1		1
B	<i>Defesa</i>	11	5	6	14	55	3	1	2	1
C	<i>Degradação e modificação de proteínas</i>	3	1	2	5	67	1	1		
D	<i>Efetor de Resistência</i>	12	8	4	9	33	2	2		
E	<i>Fatores de transcrição</i>	13	3	10	23	77	4	6	1	1
F	Genes de função desconhecida ou não classificada	7	4	3	7	43	1	2		
G	<i>Metabolismo de lipídeos</i>	4	3	1	2	17	1			
H	<i>Modificação de paredes celulares</i>	3	0	3	7	100		2		1
I	Morte Celular	7	5	2	5	29		2		
J	<i>Outros</i>	4	2	2	5	50	1	2		1
K	<i>Resposta aos estresses</i>	3	3	0	0	0				
L	<i>Via dos fenilpropanóides</i>	6	0	6	14	100			6	3
M	<i>Vias de AS, AJ, Etileno e fitoalexinas</i>	5	5	1	2	17	1	1		
N	<i>Transdução de sinal</i>	7	7		0	0				
Total		91	48	43	100	0	15	20	9	8

Tabela 5: Análise da porcentagem das amostras ativadas ou reprimidas em cada classe para os genótipos resistente (R) ou suscetível (S).

Expressão	Genótipo	Classe														%Total
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
ATV	R	7	20	7	13	27	7	7			7				7	100
	S	5	5	5	10	30	10		10	10	10				5	100
REP	R		22			11								67		100
	S	13	13			13					13			38		100

1.6. Análises dos perfis de expressão por genótipo R ou S

Reunindo os resultados obtidos pela quantificação da expressão gênica das amostras, podemos verificar que os genótipos de cafeeiro utilizados nos experimentos responderam diferentemente às condições de estudo. Assim, os perfis de expressão do genótipo S e R indicam haver diferenças de resposta nas interações compatível e incompatível. Essas diferenças foram detectadas em 37 dos 43 genes do conjunto de genes utilizados nesse estudo.

Dos genes ativados, 12 foram exclusivos do genótipo R e 17 do genótipo S. Apenas 7 genes foram comuns aos dois genótipos R e S.

1.6.1. Perfil de expressão do genótipo suscetível S

Os dados da porcentagem de genes alterados (gráfico 1) nos dias 4, 5 e 6 indicam que, no total, houve mais genes ativados (21) do que reprimidos (7) nas amostras inoculadas do genótipo S. Podemos observar que no dia 5 houve ativação de 83% dos genes. De forma semelhante, em 6 dias ocorreu ativação de 14 genes (78%).

Em relação aos 43 genes de expressão diferencial, não foi observada ativação de genes no dia 4, mas sim a ativação de 23% dos genes (10) no dia 5 e 33% (14) no dia 6. Genes reprimidos foram observados em 2% dos genes diferenciais (1) no dia 4, em 5% (2) no dia 5 e em 9% (4) no dia 6. Assim, as maiores porcentagens (dias 5 e 6) foram de genes ativados. A maior porcentagem dos genes alterados positivamente ou negativamente (42%) foi encontrada no dia 6.

Quanto às expressões de cada classe, verificamos que houve ativação de genes de todas as classes, menos de *Metabolismo de lipídeos*, *Resposta aos estresses*, *Via dos fenilpropanóides* e *Transdução de sinal*. A repressão ocorreu em apenas 5 classes: *Choque Oxidativo*, *Defesa*, *Fatores de transcrição*, *Outros* e *Via dos fenilpropanóides*. Assim, as classes *Choque Oxidativo*, *Defesa*, *Fatores de transcrição* e *Outros* apresentaram tanto ativação como repressão. A maior porcentagem das ativações (30%) foi na classe *Fatores de transcrição* e das repressões na *Via dos fenilpropanóides*.

Os 17 genes ativados somente para S foram: (*Choque Oxidativo*) DIO; (*Defesa*) CYT_{in}; (*Degradação e modificação de proteínas*) COPIN; (*Efector de Resistência*) EDR1 e PR2a; (*Fatores de transcrição*) bZIPa, bZIPb, CaWRKY6, DBP e SCW; (*Genes de função desconhecida ou não classificada*) DEA1 e LITAF; (*Modificação de paredes celulares*) NRP e XTR; (*Morte Celular*) CATH e CDR; (*Outros*) CYT.

Somente 2 genes foram reprimidos apenas em S: (*Choque Oxidativo*) GSTr e (*Modificação de paredes celulares*) R8.

1.6.2. Perfil de expressão do genótipo resistente R

O efeito da inoculação nos dias 4, 5 e 6 provocou mais ativação (15) do repressão (11) nas amostras inoculadas (gráfico 1). No dia 5 houve ativação de 8 genes (60%) e em 6 dias ocorreu ativação de 12 genes (60%).

Dos 43 genes de expressão diferencial, não houve ativação de genes no dia 4, houve ativação de 7% dos genes (3) no dia 5 e 28% (12) no dia 6. Genes reprimidos foram observados em 2% dos genes diferenciais (1) no dia 4, em 5% (2) no dia 5 e em 19% (8) no dia 6. Assim, as maiores porcentagens (dias 5 e 6) foram de genes ativados. A maior porcentagem dos genes alterados positivamente ou negativamente (42%) foi encontrada no dia 6.

A ativação no genótipo R foi observada em 8 classes. Doze genes foram ativados exclusivamente em R: (*Choque Oxidativo*) POX1; (*Defesa*) GLP, PR10 e PR1b; (*Degradação e modificação de proteínas*) LEA; (*Efetor de Resistência*) PAD4 e RAR1a; (*Fatores de transcrição*) CaWRKY11, ERF1 e RAR1; (*Genes de função desconhecida ou não classificada*) MIRAC; (*Metabolismo de lipídeos*) OBP.

As 2 classes *Defesa* e *Via dos fenilpropanóides* apresentaram repressão no genótipo R. A classe *Via dos fenilpropanóides* teve a maior representatividade de genes alterados (100%), enquanto a metade dos genes se apresentou reprimida em *Defesa*. Os 4 genes reprimidos somente em R foram: (*Defesa*) GERM; (*Via dos fenilpropanóides*) P450, COMT e OOMT.

1.6.3. Contraste entre os perfil de expressão dos genótipos resistente R e suscetível S

1.6.3.1. Alterações exclusivas de cada genótipo

As classes que sofreram alteração exclusivamente em um dos genótipo R ou S foram:

a) Genótipo R (2 classes):

- G - *Metabolismo de lipídeos* (1 gene):
 1. OBP: proteína de ligação a oxisterol - ativada (1,9);
- L - *Via dos fenilpropanóides* (1 gene):
 2. P450: p-coumaroil 3'-hidroxilase - reprimida (0,5)

*com significância $p < 1\%$ (0,0004).

b) Genótipo S (2 classes):

- H - *Modificação de paredes celulares* (3 genes):
 1. NRP: proteína rica em N - ativada (2,6);
 2. R8: hidroisoflavona desidratase - reprimida (0,8);
 3. XTR: xiloglucana endotransglucosilase - ativada (9,7);
- I - *Morte Celular* (2 genes):
 4. CATH: proteinase cisteínica do tipo catepsina B - ativada (1,5);
 5. CDR: proteína relacionada à morte celular - ativada (2,1).

Em relação aos dias de coleta após a inoculação, em 5 e 6 os genes foram proporcionalmente mais ativados em S (83 e 78%) do que em R (60 e 60%).

O número total de genes alterados positivamente foi superior no genótipo S (24) em relação ao R (13).

Os genes que apresentaram alteração exclusivamente em um dos genótipos foram:

A. Ativados (29):

- 12 do genótipo R:
 - *Choque oxidativo*
 1. POX1: peroxidase - ativado (1,6);
 - *Defesa*
 2. GLP: proteína tipo germina 2 - ativado (2);
 3. PR10: proteína relacionada à patógeno 10- ativado (1,7);
 4. PR1b: proteína relacionada à patógeno PR1b - ativado (5,9);
 - *Degradação e modificação de proteínas*
 5. LEA: proteína abundante na embriogênese tardia - ativado (1,8);
 - *Efector de Resistência*
 6. PAD4: proteína deficiente em fitoalexina 4-1 - ativado (1,9);
 7. RAR1a: proteína Rar1 - ativado (1,4);
 - *Fatores de transcrição*
 8. CaWRKY11: fator de transcrição WRKY - ativado (1,9);
 9. ERF1: fator de transcrição tipo ERF - ativado (2,8);
 10. RAR1: proteína bZIP - ativado (2,3);
 - *Genes de função desconhecida ou não classificada*
 11. MIRAC: proteína do tipo miraculina - ativada (6,4);

- *Metabolismo de lipídeos*

12. OBP: proteína de ligação a oxisterol - ativada (1,9).

• 17 do genótipo S:

- *Choque oxidativo*

1. DIO: alfa-dioxigenase indutível por patógeno - ativado (4,2);

- *Defesa*

2. CYTin: inibidor de proteinase cisteínica - ativado (4,5 e 4,7);

- *Degradação e modificação de proteínas*

3. COPIN: relacionada a copine - ativado (5,8);

- *Efector de Resistência*

4. EDR1: proteína quinase tipo EDR1 - ativado (6,3);

5. PR2a: proteína de resistência D a tospovírus - ativado (3,2);

- *Fatores de transcrição*

6. bZIPa: fator de transcrição TGA10 - ativado (6,7);

7. bZIPb: fator de transcrição bZIPb - ativado (1,7);

8. CaWRKY6: fator de transcrição WRKY - ativado (3,9 e 3,7);

9. DBP: proteína putativa de ligação a RNA - ativado (1,7 e 2,6);

10. SCW: fator de transcrição tipo SCARECROW - ativado (1,9 e 1,9);

- *Genes de função desconhecida ou não classificada*

11. DEA1: proteína induzida por ácido aracdônico DEA1 - ativada (2,4);

12. LITAF: proteína contendo o domínio LITAF - ativado (2);

- *Modificação de paredes celulares*

13. NRP: proteína rica em N - ativada (2,6);

14. XTR: xiloglucana endotransglucosilase (9,7);

- *Morte celular*

15. CATH: proteinase cisteínica tipo caepsina B (1,5);

16. CDR: proteína relacionada à morte celular (2,1);

- *Outros*

17. CYT: citocromo c oxidase cadeia I (1,7).

B. Reprimidos (6):

• 4 do genótipo R:

- Defesa

1. GERM: proteína tipo germina (0,3);
2. P450: p-coumariol shikimato hidrolase - reprimida (0,5)
*com significância $p < 1\%$ (0,0004).

- Via dos fenilpropanóides

3. COMT: catecol O-metiltransferase (0,3);
4. OOMT: orcinol O-metiltransferase putativa (**0,5 e 0,3**);

• 2 do genótipo S:

- Choque oxidativo

5. GSTr: glutationa acetiltransferase (0,6);

- Modificação de paredes celulares

6. R8: 2-hidroxiavona desidratase (0,8).

1.6.3.2 Alterações comuns aos dois genótipos

Para os dois genótipos, a ativação teve mais representantes na classe *Fatores de transcrição* (27% em R e 30% em S) e também para a repressão a mesma classe *Via dos fenilpropanóides* foi a mais bem representada. É interessante ressaltar que a classe *Via dos fenilpropanóides* só apresentou repressão tanto para R como para S.

As classes somente ativadas em comum aos dois genótipos foram a *Genes de função desconhecida ou não classificada* e a *Vias de AS, AJ, Etileno e fitoalexinas*, a única somente reprimida foi a *Via dos fenilpropanóides*. As que apresentaram tanto ativação como repressão foram *Defesa* e *Fatores de transcrição*.

Apenas 7 genes foram comuns aos dois genótipos R e S:

1. Ativados (2):

- Dia 5: a lipoxigenase 13LOX;
- Dia 6: o fator de transcrição CaWRKY14.

2. Reprimidos (5):

- R6 e S6: a ribonuclease SLR, o fator de transcrição bZIPc, e a fenilamônia liase PAL1;
- S5 e R6 a cinamato hidrolase C4H;
- R5 e S5 a fenilamônia liase PALc.

Em 4 dias, os dois genótipos tiveram somente 2 genes reprimidos e nenhum ativado.

No dia 5, o mesmo perfil foi observado para ambos os genótipos em 2 genes, quais sejam ativação do 13LOX e repressão do PALc.

Em comum aos dias 5 e 6, foram ativados 4 genes com amplitudes semelhantes no genótipo S, sempre no sentido da ativação: CaWRK6 (3,9 e 3,7); CYTin (4,5 e 4,7); DBP (1,7 e 2,6); SCW (1,9 e 1,9). No genótipo R o único gene que foi expresso anteriormente a 6 dias foi o OOMT, que foi reprimido em 5 e 6 dpi (0,5 e 0,3, respectivamente).

Também comum foi o fato de que a ativação foi superior à repressão nos dias 5 e 6.

Os genes com maior significância ($p < 0,1\%$) da maior distância entre as médias dos valores de $\langle ddCt \rangle$ foram CaWRKY11 (ativado 1,9) e P450 (reprimido 0,5), ambos expressos em R somente no dia 6.

Em resumo, com base nas semelhanças dos genes estudados com as proteínas conhecidas, a análise dos genes de cafeeiro expressos durante a infecção com *M. incognita* mostraram notadamente que, entre 5 e 6 dias :

- nos dois genótipos, 1) a planta está numa fase de resposta ativa ao parasita, pois a maioria (77%) dos fatores de transcrição testados, selecionados com base no seu envolvimento na ativação de repostas de resistência aos parasitas, está ativada, 2) a via de biossíntese de jasmonato (JA) está ativada no dia 5, sugerindo uma resposta ao dano mecânico criado pela migração do nematoide nos tecidos racinares.

- no genótipo resistente, 1) os genes de defesa que são ativados correspondem a reguladores de resistência (PAD4) ou de proteínas PR (PR1b, PR10) associadas à via de sinalização da resistência dependente de ácido salicílico (AS), 2) todos os genes testados envolvidos nas vias de biossíntese de fenilpropanoídeos são reprimidos no dia 6, sugerindo uma repressão desse metabolismo ligado ao AS, às ligninas, aos ácidos clorogênicos, aos flavonoides e de vários metabólitos secundários 3) somente alguns genes envolvidos na morte celular ou no choque oxidativo são ativados, enquanto que as observações de microscopia indicaram que os primeiros sinais de HR foram visíveis à partir do dia 6.

- no genótipo suscetível, os 3 genes testados ligados à modificação de paredes celulares são regulados negativamente, assim como dois genes ligados à morte celular. No dia 6, as observações de microscopia mostraram o desenvolvimento dos primeiros sítios

nutricionais. As modificações específicas observadas na expressão desses genes poderiam estar ligadas a estas mudanças estruturais.

2.4 Discussão

Os resultados do perfil de expressão gênica indicaram que aproximadamente metade (47) dos 91 genes não sofreu alterações nas amostras. Os poucos trabalhos que relatam as modificações do transcriptoma da planta hospedeira durante a infecção com o nematoide *Meloidogyne* indicam que a maioria dos genes é reprimida, ao invés de ativada, após o estabelecimento dos sítios de alimentação na interação compatível. Essa repressão de um número maior de genes do que a ativação foi observado em tomateiro (Schaff et al., 2007) e em *A. thaliana* (Jammes et al., 2005). Por outro lado, o mesmo fenômeno não se reproduz no caso dos tempos precoces da interação, e nem na interação incompatível em tomateiro (Schaff et al., 2007).

No cafeeiro, nós observamos que, dos genes alterados, a maioria sofreu ativação tanto na interação compatível e como na incompatível. Aliás, a porcentagem de genes ativados ou reprimidos nos dois genótipos estudados foi constante nos dois dias de análise. Uma proporção de 60:40 foi mantida para o genótipo R, e uma proporção de 80:20 na porcentagem de ativação e repressão, respectivamente, no genótipo S.

Entretanto, é interessante notar que, dentre os genes reprimidos, estão aqueles ligados à via de biosíntese de compostos fenólicos que são particularmente afetados no genótipo resistente (100 % dos genes testados) e, em menor medida, no genótipo suscetível (50%). Os genes PAL, por exemplo, codificam a fenilalanina amônia liase (PAL ; EC 4.3.1.5) que cataliza a formação do ácido cinâmico, à partir do qual são derivados todos os fenilpropanoides, que são compostos do metabolismo secundário. Dentre esses compostos, podemos destacar o ácido salicílico, os precursores das ligninas ou ainda os flavonoides cuja implicação nas reações de estresse biótico ou abiótico foi demonstrada (revisado por Dixon e Paiva, 1995). No cafeeiro, os ácidos clorogênicos, derivados da mesma via, são responsáveis pelo sabor amargo do café e têm um papel preponderante na qualidade de bebida (Mahesh et al., 2007). Nesse trabalho, os genes PAL que nós testamos foram reprimidos nos dois genótipos no curso da infecção com *M. incognita*. Em *A. thaliana*, existem 4 genes que codificam as fenilalanina amônia liases. Os dois genes de cafeeiro testados apresentam homologia com PAL1 e PAL2, necessárias à síntese de lignina (Rohde et al., 2004). Os genes dessa via que são reprimidos no genótipo resistente durante a infecção codificam enzimas que poderiam igualmente ser implicadas na via de biosíntese ds precursores das ligninas, como a ácido cafêico O-metiltransferase, ou dos ácidos clorogênicos como a p-coumaroil ester 3'-hidroxilase COMT (Mahesh et al., 2007).

A PAL participa igualmente na via de biosíntese de AS. A repressão dos genes PAL que nós observamos sugere que a biosíntese do AS seja diminuída, ou mesmo suprimida na interação cafeeiro - *M. incognita*. Todavia, os genes de defesa que são ativados na UFV 408-28 correspondem a reguladores de resistência (PAD4) ou de proteínas PR (PR1b, PR10) que são geralmente associadas à via de sinalização da resistência dependente do AS (Glazebrook, 2005). Esses dados não são forçosamente contraditórios, pois foi mostrado que o AS poderia também ser sintetizado à partir da via do corismato (Wildermuth, 2006). Aliás, como em *A. thaliana*, existem certamente outros genes codantes de PAL no cafeeiro e que poderiam estar implicadas na síntese de AS.

Capítulo 3. Transformação de cafeeiro para caracterização e validação de genes

3A Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically-modified by bombardement

Este trabalho foi publicado na revista "In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant", sob o identificador : DOI: 10.1007/s11627-009-9254-2

Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment

Erika V. S. Albuquerque · Welcimar G. Cunha · Aulus E. A. D. Barbosa ·
 Poliene M. Costa · João B. Teixeira · Giovanni R. Vianna · Gláucia B. Cabral ·
 Diana Fernandez · Maria F. Grossi-de-Sa

Received: 28 July 2009 / Accepted: 3 September 2009 / Editor: N. J. Taylor
 © The Society for In Vitro Biology 2009

Abstract The genetic modification of *Coffea arabica* fruits is an important tool for the investigation of physiological characteristics and functional validation of genes related to coffee bean quality traits. In this work, plants of *C. arabica* cultivar Catuai Vermelho were successfully genetically modified by bombardment of embryogenic calli. Calli were obtained from 90% of the leaf explants cultivated in a callogenesis-inducing medium modified with 20 μ M 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The resulting calli were bombarded with the pBI426 vector containing a *uidA* and *nptII* gene fusion that was driven by the double CaMV35s promoter. Kanamycin-selected embryos were positive for β -glucuronidase (GUS) activity in histochemical assays and for target gene amplification by polymerase chain reaction. Integration of the *nptII* gene was confirmed by Southern blot and showed a low copy number (one to three) of insertions. Transformed plants showed normal development and settled fruits. GUS expression was assessed in the flower and fruit organs demonstrating the capacity of the double CaMV35s promoter to drive long-term stable expression of *uidA* in *C. arabica* fruit tissues. Moreover, we obtained a T₁ progeny presenting 3:1 Mendelian segregation of the *uidA*

gene. This investigation is the first to report exogenous gene expression in coffee fruits and transgenic inheritance in *C. arabica* plants.

Keywords *Coffea arabica* · Genetic transformation · *uidA* gene · Coffee fruit expression · Bombardment

Introduction

Coffee, a beverage appreciated worldwide, yielded more than USD\$13 billion dollars in the international market in 2008 (ICO 2009). Approximately 130.7 million bags were produced in 2008–2009 generating millions of jobs in the tropical countries that produce coffee. Coffee species (*Coffea* spp.) are perennial woody shrubs. *Coffea arabica*, the most important commercialized species, is allotetraploid and autogamous, which makes it difficult to improve by conventional breeding (Etienne et al. 2002). The fruit of *C. arabica* requires 6 to 8 mo to mature covering the time between anthesis and full ripening.

Coffee biotechnology research has focused on isolating genes for improving fruit production, adaptability to the environment, and coffee-cup quality (Lin et al. 2005; Vieira et al. 2006). The importance of a better understanding of coffee fruit physiology was reviewed by De Castro and Marraccini (2006). They examined several important pathways involved in coffee berry development and metabolism, such as caffeine pathways, storage proteins (2S and 11S), α -D-galactosidase, biosynthetic pathway of chlorogenic acids (e.g., PAL), sucrose metabolism (e.g., sucrose synthase), and ethylene production involved in the pericarp maturation (e.g., synthesis and catalyzation of ACC 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid). Other workers have reported efforts toward genetically modified coffee plants with altered fruit traits.

E. V. S. Albuquerque (✉) · W. G. Cunha · A. E. A. D. Barbosa ·
 P. M. Costa · J. B. Teixeira · G. R. Vianna · G. B. Cabral ·
 M. F. Grossi-de-Sa

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
 Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga,
 PqEB Av. W5-Norte (final),
 Brasília 70777-900 DF, Brazil
 e-mail: erika.freire@ird.fr

D. Fernandez
 Institut de Recherche pour le Développement,
 Résistance des Plantes aux Bioagresseurs
 IRD-UMR-186 IRD-Cirad-UM2,
 BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

Published online: 23 September 2009

 Springer

Aiming to increase uniformity of bean maturation, coffee cDNAs coding for ACC enzymes were cloned in order to modulate ethylene production in the fruits by expression of antisense sequences (Pereira et al. 2005). To produce coffee beans that are intrinsically deficient in caffeine, Ogita et al. (2004) produced *C. canephora* plants containing caffeine content reduced by up to 70% through the use of RNA interference (RNAi) technology aimed at the gene encoding theobromine synthase (CaMXMT1). Reduced levels of caffeine were demonstrated in the leaves of transgenic plants, but it was not shown whether caffeine content was also reduced in the beans.

The improvement of commercial fruit trees by genetic transformation presents many difficulties. There are only a few crops successfully transformed with genes of agricultural importance. One example is the *Nicotiana glauca* proteinase inhibitor (*Na-PI*) that was introduced into apple (*Malus domestica*) plants to confer resistance to insects (Maheswaran et al. 2007). To control fruit ripening, ACC oxidase (*ACO*) expression was modified in pear (*Pyrus communis*; Gao et al. 2007). However, in these works on perennial crop genetic modification, the transformed tissues analyzed are usually vegetative, i.e., leaves and shoots. One exception is the recent investigation by Torregrosa et al. (2008) in which transformed grapevine (*Vitis vinifera* L.) displayed altered levels of alcohol dehydrogenase (*Adh*) in grape berry tissues.

The large number of expressed sequence tags (EST) sequences currently available (Fernandez et al. 2004; Lin et al. 2005; Vieira et al. 2006; Salmona et al. 2008) and other sequence information that will become available from genome projects will permit the study of many coffee genes that may potentially impart agronomic and consumer-preferred traits. It will be of particular interest to investigate seed physiology for the elaboration of final characteristics of coffee beans to obtain better cup quality. However, the identification and characterization of genes activated or repressed during coffee fruit development requires validation *in vivo*.

The *uidA* reporter gene, coding for the β -glucuronidase (GUS), has been proven to be a useful marker for following gene transfer to coffee plants. Different coffee cells and tissues were evaluated by GUS activity in the optimization of direct transformation methods (Van Boxtel et al. 1995; Fernandez-Da Silva and Menéndez-Yuffá 2003; Rosillo et al. 2003). The first transformed coffee plants obtained expressed the *uidA* gene (Spiral et al. 1993; Hatanaka et al. 1999). The *C. canephora* and *C. arabica* plants transformed with the *cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* to confer resistance to the leaf miner (*Perileucoptera coffeella*), also contained the *uidA* gene (Leroy et al. 2000). Ribas et al. (2005) transformed *C. canephora* by particle bombardment with genes conferring both resistance to phosphinotricin and GUS activity.

In this paper, we report the recovery of transgenic *C. arabica* that highly expressed the *uidA* gene in the ovaries, anthers, and endosperm of their fruits. Our results indicated that the *uidA* gene is correctly expressed by the control of the dCaMV35s promoter in the flower and fruit tissues of *C. arabica*. We also describe a direct transformation methodology that has potential to produce sufficient numbers of low copy transformants for both the improvement of *C. arabica* varieties and the functional validation of candidate genes.

Materials and Methods

Induction of embryogenic calli. The second pair of leaves from plagiotropic branches of *C. arabica* cv. Catuai Vermelho was collected from plants that were grown in a greenhouse. These leaves were then surface-disinfected by a 3 min soak in 70% ethanol, followed by a soak in 2% sodium hypochlorite for 20 min and a rinse with distilled water repeated three times. Leaves were segmented (0.5×0.5 -cm pieces) and cultivated in petri dishes for 6 mo in the dark at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ on high frequency embryogenic induction medium, here called C20, based on medium C as described by Van Boxtel and Berthouly (1996) and modified by Teixeira et al. (2004). C20 consisted of half-strength Murashige and Skoog (Murashige and Skoog 1962) salts, 20 mg/l sucrose, 100 mg/l casein hydrolysate, 400 mg/l malt extract, 10 mg/l thiamine, 1 mg/l nicotinic acid, 1 mg/l pyridoxine, 1 mg/l glycine, 100 mg/l myoinositol, 20 μM 2,4-D, 4.9 μM indole-3-butyric acid, and 9.8 μM 2-isopentenyladenine, solidified with 2.4 g/l Phytigel (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO). The pH was adjusted to 5.6 before autoclaving. During the incubation period in C20, explants were subcultured onto fresh medium only after the first month and then left in the same plates until the sixth month of culture.

Transformation procedure. After 6 mo of calli induction, yellow friable masses that had formed around the leaf explants were transferred to bombardment plates. Each bombardment plate was composed of a membrane containing approximately 50 mg of embryogenic callus. Embryogenic mass was spread on a nitrocellulose membrane (BA 85 with 0.45 μm pore size; Schleicher and Schuell; Dassel, Germany) that was placed over modified C20 medium containing 10 μM 2,4-D (C10) and incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for 6 d prior to microparticle bombardment. Membranes were then transferred to osmotic-conditioning medium (C10 containing 0.5 M mannitol and 8 g/l Phytigel) and incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for 24 h before bombardment.

The transformation experiment was composed of 12 bombarded plates. The vector used for bombardment was

pBI 426 (Datla et al. 1991), which contains the *nptII* gene conferring resistance to kanamycin and the *uidA* gene coding for the enzyme β -glucuronidase, which is driven by the double CaMV35s (dCaMV35s) promoter with an enhancer. Microprojectile sterilization and DNA precipitation were conducted according to Aragão et al. (1996). In a horizontal flux chamber, DNA was surface-deposited over 1.2 μm tungsten microparticles (M10, Sylvania Inc.; New York, NY) previously prepared in suspension (60 mg/l in 50% glycerol). For each shot, a 50- μl aliquot of microparticles was mixed with 5 μl of vector (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 50 μl of 2.5 M CaCl_2 , and 20 μl of 100 mM spermidine (Sigma), in this order. The mixture was gently inverted during 10 min and then centrifuged at $15,000 \times g$ for 10 s. The supernatant was gently removed by pipetting, and the pellet was washed twice with absolute ethanol. Covered microparticles were finally suspended in 24 μl absolute ethanol and passed three times (1 s each time) in a sonication bath. Aliquots (3.2 μl) were pipetted over carrier membranes (Kapton, 2-mil, DuPont, Belle, WV) and placed in a high-pressure helium-driven particle acceleration device adapted from the system described by Sanford et al. (1991). Briefly, the bombardment chamber was maintained at approximately 50% relative humidity and 27 in. of Hg vacuum when 1,200 psi of helium pressure was applied to the shock-wave generation membrane. Bombardment physical parameters (Aragão et al. 1996) were 8-mm distance between the shock membrane and the DNA carrier membrane, 13-mm flying distance of the carrier membrane to the stopping screen, and 80-mm flying distance of the DNA-coated microparticles to the explants. The bombardment plates were covered with a metallic screen (0.85-mm overture) to avoid spreading of the embryogenic callus during the shot. Immediately following bombardment, the membranes carrying bombarded calli were transferred to C10 medium without selection pressure and maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for 2 wk. Afterwards, the calli were subcultured on C10 medium that contained increasing concentrations of the selective agent kanamycin as follows: first week with 200 mg/l, second week with 300 mg/l, and then monthly with 400 mg/l until the appearance of resistant calli or embryos. Selected calli were cultured physically apart from each other to maintain traceability of the different transformation events. Regenerated somatic embryos were cultivated until they reached the torpedo stage on R medium (Van Boxtel and Berthouly 1996) that contained 400 mg/l kanamycin. Regenerated embryos were then cultivated in baby food jars without the selection agent on woody plant medium (WPM; Lloyd and McCown 1981) containing 3 g/l activated charcoal and 2 g/l Phytigel at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under low-light conditions ($7.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) with a photoperiod of 16 h. Derived plantlets were potted in vermiculite and soil (1:1 v/v) and covered with plastic to be acclimated in a greenhouse with 40% to 50% shade. Covers were gradually opened to be

completely removed after 2 wk of acclimatization and permit the direct irrigation of the pots.

In the second year of greenhouse growing, fruits were collected from the selected event, identified as T4, to perform GUS activity tests and *in vitro* germination of the transformed zygotic embryos aiming to further propagate the T1 progeny by tissue culture. Red cherry fruits were disinfected before aseptic extraction of the zygotic embryos. Embryo cotyledonary samples were GUS-stained while axes were cultivated in WPM until acclimatization.

Histological analysis. Embryogenic calli, kanamycin-resistant somatic embryos, and plantlets were tested before acclimatization for the histochemical detection of GUS activity (Jefferson et al. 1987). Samples were incubated overnight in the staining buffer modified by Lacorte (1998) and were observed under a stereomicroscope. The same GUS staining assay was used to analyze cut samples of flowers and fruits by microscopy. Four stages of the development relative to the days after anthesis (DAA; De Castro and Marraccini 2006) were collected corresponding to: (1) pin heads (15 DAA); (2) green immature cherry (115 DAA); and (3) mature cherry (230–240 DAA). Fruit materials from transformed plants were stained, dehydrated in a crescent ethanol battery, and embedded in paraffin. Longitudinal serial, semithin sections were treated with xylol and observed using a Zeiss axiophoto microscope. Cotyledonary samples from zygotic embryos (T_1 generation) of the T4 event were analyzed in X-gluc buffer as described previously.

Molecular analysis. The *uidA* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers described by Moore et al. (1992). Genomic DNA from leaves of kanamycin-resistant *in vitro* plantlets were extracted by the CTAB method (Doyle and Doyle 1987) and analyzed as follows: 20 ng of template were mixed with the buffer containing 1.2 mM MgCl_2 , 0.128 mM dNTP, 1.5 U *Taq* polymerase (Qiagen; Hilden, Germany), and 0.2 mM primers (forward: 5'-TTGGCAGGCCAGCGTATCGT-3' and reverse: 5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC-3'). This mix was submitted to thermocycling ($95^\circ\text{C}/5 \text{ min}$; 36 cycles: $95^\circ\text{C}/1 \text{ min}$, $55^\circ\text{C}/1 \text{ min}$, and $73^\circ\text{C}/1 \text{ min}$; $73^\circ\text{C}/5 \text{ min}$) and the amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1% (v/v) agarose gel.

The *nptII* gene was detected by Southern blot analysis (Sambrook et al. 1989) from four different transformation events. Genomic DNA was extracted using the DNAeasy Plant Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Ten-microgram DNA samples were digested with *Bgl*III, *Sca*I, or *Ssp*I restriction enzymes and subjected to electrophoresis on a 1% (v/v) agarose gel. The DNA fragments were transferred to a Hybond N⁺ membrane (AmershamTM Biosciences; Freiburg, Germany) by capillary blotting. The

DNA-containing membrane was exposed to ultraviolet radiation to permanently attach the transferred DNA to the membrane. The *nptII* probe was obtained by *Bgl*III linearization of the pBI426 vector (Fig. 1) and isolation of the corresponding 811 bp fragment on 1% (v/v) agarose gel. The purified probe fragment was oligolabeled (Ready-To-Go kit, AGE Healthcare Biosciences Ltd.; Freiburg, Germany) and then used for overnight hybridization with the membrane at 65°C. After excess probe washing, the membrane was maintained for 2 d at -80°C for visualization by autoradiography (Kodak X-ray film, Eastman Kodak Co., Rochester, NY).

Results

Calli bombardment and regeneration of transformed embryos. Intense cellular proliferation was observed at the leaf explant's edge leading to primary calli formation in all explants (data not shown). Friable yellow masses from secondary embryogenic calli were obtained from 90% of the *C. arabica* leaf explants after 6 mo cultivation (Fig. 1a). Two leaf explants rendered sufficient material (50 mg of friable calli) for one bombardment shot. To avoid antibiotic toxicity on freshly bombarded calli, a new selection protocol was used wherein kanamycin doses were slowly increased during 4 wk before reaching the highest dose (400 mg/l). After 2 mo on the selective medium supplemented with 400 mg/l kanamycin, most of the bombarded calli showed necrosis. In the third month of selection, we observed the appearance of both yellow friable calli and differentiating globular (Fig. 1b) and torpedo embryos (Fig. 1c). After a total of 4 mo under selective pressure with monthly subculture, 65 potential transformation events were obtained, most of them callus, but we also obtained some torpedo embryos. During a regeneration period on R medium for 2 mo in the dark, we transferred the fully developed embryos

as soon as they reached the cotyledonary stage to light conditions on WPM containing activated charcoal (Fig. 1d). After approximately 6 months of subcultivation in WPM, we regenerated 178 somatic embryos with well-developed, green-colored cotyledons. Two months later, development of rootlets and leaves was observed (Fig. 1e). A total of 30 putative transformed plantlets were acclimated in soil in the greenhouse (Fig. 1f).

Analysis of the *GUS* stable expression and integration of the *uidA* gene. *GUS* histochemical assays were performed on randomly selected bombarded materials growing on medium supplemented with 400 mg/l kanamycin. Regenerated somatic embryos (Fig. 2a, b) sampled from such kanamycin-resistant material showed blue-colored stained cells indicating the presence of β -glucuronidase activity. Blue staining was also observed in the root tips and leaves (Fig. 2c, d) of all the embryos germinated in WPM.

Eleven samples from 12 events (T1–T12) assayed by PCR amplified 420-bp fragments (expected size) of the *uidA* gene (Fig. 3). Southern blots on DNA from four events (T3, T4, T5, and T8) showed integration of the *nptII* gene at different loci. Hybridization profiles obtained with the *nptII* probe confirmed integration and an estimated two to three copies of the *nptII* gene for the events T3, T5, and T8 (Fig. 4, lines 5, 6, 7). One event (T4) showed single-copy integration as revealed by the hybridization patterns of the DNA digestion with *Bgl*II, *Sca*I, and *Ssp*I (Fig. 4, lines 2–4).

Analysis of the genetically modified fruits. Transformed *C. arabica* plants from different events showed normal development and life cycle comparable to the nontransformed controls growing in the same greenhouse conditions. Forty-two flowers and 12 fruits (immature pin heads and green cherries) that developed after flowering in the second year of four transformed coffee plants, which were cloned from the single-copy event T4, were pooled for transgene

Figure 1. Explants for transformation and regeneration of transformed somatic embryos: (a) yellow masses of embryogenic calli produced from *C. arabica* cv. Catuai Vermelho leaf explants; (b) appearance of kanamycin-resistant calli from bombarded explants; (c) torpedo-stage embryos grown on the R medium; (d) cotyledonary stage, selected embryos cultivated in WPM; (e) rooted plantlets before acclimatizing in greenhouse; (f) transformed plants.

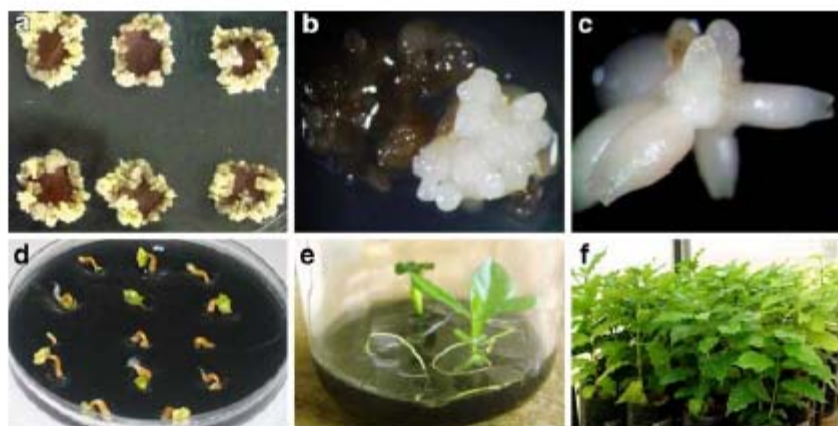
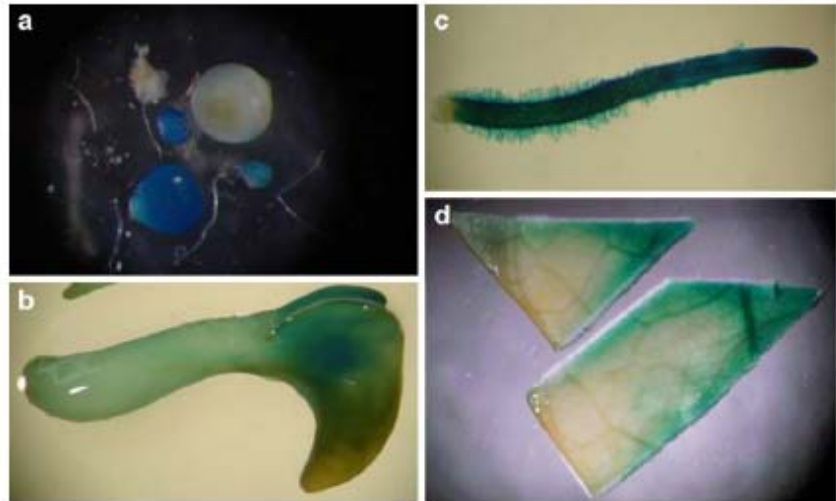


Figure 2. Stable GUS expression evidenced by histochemical analysis (blue coloration) of *C. arabica* kanamycin-resistant samples: (a) globular embryos; (b) cotyledon embryos; (c) roots; and (d) leaves.



expression analysis. Flower buds showed various stained tissues including the floral verticil, receptacle, stigma, and anther (Fig. 5a) as well as pedicel and ovary (Fig. 5b). Histological cuttings showed that the ovary cells accumulated greater blue staining than the surrounding tissues (Fig. 5c). Similarly, coffee fruits collected 15, 115, and 230 DDA presented GUS staining mostly throughout the cut edge and the endosperm layers (Fig. 5d-f). Cotyledon samples from zygotic embryos (T_1 generation) of the T4 event plants (T_0 generation) showed blue staining (Fig. 5g) in 19 (73%) samples out of the 26 total samples. This result corresponds to the segregation pattern of a single dominant gene (3:1) in a classical Mendelian fashion.

Discussion

The transformation procedures presented here show that the bombardment of embryogenic calli can be effectively used for introducing genes into *C. arabica*. We obtained an average of 5.4 putative transformation events per 50 mg of bombarded explants from which at least one event/plate was positive for PCR amplification of the *uidA* gene. The osmotic treatment by mannitol performed before the bombardment could have favored the bombardment as reported for the transient expression in coffee cells (Rosillo et al. 2003). All samples from the 65 selected materials were GUS positive. Also, the progressive selection strategy, beginning with a 2-wk interval without kanamycin after bombardment, seemed to positively influence the regeneration of the transformed *C. arabica* cells. About 178 embryos regenerated after more than 2 mo of selection in 400 mg/l kanamycin. Since we observed a good transformation rate, it would be interesting to perform additional

repetitions and new experiments to test variations in the selection strategy.

We analyzed 30 GUS-positive and kanamycin-resistant *C. arabica* plants from different transformation events after 2 years of maintenance in greenhouse. The *nptII* hybridization band patterns from the transformed *C. arabica* plants showed low-copy insertions, ranging from one to three copies. Transformed plants showed normal development and life cycle over this period comparable to the non-transformed control growing in the same conditions. Genetically-modified coffee fruits presented normal seed development, as reviewed by Eira et al. (2006), and generated zygotic embryos (T_1) presenting Mendelian segregation pattern of the *uidA* gene expression.

We found that the dCaMV35s promoter drove high expression of the *uidA* gene in coffee beans. This marker system is still useful to determine the optimum conditions for gene transfer to fruit trees (Padilla et al. 2006; Maghuly et al. 2008) and to study gene expression in fruit tissues (Honda and Moriguchi 2006). It is important to notice that fruit-specific expression could be misinterpreted if indirectly assessed from different organs as observed by Torregrosa et al. (2008) in the responses of leaves and fruits of the

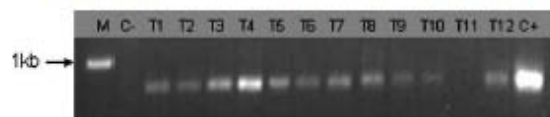


Figure 3. Detection of the *uidA* gene by PCR in 12 *C. arabica* transformants. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% (v/v) agarose gel as follows: (M) molecular marker, 1-kb DNA ladder; (C-) negative control, DNA extracted from *C. arabica* cv. Mundo Novo; (T1 to T12) DNA extracted from GUS-positive plants acclimatized in greenhouse; and (C+) positive control, plasmid DNA from pBI426.

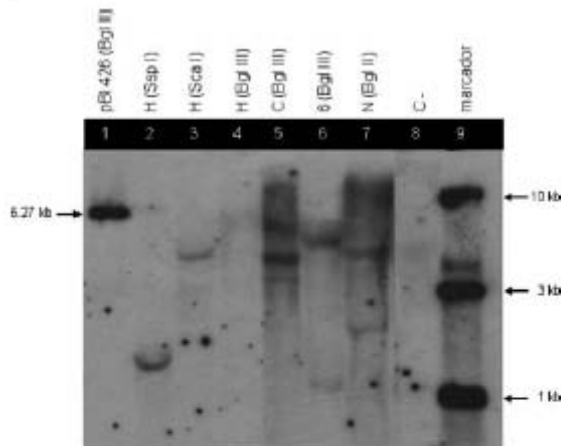


Figure 4. Southern blot analysis of *C. arabica* plants transformed with plasmid vector pBI426. DNA samples (10 μ g) from the T3 (5), T8 (6), and T5 (7) events were digested with *Bgl*III while DNA from the T4 event was digested with *Sca*I (2), *Ssp*I (3), and *Bgl*II (4). The *Ssp*I enzyme cuts at least twice into the vector producing a fragment near 1,524 bp. DNA-restricted fragments were hybridized with an oligolabeled *npII* probe (811 bp) obtained by digestion of pBI426 vector with *Ssp*I. The *Bgl*III-linearized vector (350 pg) was used as positive control (1) while the *Bgl*III-digested DNA from a non-transformed *C. arabica* plant was the negative control (8). A high molecular mass ladder (9) from Promega[®] was used throughout.

same transformed grapevine individuals. Coffee fruits presented deepest blue staining in endosperm tissues in the present study (Fig. 5d-f) probably due to their metabolically high activity, which provides a source of carbohydrate and other reserves for the growing seedling (Dentan 1985; Bewley and Black 1994). Flower tissues were responsive to the GUS staining, but this material also presented some degree of oxidation, which partially hampered visualization of the GUS expression. Nevertheless, the presence of GUS in inner organs, such as the flower ovary, was confirmed in histological sections (Fig. 5c).

There is a demand for improving the genetic modification of *C. arabica* varieties because Arabica varieties are the most important genotypes for the global coffee market. While the genetic transformation of *C. arabica* tissues has already been achieved (Van Bostel et al. 1995; Fernandez-Da Silva and Menéndez-Yuffá 2003; Rosillo et al. 2003), only a few regenerated and genetically modified plants were reported (Leroy et al. 2000), and no data is available about their offspring. The viability of the bombardment method to transform coffee was demonstrated previously in *C. canephora* (Ribas et al. 2005). Here, we describe the genetic modification by bombardment of *C. arabica* fruits that is similar to precursor work for transformation experiments with the α -amylase inhibitor (Valencia et al. 2000), aiming to develop resistance of coffee plants to the coffee berry borer parasite (unpublished data). This methodology may be transferred

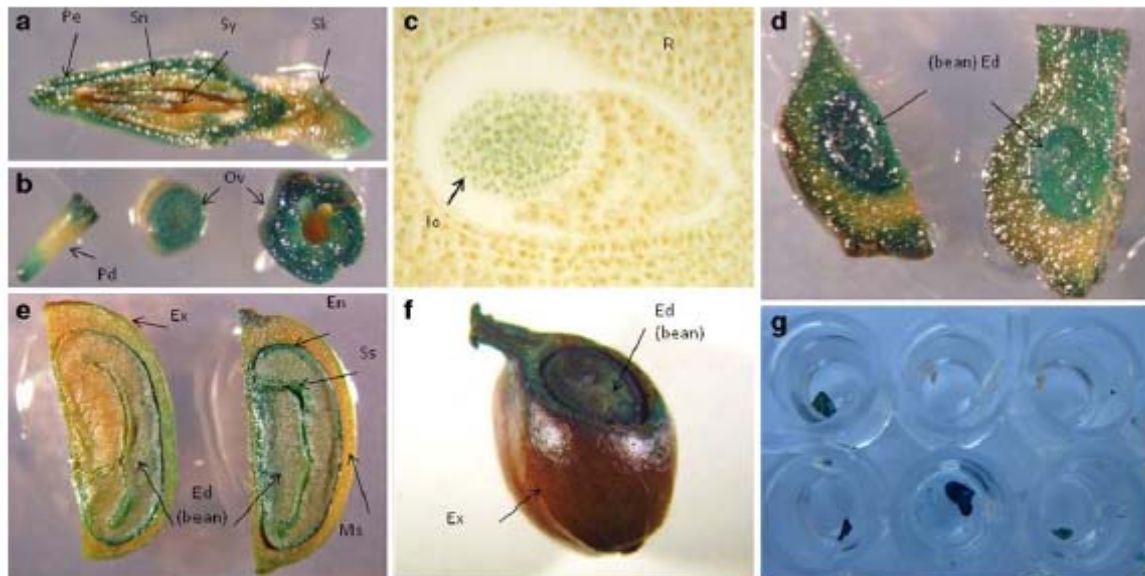


Figure 5. Cut samples from transformed *C. arabica* plants after GUS staining assays: (a) flower bud divided in two; (b) pedicel and initial seed development from ovary at the pin head stage; (c) chopped pin heads; (d) sliced bean of green immature cherry; (e) whole mature cherry; (f) ovary section under light microscopy ($\times 200$), pin head

longitudinal serial semithin sections stained with xylol; and (g) cotyledon samples from zygotic embryos (T_1 generation) from the transformation event T4. *Ed* endosperm, *Ex* exocarp, *En* endocarp, *Ms* mesocarp, *Ss* silver skin, *Ov* ovary, *Sk* stalk, *Sy* style, *Sn* stamen, *Pe* petals, *Pd* pedicel, *Io* immature ovule, *R* receptacle.

from *C. arabica* Catuai Vermelho to other coffee varieties considering that bombardment is not genotype-dependent as is *Agrobacterium*-mediated transformation. To our knowledge, the results presented in this paper constitute the first report of long-term, stable GUS expression and heritability of such a transgene in coffee fruits. While an initial report, the protocol described here constitutes a useful tool for the introduction of agronomic traits and for the functional validation of candidate genes in *C. arabica* fruits.

Acknowledgments *C. arabica* seeds were kindly provided by Dr. Antonio A. Pereira from EPAMIG. This research was supported by the "Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café" and Embrapa.

References

- Aragão F. J. L.; Barros L. M. G.; Brasileiro A. C. M.; Ribeiro S. G.; Smith F. D.; Sanford J. C.; Faria J. C.; Rech E. L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor Appl Genet* 93: 142–150; 1996.
- Bewley J. D.; Black M. Seeds—physiology of development and germination. Plenum Press, New York; 1994.
- Datl R. S. S.; Hammerlindl J. K.; Pekker L. E.; Crosby W. L.; Selvaraj G. A bifunctional fusion between β -glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101: 239–246; 1991.
- De Castro R. D.; Marracini P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz J Plant Physiol* 18: 175–199; 2006.
- Dentan E. The microscopic structure of coffee bean. In: Clifford M.; Wilson K. (eds) Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. Avi Publishing Company, Westport, pp 284–304; 1985.
- Doyle J. J.; Doyle J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15; 1987.
- Eira M. T. S.; Amaral da Silva E. A.; de Castro R. D.; Dussert S.; Walters C. J.; Bewley D.; Hilhorst H. W. M. Coffee seed physiology. *Braz J Plant Physiol* 18: 149–163; 2006.
- Etienne H.; Anthony F.; Dussert S.; Fernandez D.; Lashermes P.; Bertrand B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell Dev Biol, Plant* 38: 129–138; 2002.
- Fernandez D.; Santos P.; Agostini C.; Bon M.-C.; Petitot A.-S.; Silva M. C.; Guerra-Guimarães L.; Ribeiro A.; Argout X.; Nicole M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol Plant Pathol* 5: 527–536; 2004.
- Fernandez-Da Silva R.; Menéndez-Yuffá A. Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electron J Biotechnol* 6: 29–38; 2003.
- Gao M.; Matsuta N.; Murayama H.; Toyomasu T.; Mitsuhashi W.; Dandekar A. M.; Tao R.; Nishimura K. Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv. "La France") with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase. *Plant Sci* 173: 32–42; 2007.
- Hatanaka T.; Choi Y. E.; Kusano T.; Sano H. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 19: 106–110; 1999.
- Honda C.; Moriguchi T. High *gus* expression in protoplasts isolated from immature peach fruits. *Sci Hort* 109: 244–247; 2006.
- ICO International Coffee Organization. Global ICO site. <http://www.ico.org/>. Cited 20 Jun 2009; 2009.
- Jefferson R. A.; Kavanagh T. A.; Bevan M. W. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907; 1987.
- Lacorte C. β -glucuronidase (GUS). In: Brasileiro A. C. M.; Carneiro V. T. C. (eds) Manual de transformação genética de plantas. Embrapa/SPI, Brasília, pp 127–141; 1998.
- Leroy T.; Henry A. M.; Royer M.; Altosaar L.; Frutos R.; Duris D.; Philippe R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep* 19: 382–389; 2000.
- Lin C.; Mueller L.; McCarthy J.; Crouillard D.; Pétiard V.; Tanksley S. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor Appl Genet* 5: 1–17; 2005.
- Lloyd G.; McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Intl Plant Prop Soc* 30: 421–427; 1981.
- Maghuly F.; Khan M.; Fernandez E.; Duarte P.; Watillon B.; Laimer M. Stress regulated expression of the *gus*-marker gene (*uid4*) under the control of plant calmodulin and viral 35S promoters in a model fruit tree rootstock: *Prunus incisa* \times *serrula*. *J Biotechnol* 135: 105–116; 2008.
- Maheswaran G.; Pridmore L.; Franz P.; Anderson M. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Rep* 26: 773–782; 2007.
- Moore G. A.; Jacono C. C.; Neidigh J. L.; Lawrence S. D.; Cline K. *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11: 238–242; 1992.
- Murashige T.; Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497; 1962.
- Ogita S.; Uefuji H.; Morimoto M.; Sano H. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol* 54: 931–941; 2004.
- Padilla L.; Golis A.; Gentile A.; Damiano C.; Scorza R. Evaluation of transformation in peach *Prunus persica* explants using green fluorescent protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84: 309–314; 2006.
- Pereira L. F. P.; Galvão R. M.; Kobayashi A. K.; Cação S. M. B.; Vieira L. G. E. Ethylene production and *acc* oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Braz J Plant Physiol* 17: 283–289; 2005.
- Ribas A. F.; Kobayashi A. K.; Pereira L. F. P.; Vieira L. G. E. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. *Biologia Plantarum* 49: 493–497; 2005.
- Rosillo A. G.; Acuna J. R.; Gaitan A. L.; de Pena M. Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74: 45–49; 2003.
- Salmona J.; Dussert S.; Descroix F.; de Kochko A.; Bertrand B.; Joët T. Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. *Plant Mol Biol* 66: 105–124; 2008.
- Sambrook J.; Fritsch E. F.; Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 1989.
- Sanford J. C.; Devit M. J.; Russell J. A.; Smith F. D.; Harpending P. R.; Roy M. K.; Johnston S. A. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* 3: 3–16; 1991.

- Spiral J.; Thierry C.; Paillard M.; Pétiard V. Regeneration of plantlets of *Coffea canephora* pierre (robusta) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *C R Acad Sci III, Sci Vie* 316: 1-6; 1993.
- Teixeira JB, Junqueira CS, Pereira AJPC, Mello RIS, Silva APD, Mundim DA. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática. Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília; 2004: 39 pp.
- Torregrosa L.; Pradal M.; Souquet J.-M.; Rambert M.; Gunata Z.; Tesniere C. Manipulation of *VvAdh* to investigate its function in grape berry development. *Plant Sci* 174: 149-155; 2008.
- Valencia A.; Bustillo A. E.; Ossa G. E.; Chispeels M. J. Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 207-213; 2000.
- Van Boxtel J.; Berthouly M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44: 7-17; 1996.
- Van Boxtel J.; Berthouly M.; Carasco C.; Dufour M.; Eskes A. Transient expression of beta-glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Rep* 14: 748-752; 1995.
- Vieira L. G. E.; Andrade A. C.; Colombo C. A.; Moraes A. A. H.; Metha A.; Oliveira A. C.; Labate C. A.; Marino C. L.; Monteiro-Vitorello C. B.; et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18: 95-108; 2006.

DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi identificada nesse trabalho uma variedade de *C. arabica* (UFV 408-28) resistente à *M. incognita*. As respostas da resistência desse genótipo foram caracterizadas nos níveis histológico e molecular. Nós demonstramos que a resistência do genótipo UFV 408-28 se expressiu por uma reação do tipo RH, ocorrendo a morte das células racinares em torno do nematoide. As observações microscópicas indicaram que a infecção foi bloqueada após 6 dias de inoculação, antes da formação dos sítios nutricionais. Na planta suscetível (IAC15), o desenvolvimento do nematoide prosseguiu até o final do ciclo, com a produção de ovos e de novos juvenis em 45 dias. Os perfis de expressão de genes dos genótipos de *C. arabica* resistente e suscetível à infecção por *M. incognita* foram analisados em 4, 5 e 6 dias após infecção (DAI). Dos 91 genes amplificados por PCR quantitativa em tempo real, 43 mostraram alterações do perfil de expressão em alguma das amostras. O número de genes com perfil alterado aparentemente progrediu com o curso da infecção: 2 em 4 DAI; 17 em 5 DAI; 39 em 6 DAI. A expressão diferencial exclusiva de um genótipo foi observada em 16 genes na condição de resistência e em 19 genes na suscetibilidade. No genótipo resistente, a expressão de genes ligados à resistência dependente do AS ou da via metabólica de produção de compostos fenilpropanoides, parece ser particularmente alterada. Esses resultados são semelhantes àqueles obtidos em tomateiro portadora do gene *Mi-1*, onde o AS tem um papel essencial na resistência à *M. incognita* (Branch et al., 2004 ; Bhattarai et al., 2008).

No cafeeiro, esse trabalho constitui o primeiro estudo molecular das respostas fisiológicas desta planta aos nematoides. Esses resultados oferecem perspectivas interessantes para aprofundar a compreensão dos mecanismos que participam na indução das reações de defesa do cafeeiro aos *Meloidogyne* spp. De fato, com os resultados desse trabalho nós pudemos evidenciar algumas respostas de *C. arabica* tanto na compatibilidade como na incompatibilidade à *M. incognita* e identificar alguns genes da RH ativados.

Para implementar a validação *in vivo* dos genes que apresentaram alteração de expressão claramente relacionada à interação com o fitoparasita, iremos gerar vetores para estudos de interferência de RNA por transformação de raízes de cafeeiro. Como genes candidatos, temos um fator de transcrição (CaWRKY11) e 2 genes de defesa (PR10 e PR1b) que foram expressos somente pelo genótipo resistente em 6 DAI, o que indica forte ligação com a etapa de estabelecimento dos sítios de nutrição do nematoide. Outra possibilidade interessante a ser testada é a relação do gene do fator de transcrição CaWRKY6 com a suscetibilidade da planta, pois esse gene foi expresso somente no

genótipo suscetível nos dias 5 e 6 da infecção, podendo estar relacionados ao estabelecimento do nematoide. Finalmente, temos o resultado contrastante dos genes de duas proteínas “germin-like”, que foram alterados no genótipo resistente, porém um reprimido e o outro ativado, respectivamente, em 6 e 5 DAI.

Para uma compreensão mais geral dos mecanismos de defesa do cafeeiro aos nematoides, seria interessante verificar se as respostas da planta são similares no caso da interação com outras espécies de *Meloidogyne*. A maior parte dos genes que nós testamos são advindos de uma biblioteca de cDNA de cafeeiro inoculada com *M. exigua* (Lecoals et al., 2006). Os resultados preliminares obtidos sobre a expressão desses genes em interação incompatível indicam que as respostas moleculares da planta associadas à RH são diferentes entre as espécies de patógenos (Lecoals, comunicação pessoal).

Para complementar os resultados obtidos, seria importante incrementar o número de sequências expressas em raiz de cafeeiro infectadas com *M. incognita* ou *M. exigua*, espécies estas de RKN com genótipos identificados em cafeeiro que apresentam resistência específica. A produção de ESTs por pirosequenciamento, por exemplo, permitiria a geração de uma quantidade exaustiva de dados que abrangeria quase completamente a informação contida no transcrito da planta em interação com o nematoide. Esses dados poderiam viabilizar a verificação das vias metabólicas que são modificadas na planta. Em paralelo, poderia ser medida a taxa de AS e AJ produzidos nas raízes em interação com nematoide para verificar implication desses hormônios na resistência do cafeeiro aos *Meloidogyne* spp.

Adicionalmente, os dados de resposta aos hormônios poderiam fornecer indicações importantes sobre as modificações do metabolismo da planta que poderiam ser devidos à colonização pelo nématode. É sabido que a atividade dos efetores no parasitismo permitem ao nematoide evitar os mecanismos de defesa da planta e de converter o metabolismo da célula vegetal em seu benefício (Davis et al., 2008). O genoma de *M. incognita* foi sequenciado (Abad et al., 2008), o que significa que as fontes de informações serão brevemente aumentados em relação aos efetores de virulência do nematoide. Assim, existem certamente perspectivas interessantes para o empreendimento de estudos refinados da interação cafeeiro / *M. incognita*. A caracterização de alguns desses efetores de *M. incognita* (Bellafiore et al., 2008) está em curso no IRD para o estudo da interação nematoide-arrozeiro. Como existem diversos recursos disponíveis sobre a genética e a genômica de arroz, os dados derivados dos estudo com o arroz poderiam ser estendidos à interação com o cafeeiro. Assim, poderíamos

verificar se as estratégias de infecção do nematoide são conservadas nas diferentes espécies de hospedeira de *M. incognita*.

As evidências de ocorrência de RH na interação cafeeiro - *M. incognita* sugerem que, como observado em *M. exigua*, a resistência específica do cafeeiro poderia ser controlada por um gene de resistência principal. De fato, a resistência aos nematoides governada pelos genes *Nem-R* se exprime geralmente por uma RH (Williamson, 1999 ; Anthony et al., 2005; Pegard et al., 2005; Proite et al., 2008). Cruzamentos realizados à partir do genótipo UFV408-28 e estudos genéticos que estão em andamento permitirão verificar se o determinismo genético da resistência é do tipo monogênico dominante. Como para a variedade IAPAR59, resistente à *M. exigua* (Noir et al., 2003), o genótipo UFV 408-28 tem o Híbrido de Timor como um dos parentais, o que nos leva a crer que a característica de resistência seja derivada de *C. canephora*. Com o término do sequenciamento de *C. canephora*, que já está em curso, em breve poderemos ter as informações necessárias facilitar a clonagem do gene em questão.

Outra possibilidade oferecida pelos resultados relatados nessa tese é a transformação genética do cafeeiro. Com a modificação de cafeeiro com os genes que nós caracterizamos, seria possível estudar as funções dos genes potencialmente envolvidos na resistência aos nematoides. No início dessa tese, a transformação genética do cafeeiro estava sendo estabelecida por outros grupos de pesquisa. Os nossos trabalhos sobre os frutos de *C. arabica* transformados com o gene *uidA* confirmaram que a transformação estável de cafeeiro é realizável, mesmo que o tempo necessário para a regeneração das plantas e posterior floração sejam longos. Dessa forma, agora é razoável imaginar a obtenção de plantas de cafeeiro geneticamente modificadas, tanto para estudos genômicos, como para a inserção de características agrônômicas específicas. Além da transformação estável, também está disponível a obtenção de raízes de cafeeiro transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* (Alpizar et al., 2008), o que permite obter relativamente rápido os dados *in vivo* sobre o papel desempenhado por determinado gene durante a interação com os nematoides. Em um primeiro momento, a seleção de genes candidatos poderia ser feita na planta-modelo *A. thaliana*, ou no recém descrito acesso com resistência a RKN da planta-modelo *Medicago*. Abordagens de genética reversa poderiam ser utilizados para genes bem caracterizados e aqueles para os quais existem mutantes em *A. thaliana*. Recentemente, a complementação do mutante *ndr1-1* (implicado na sinalização da resistência em *A. thaliana*) pelo gene de cafeeiro *CaNDR1* foi alcançada com sucesso no

IRD (Cacas et al., 2009). A função do gene CcETR1 de *C. canephora* na percepção de etileno foi demonstrada utilizando-se a planta *A. thaliana* (Bustamante et al., 2007).

Os resultados obtidos nesse trabalho poderão ter interessantes repercussões aplicadas na pesquisa do cafeeiro. Eles deverão, particularmente, conduzir à identificação de genes podendo ser utilizados como marcadores de seleção eficazes nos programas de melhoramento. A curto prazo, a identificação de genes implicados na expressão da resistência fornecerá utensílios complementares às abordagens de genética clássica para a seleção assistida de variedades de *C. arabica* resistentes e permitirá a melhor valorização dos recursos genéticos de cafeeiro. A mais longo prazo, os trabalhos produzirão os elementos para a elaboração de novas estratégias de luta contra os parasitas, dentro de uma perspectiva de resistência durável em cafeeiro.

Além da caracterização de genes específicos das respostas de suscetibilidade ou de resistência, utilizáveis para o melhoramento genético do cafeeiro, nosso estudo trouxe igualmente dados fundamentais para a compreensão dos mecanismos de resistência das plantas aos nematoides. Considerando-se que não existe resistência ao *Meloidogyne* spp. na crucífera *A. thaliana*, e que mesmo nas plantas cultivadas hospedeiras ainda são escassos os conhecimentos o estudo da interação com os RKN, a informação que adquirimos com o cafeeiro deverão incrementar os conhecimentos sobre os mecanismos de resistência de plantas aos nematoides fitoparasitas.

2.5 Bibliografia

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B. J., Daniels, M. J. & E, P. J. (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10306-10311.
- Abad, P., Favery, B., Rosso, M. & Castagnone-Sereno, P. (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4, 217-224.
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V. C., Caillaud, M. C., Coutinho, P. M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J. V., Hamamouch, N., Hewezi, T., Jaillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T. R., Markov, G. V., Mcveigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Segurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., Van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T. J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E. L., Ewbank, J. J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J. T., Laudet, V., Maule, A. G., Quesneville, H., Rosso, M. N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J. & Wincker, P. (2008) Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26, 909-915.
- Abic (2009) Produção e exportação mundial de café, MDIC e SECEX, OIC, http://abic.com.br/estat_exporta_ppaises.html
- Aguiar, A. T. D. E. (2001) Descritores para caracterização de cultivares e linhagens de café tipo arábica. Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- Ahlfors, R., Brosche, M., Kollist, H. & Kangasjarvi, J. (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 58, 1-12.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., Tsaltas, D., Leng, Q., Von Bodman, S. & Berkowitz, G. A. (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* Cyclic Nucleotide Gated Channel 2 and innate immunity. *Plant Cell*, 19, 1081-1095.
- Allan, A. C. & Fluhr, R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9, 1559-1572.

- Almeras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Mene-Saffrane, L. & Farmer, E. E. (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 34, 202-216.
- Alonso, J. M. & Stepanova, A. N. (2004) The ethylene signaling pathway. *Science*, 306, 1513-1515.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A. C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P. & Etienne, H. (2006) Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Rep*, 25, 959-967.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., Lashermes, P. & Etienne, H. (2008) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annals of Botany*, 101, 929-940.
- Alpizar, E., Etienne, H. & Bertrand, B. (2007) Intermediate resistance to *Meloidogyne exigua* root-knot nematode in *Coffea arabica*. *Crop Protection*, 26, 903-910.
- Ammiraju, J. S. S., Veremis, J. C., Huang, X., Roberts, P. A. & Kaloshian, I. (2003) The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 478-484.
- Anthony, F., Combes, M. C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G. & Lashermes, P. (2002) The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 894-900.
- Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M., Nicole, M. & Silva, A. R. (2005) Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology*, 54, 476-482.
- Atkinson, M. M., Midland, S. L., Sims, J. J. & Keen, N. T. (1996) Syringolide 1 triggers Ca^{2+} influx, K^{+} efflux, and extracellular alkalization in soybean cells carrying the disease-resistance gene Rpg4. *Plant Physiology*, 112, 297-302.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. & Schulze-Lefert, P. (2002) The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of R Gene-Triggered Disease Resistance. *Science*, 295, 2073.
- Bajaj, K. L. & Mahajan, R. (1977) Influence of Some Nematicides on Chemical Composition of Tomato Fruits (*Lycopersicon-Esculentum* L). *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition*, 27, 335-338.

- Barrons, K. C. (1939) studies on the nature of the root-knot resistance. *Journal of Agricultural Resistance*, 58, 263-271.
- Barsalobres-Cavallari, C. F., Severino, F. E., Maluf, M. P. & Maia, I. G. (2009) Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *Bmc Molecular Biology*, 10.
- Bednarek, P. & Osbourn, A. (2009) Plant-Microbe Interactions: Chemical Diversity in Plant Defense. *Science*, 324, 746-748.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M. C., Vercammen, D., Brackener, A., Inze, D., Delledonne, M. & Van Breusegem, F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 1352-1358.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M.-N., Abad, P., Shih, P. & Briggs, S. P. (2008) Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog*, 4, e1000192.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. & Baulcombe, D. C. (1999) The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, 11, 781-791.
- Bennett, M. D. & Leitch, I. J. (1995) Nuclear-DNA Amounts in Angiosperms. *Annals of Botany*, 76, 113-176.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., Lopez, G., Garcia-Olmedo, F. & Molina, A. (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology*, 128, 951-961.
- Berthaud, J. & Charrier, A. (1988) Genetic resources of *Coffea*. In: Clarke, R. J. & Macrae, R. (Eds.), *Coffee*. Elsevier Applied Science, London, 1-42.
- Bertrand, B. & Anthony, F. (2008) Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: Souza, R. M. (Ed.), *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Springer, Berlin, 165-190.
- Bertrand, B., Aguilar, G., Bompard, E., Rafinon, 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., Anthony, F. & Lashermes, P. (2001) Breeding for resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica* by introgression of resistance genes of *Coffea canephora*. *Plant Pathology*, 50, 637-643.

- Bertrand, B., Etienne, H. & Eskes, A. (2001) Growth, production, and bean quality of *Coffea arabica* as affected by interespecific grafting: consequences for rootstock breeding. *HortScience*, 36, 269-273.
- Bertrand, B., Guyot, B., Anthony, F. & Lashermes, P. (2003) Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of C-arabica. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 387-394.
- Bhattacharai, K. K., Li, Q., Liu, Y., Dinesh-Kumar, S. P. & Kaloshian, I. (2007) The Mi-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiology*, 144, 312-323.
- Bhattacharai, K. K., Xie, Q. G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A. & Kaloshian, I. (2008) Tomato Susceptibility to Root-Knot Nematodes Requires an Intact Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 21, 1205-1214.
- Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q. H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbiss, H. H., Shirasu, K. & Schulze-Lefert, P. (2004) RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell*, 16, 3480-3495.
- Bird, D. M. & Kaloshian, I. (2003) Are roots special? Nematodes have their say *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 115-123.
- Bird, D. M. & Wilson, M. A. (1994) DNA-Sequence and Expression Analysis of Root-Knot Nematode-Elicited Giant-Cell Transcripts. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7, 419-424.
- Bird, D. M. (1996) Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. *Journal of Parasitology*, 82, 881-888.
- Bird, D. M. (2004) Signaling between nematodes and plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 372-376.
- Bird, D. M., Williamson, V. M., Abad, P., Mccarter, J., Danchin, E. G. J., Castagnone-Sereno, P. & Opperman, C. H. (2009) The genomes of root-knot nematodes. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 333-51.
- Boccardo, M., Mills, C. E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R. K. & Delledonne, M. (2005) Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant Journal*, 43, 226-237.

- Boller, T. & He, S. Y. (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324, 742-744.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. & Minibayeva, F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1367-1376.
- Branch, C., Hwang, C. F., Navarre, D. A. & Williamson, V. M. (2004) Salicylic acid is part of the Mi-1-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17, 351-356.
- Bridson, D. M. & Verdcourt, B. (1988) *Flora of tropical East Africa: Rubiaceae. (Part 2).* CapeTown, Iziko Museums of Cape Town.
- Bridson, D. M. (1994) Additional Notes on *Coffea* (Rubiaceae) from Tropical East Africa. *Kew Bulletin*, 49, 331-342.
- Broekaert, W. F., Delaure, S. L., De Bolle, M. F. C. & Cammuel, B. P. A. (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 393-416.
- Burgess, T. L. & Kelly, R. B. (1987) Constitutive and Regulated Secretion of Proteins. *Annual Review of Cell Biology*, 3, 243-293.
- Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., Vandaelen, R., Vanderlee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F. & Schulze-Lefert, P. (1997) The barley mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88, 695-705.
- Bustamante, J., Poncet, V., Campa, C., Noirot, M., Hamon, S. & De Kochko, A. (2007) Characterization of three ethylene receptor genes in *Coffea canephora* Pierre. *Advances in Plant Ethylene Research*, 53-+.
- Cacas, J.-L., Marmey, P., Montillet, J.-L., Sayegh-Alhamdia, M., Jalloul, A., Rojas-Mendoza, A., Clerivet, A. & Nicole, M. (2009) A novel patatin-like protein from cotton plant, GhPat1, is co-expressed with GhLox1 during *Xanthomonas campestris*-mediated hypersensitive cell death. *Plant Cell Rep.*, 28, 155-164.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H., Sandal, N. N., Marcker, K. A., Klein-Lankhorst, R. M., Salentjin, E. M., Lange, W., Stiekema, W. J., Wyss, U., Grundler, F. M. W. & Jung, C. (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 275, 832-834.

- Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, de Almeida Engler J, Abad P, Rosso MN, Favery B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. 2008. *J Plant Physiol.* 165:104-13.
- Caixeta , G. Z. T. & Teixeira, S. M. (1999) A globalização e o mercado do café. *Informe Agropecuário*, 20, 74-82.
- Campos, V. & Silva, J. (2008) Management of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. In: Rm, S. (Ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of coffee*. Springer, Dordrecht, 149-164.
- Campos, V. P. & Villain, L. (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, 529-79.
- Campos, V. P. (1997) *Café (Coffea arabica L.) Controle de doenças. Doenças causadas por nematóides*. In: Vale, F. X. R. & Zambolim, L. (Eds.), *Controle de doenças de plantas*. UFV, Viçosa, 141-180.
- Campos, V. P. (1997) *Doenças causadas por nematóides no cafeeiro*. In: Vale, F. X. R. D. Z., L. (Ed.), *Controle de doenças de plantas: Grandes Culturas*. Universidade Federal de Viçosa, 590.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. & Dong, X. N. (1994) Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired-Resistance. *Plant Cell*, 6, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S. & Dong, X. N. (1997) The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88, 57-63.
- Caplan, J., Padmanabhan, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2008) Mant NB-LRR immune receptors: From recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host & Microbe*, 3, 126-135.
- Carneiro, R. G. & Carneiro, R. D. M. G. (1982) Seleção preliminar de plantas para rotação de culturas em áreas infestadas por *Meloidogyne incognita* nos anos de 1979 e 1980. *Nematologia Brasileira*, 6, 141-148.
- Carneiro, R. M. D. G. & Almeida, M. R. A. (2000) Distribution of *Meloidogyne* spp. on Coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability. *Mejoramiento sostenible del café arabica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, com énfasis en la resistencia a los nemátodos*. Turrialba, CATIE/IRD.

- Carneiro, R. M. D. G. & Cofcewicz, E. T. (2008) Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer, Berlin, 87-122.
- Carneiro, R. M. D. G., Carneiro, R. G., Abrantes, I. M. O., Santos, M. S. N. A. & Almeida, M. R. A. (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. Journal of Nematology, 28, 177-189.
- Carneiro, R. M. D. G., Carneiro, R. G., Abrantes, I. M. O., Santos, M. S. N. A. & Almeida, M. R. A. (1996) *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. Journal of Nematology, 28, 177-189.
- Carneiro, R. M. D. G., Tigano, M., Randig, O., Almeida, M. R. A. & Sarah, J. L. (2004) Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. Nematology, 6, 287-298.
- Carvalho, A. & Krug, C. A. (1950) Genética de Coffea. XIII - Hereditariedade do característico erecta em Coffea arábica L. Bragantia.
- Carvalho, A. (1946) Distribuição geográfica e classificação botânica do gênero Coffea com referência especial à espécie Arabica. Separata dos Boletins da Superintendência dos Serviços do Café. São Paulo.
- Carvalho, A., Tango, J. S. & Monaco, L. C. (1965) Genetic control of caffeine content in coffee. Nature, 205-314.
- Century, K. S., Shapiro, A. D., Repetti, P. P., Dahlbeck, D., Holub, E. & Staskawicz, B. J. (1997) NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. Science, 278, 1963-1965.
- Chapman, E. J. & Carrington, J. C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. Nature Reviews Genetics, 8, 884-896.
- Chaturvedi, R., Krothapalli, K., Makandar, R., Nandi, A., Sparks, A. A., Roth, M. R., Welti, R. & Shah, J. (2008) Plastid omega 3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of Arabidopsis thaliana is independent of jasmonic acid. Plant Journal, 54, 106-117.

- Chen, R. G., Li, H. X., Zhang, L. Y., Zhang, J. H., Xiao, J. H. & Ye, Z. B. (2007) CaMi, a root-knot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsium annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Rep.*, 26, 895-905.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. & Felix, G. (2006) The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, 18, 465-476.
- Claverie, M., Bosselut, N., Voisin, R., Esmenjaud, D., Chalhoub, B., Dirlewanger, E., Kleinhentz, M. & Laigret, F. (2004) High resolution map of the Ma gene for resistance to root-knot nematodes in myrobalan plum (*Prunus cerasifera*). *Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, Vols 1 and 2, 69-74.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I. C., Lippok, B., Smith, R. K. & Bent, A. F. (2000) The Arabidopsis *dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9323-9328.
- Coppinger, P., Repetti, P. P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A. & Staskawicz, B. J. (2004) Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 40, 225-237.
- Croft, K. P. C., Voisey, C. R. & Slusarenko, A. J. (1990) Mechanism of Hypersensitive Cell Collapse - Correlation of Increased Lipoygenase Activity with Membrane Damage in Leaves of *Phaseolus-Vulgaris* (L) Inoculated with an Avirulent Race of *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36, 49-62.
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G. & Yokota, T. (2000) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: B.B. Buchanan, W. G. A. R. L. J. (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, 850-929.
- Cruz, F., Kalaoun, S., Nobile, P., Colombo, C., Almeida, J., Barros, L. M. G., Romano, E., Grossi-De-Sa, M. F., Vaslin, M. & Alves-Ferreira, M. (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding*, 23, 607-616.

- Cubry, P., Musoli, P., Legnate, 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, S., Silveira, S. & Elias, E. J. (1977) Resultados de produção e da protecção do sistema radicular de cafeeiros sob controle químico do nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1969) Chitwood 1949, em condições de campo. *Nematologia Brasileira*, 2, 93-99.
- D. M. Szebenyi, C. U., <http://news.chess.cornell.edu/articles/2007/Structure.html>
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826-33.
- Das, S., Demason, D. A., Ehlers, J. D., Close, T. J. & Roberts, P. A. (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.
- Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M. & Stoffelen, P. (2006) An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 465-512.
- Davis, E. L., Hussey, R. S. & Baum, T. J. (2004) Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, 20, 134-141.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J. & Schots, A. (2000) Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 365-396.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Mitchum, M. G. & Baum, T. J. (2008) Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 360-366.
- Davis, EL *et al.* 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 360-366.
- Day, B., Dahlbeck, D. & Staskawicz, B. J. (2006) NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 2782-2791.
- De Almeida Engler, J., Favery, B., Engler, G. & Abad, P. (2005) Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 112-7.
- De Almeida Engler, J., Van Poucke, K., Karimi, M., De Groodt, R., Gheysen, G., Engler, G. & Gheysen, G. (2004) Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J*, 38, 12-26.

- De Gara, L., De Pinto, M. C. & Tommasi, F. (2003) The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 863-870.
- Dedeca, D. M. (1957) Aspectos anatômicos da variação na folha do cafeeiro. *Bragantia*, 16, 389-410.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P. F., Biondani, A., Polverari, A. & Lamb, C. (2002) Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 605-610.
- Dhandaydham, M., Charles, L., Zhu, H., Starr, J. L., Huguet, T., Cook, D. R., Prosperi, J. M. & Opperman, C. (2008) Characterization of root-knot nematode resistance in *Medicago truncatula*. *Journal of Nematology*, 40, 46-54.
- Diatchenko, L., Lau, Y. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Hung, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 6025-6030.
- Ding, S. W. & Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130, 413-426.
- Diniz, L., Sakiyama, N., Lashermes, P., Caixeta, E., Oliveira, A., Zambolim, E., Loureiro, M., Pereira, A. & 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.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Howad, W., Capdeville, G., Bosselut, N., Claverie, M., Voisin, R., Poizat, C., Lafargue, B., Baron, O., Laigret, F., Kleinhentz, M., Arus, P. & Esmenjaud, D. (2004) Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid - location of root-knot nematode resistance genes. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 827-838.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Dixon, R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843-847.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A. & Abad, P. (2001) High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annum* L.) resistance loci Me-3 and Me-4

- conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theor. Appl. Genet.*, 103, 592-600.
- Doke, N. & Ohashi, Y. (1988) Involvement of an O₂-Generating System in the Induction of Necrotic Lesions on Tobacco-Leaves Infected with Tobacco Mosaic-Virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32, 163-175.
- Dong, X. N. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 316-323.
- Dropkin, V. H. (1969) Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review of Phytopathology*, 7, 101-122.
- Dublin, P. (1984) Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*, 25, 237-244.
- Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P. & Rosso, M. N. (2007) Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytologist*, 176, 426-436.
- Dutra, M. R. (2003) Nematóides avançam no café. *Revista Cultivar*.
- Egelund, J., Skjot, M., Geshi, N., Ulvskov, P. & Petersen, B. L. (2004) A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes. *Plant Physiology*, 136, 2609-2620.
- Eichmann, R., Schultheiss, H., Kogel, K. H. & Huckelhoven, R. (2004) The barley apoptosis suppressor homologue bax inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 17, 484-490.
- Embrapa Café (2004) Histórico, <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/unidade/historico.htm>
- Endo, B. Y. (1984) Ultrastructure of the Esophagus of Larvae of the Soybean Cyst Nematode, *Heterodera-Glycines*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 51, 1-24.
- Ernst, K., Kumar, A., Kriseleit, D., Kloos, D. U., Phillips, M. S. & Ganai, M. W. (2002) The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant Journal*, 31, 127-136.
- Escobar, C., Barcala, M., Portillo, M., Almoguera, C., Jordano, J. & Fenoll, C. (2003) Induction of the Hahsp17.7G4 promoter by root-knot nematodes: Involvement of

- heat-shock elements in promoter activity in giant cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, 1062-1068.
- Etienne, H., Anthony, F., Dussert, S., Fernandez, D., Lashermes, P. & Bertrand, B. (2002) Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38, 129-138.
- Farmer, E. E. & Ryan, C. A. (1992) Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase-Inhibitors. *Plant Cell*, 4, 129-134.
- Favery, B., Jammes, F., Lecomte, P., Complainville, A., Vinardell, J. M., Kondorosi, E., Crespi, M. & Abad, P. (2004) Characterisation of plant genes involved in giant cells formation induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*. *Proceeding of the Fourth International Congress of Nematology*, 2, 351-358.
- Favery, B., Lecomte, P., Gil, N., Bechtold, N., Bouchez, D., Dalmaso, A. & Abad, P. (1998) RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *Embo J.*, 17, 6799-6811.
- Fazuoli, L., Gonçalves, W. & Braghini, M. (2006) Tupi RN 1669-13: a coffee cultivar resistant to *Hemileia vastatrix* and *Meloidogyne exigua*. 21st ASIC International Conference on Coffee Science Montpellier.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y. Q., Pallas, J. A. & Loake, G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8054-8059.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18, 265-276.
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bon, M.-C., Petitot, A.-S., Silva, M. C., Guerra-Guimarães, L., Ribeiro, A., 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.
- Fernandez-Da Silva, R. & Menéndez-Yuffá, A. (2003) Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electron. J. Biotechnol.*, 6, 29-38.
- Ferraz, L. C. C. B. (2008) Brazil. In: R.M., S. (Ed.), *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Springer, Berlin, 225-248.

- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Rev. Phytopathol.*, 9, 275-296.
- Fosu-Nyarko, J., Jones, M. G. K. & Wang, Z. H. (2009) Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. *Molecular Plant Pathology*, 10, 237-248.
- Fragoso, R. D., Lourenco, I. T., Batista, J. A. N., Oliveira-Neto, O. B., Silva, M. C. M., Rocha, T. L., Coutinho, M. V. & Grossi-De-Sa, M. F. (2009) *Meloidogyne incognita*: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase. *Experimental Parasitology*, 121, 115-123.
- Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. & Oliver, R. P. (2008) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology*, 10, 1421-1428.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2008) Nematode resistance. *New Phytologist*, 180, 27-44.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2008) Nematode resistance. *New Phytologist*, 180, 27-44.
- Gabriel, D. W. & Rolfe, B. G. (1990) Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 365-391.
- Gao, M., Matsuta, N., Murayama, H., Toyomasu, T., Mitsuhashi, W., Dandekar, A. M., Tao, R. & Nishimura, K. (2007) Gene expression and ethylene production in transgenic pear (*Pyrus communis* cv. 'La France') with sense or antisense cDNA encoding ACC oxidase. *Plant Sci.*, 173, 32-42.
- Gao, X. Q., Starr, J., Gobel, C., Engelberth, J., Feussner, I., Tumlinson, J. & Kolomiets, M. (2008) Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 21, 98-109.
- Gaupels, F., Furch, A. C. U., Will, T., Mur, L. A. J., Kogel, K. H. & Van Bel, A. J. E. (2008) Nitric oxide generation in *Vicia faba* phloem cells reveals them to be sensitive detectors as well as possible systemic transducers of stress signals. *New Phytologist*, 178, 634-646.
- Gheysen, G. & Fenoll, C. (2002) Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 191-219.
- Ghini, R., Hamada, E., Júnior, M. J. P., Marengo, J. A. & Gonçalves, R. R. V. (2008) Risk analysis of climate change on coffee nematodes and leaf miner in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 187-194.

- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Gleason, C. A., Liu, Q. L. & Williamson, V. M. (2008) Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene Mi-1 leads to acquisition of virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 21, 576-585.
- Gobel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. & Rosahl, S. (2001) Oxylin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 6267-6273.
- Goellner, M., Wang, X. H. & Davis, E. L. (2001) Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *Plant Cell*, 13, 2241-2255.
- Goggin, F. L., Shah, G., Williamson, V. M. & Ullman, D. E. (2004) Instability of Mi-mediated nematode resistance in transgenic tomato plants. *Molecular Breeding*, 13, 357-364.
- Gomez-Gomez, L. & Boller, T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science*, 7, 251-256.
- Gonçalves, W. & Ferraz, L. C. C. B. (1987) Resistência do cafeeiro a nematóides. II- Testes de progênies e híbridos para *Meloidogyne incognita* raça 3. *Nematologia Brasileira*, 11, 125-142.
- Gonçalves, W. & Pereira, A. A. (1998) Resistência do cafeeiro a nematóides IV - Reação de cafeeiros derivados do híbrido de timor a *Meloidogyne exigua*. *Nematologia Brasileira*, 22, 39-50.
- Gonçalves, W., Ferraz, L. C. C. B., Lima, M. M. A. D. & Silvarolla, M. B. (1996) Patogenicidade de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* raça 1 a mudas de cafeeiros. *Bragantia*, 55, 89-93.
- 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. *Plant Journal*, 23, 441-450.
- Gravato Nobre, M. J., Von Mende, N., L., D., Schmidt, K. P., Evans, K. & Mulligan, B. (1995) Immunolabelling of cell surfaces of *Arabidopsis thaliana* roots following infection by *Meloidogyne incognita* (Nematoda) *Journal of Experimental Botany*, 46, 1711-1720.

- Gutierrez, O. A., Wubben, M. J., Howard, M., Roberts, B., Hanlon, E. & Wilkinson, J. R. (2009) The role of phytohormones ethylene and auxin in plant-nematode interactions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, 1-5.
- Gutjahr, C. & Paszkowski, U. (2009) Weights in the Balance: Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling in Root-Biotroph Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22, 763-772.
- Guzzo, S. D., Harakava, R. & Tsai, S. M. (2009) Identification of Coffee Genes Expressed During Systemic Acquired Resistance and Incompatible Interaction with *Hemileia vastatrix*. *Journal of Phytopathology*, 157, 625-638.
- Hafez, Y. M., Kiraly, Z. & Manninger, K. (2009) Hydrogen Peroxide Has a Key Role in Resistance to Leaf Rust (*Puccinia Triticina*) in Several Egyptian and Other Wheat Cultivars. *Cereal Res. Commun.*, 37, 161-164.
- Hammond-Kosack, K. E. & Kanyuka, K. (2007) Resistance genes (R genes) in plants. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1-21.
- Haseloff, J. & Amos, B. (1995) Gfp in Plants. *Trends in Genetics*, 11, 328-329.
- Hatanaka, T., Choi, Y. E., Kusano, T. & Sano, H. (1999) Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 19, 106-110.
- Heath, M. C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.*, 44, 321-334.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- Hernandez, A., Fargette, M. & Sarah, J. (2004) Pathogenicity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida:Meloidogynidae) isolates from Central America and Brazil on four genotypes of coffee. *Nematology*, 6, 205-213.
- Honda, C. & Moriguchi, T. (2006) High GUS expression in protoplasts isolated from immature peach fruits *Sci. Hortic.*, 109, 244-247.
- Hua, J. & Meyerowitz, E. M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94, 261-271.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q. H. G., Bleecker, A. B., Ecker, J. R. & Meyerowitz, E. M. (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1321-1332.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. & Hussey, R. S. (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *PNAS*, 103, 14302-14306.

- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E., Baum, T. & Hussey, R. (2006) A Root-Knot Nematode Secretory Peptide Functions as a Ligand for a Plant Transcription Factor. *Mol Plant–Microbe Interact*, 19, 463-470.
- Huffaker, A., Pearce, G. & Ryan, C. A. (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 10098-10103.
- Hunt, D. J., Luc, M. & Manzilla-López, R. H. (2005) Identification, morphology and biology of plant parasitic nematodes In: Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK
- Hussey, R. & Davis, E. (2004) Nematode esophageal glands and plant protection. In: Chen, Z., Chen, S. & Dickson, D. (Eds.), *Nematology: advances and perspectives*. CABI Publishing, 258-294.
- Hussey, R. S. & Mims, C. W. (1990) Ultrastructure of Esophageal Glands and Their Secretory Granules in the Root-Knot Nematode *Meloidogyne-Incognita*. *Protoplasma*, 156, 9-18.
- Hussey, R. S. (1989) Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 123-141.
- Hwang, C. F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M. & Williamson, V. M. (2000) Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. *Plant Cell*, 12, 1319-1329.
- ICO (2009) Exports by exporting countries to all destinations, http://www.ico.org/trade_statistics.asp
- ICO (2010) Um desenvolvimento sustentável da Economia Cafeeira http://www.ico.org/sustainable_coffee.asp
- Instituto Brasileiro Do Café (1985) *Cultura do café no Brasil*. In: Ibc (Ed.) *Manual de Recomendações*. Rio de Janeiro.
- ISAAA (2008) Crop Biotech Update <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/default.asp>
- Jaehn, A. (1984) Recuperação de lavouras recepadas com utilização de *Crotalaria spectabilis*, torta de mamona e nematicidas, em áreas infestadas por *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira*, 8, 257-264.

- Jalloul, A., Montillet, J. L., Assigbetse, K., Agnel, J. P., Delannoy, E., Triantaphylides, C., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger, J. P. & Nicole, M. (2002) Lipid peroxidation in cotton: Xanthomonas interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant Journal*, 32, 1-12.
- Jammes, F., Lecomte, P., Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P. & Favery, B. (2005) Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant Journal*, 44, 447-458.
- Jaubert, S., Milac, A. L., Petrescu, A. J., De Almeida-Engler, J., Abad, P. & Rosso, M. N. (2005) In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, 1277-1284.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J.*, 6, 3901-3907.
- Jin, H. L. (2008) Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *Febs Letters*, 582, 2679-2684.
- Jones, A. M. (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology*, 125, 94-97.
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Jones, M. G. K. & Northcot.Dh (1972) Nematode-Induced Syncytium - Multinucleate Transfer Cell. *Journal of Cell Science*, 10, 789-&.
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T. & Helm, J. M. (2008) RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell*, 100, 13-26.
- Karczmarek, A., Overmars, H., Helder, J. & Goverse, A. (2004) Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Molecular Plant Pathology*, 5, 343-346.
- Karlovsky, P. (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Natural Toxins*, 7, 1-23.
- Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 95, 461-470.
- Kawai, M., Pan, L., Reed, J. C. & Uchimiya, H. (1999) Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *Febs Letters*, 464, 143-147.

- Keen, N., Ersek, T., Long, M., Bruegger, B. & Holliday, M. (1981) Inhibition of the hypersensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas* spp. by blasticidin S, streptomycin or elevated temperature. *Physiology Plant Pathology*, 18, 325-337.
- Kiba, A., Takata, O., Ohnishi, K. & Hikichi, Y. (2006) Comparative analysis of induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. *Planta*, 224, 981-994.
- Király, L., Barnaz, B. & Kiralyz, Z. (2007) Plant resistance to pathogen infection: Forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *Journal of Phytopathology*, 155, 385-396.
- Knight, V. I., Wang, H., Lincoln, J. E., Lulai, E. C., Gilchrist, D. G. & Bostock, R. M. (2001) Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 277-286.
- Koltai, H., Dhandaydham, M., Opperman, C., Thomas, J. & Bird, D. (2001) Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14, 1168-1177.
- Krug, C. E. C., A. (1939) Genetical proof of existence of coffee endosperm. *Nature*, 144, 515.
- Krzyszowska, M., Konopka-Postupolska, D., Sobczak, M., Macioszek, V., Ellis, B. E. & Hennig, J. (2007) Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *Plant Journal*, 50, 253-264.
- Krzyzanowski, A. A. (2000) *Café: medidas para controle de nematóides*, IAPAR, Londrina.
- Krzyzanowski, A. A., Figueiredo, R., Santiago, D. C. & Favoreto, L. (2001) Levantamento de espécies e raças de Meloidogyne em cafeeiros no estado do Paraná. In: Rocha, A. N., Rufino, J. L. S. & Giusti, W. M. (Eds.) *II Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil*. Vitória, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).
- Kushalappa, A. C. & Eskes, A. B. (1989) Advances in Coffee Rust Research. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 503-531.
- Kwon, C., Bednarek, P. & Schulze-Lefert, P. (2008) Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiology*, 147, 1575-1583.

- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251-275.
- Lao, N. T., Long, D., Kiang, S., Coupland, G., Shoue, D. A., Carpita, N. C. & Kavanagh, T. A. (2003) Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, 53, 687-701.
- Lashermes, P., Andrzejewski, S., Bertrand, B., Combes, M.-C., Dussert, S., Graziosi, G., Trouslot, P. & Anthony, F. (2000) Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 100, 139-146.
- Lashermes, P., Combes, M.-C., Robert, J., Trouslot, P., D'hont, A., Anthony, F. & Charrier, A. (1999) Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, 261, 259-266.
- Lecoq, A.-C., Petitot, A.-S. & Fernandez, D. (2006) Early expressed genes in the coffee resistance response to root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) infection. *Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science - ASIC*. Montpellier - France.
- Ledger, T. N., Jaubert, S., Bosselut, N., Abad, P. & Rosso, M. N. (2006) Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene*, 382, 121-128.
- Lee, G. I. & Howe, G. A. (2003) The tomato mutant spr1 is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Journal*, 33, 567-576.
- Leipe, D. D., Koonin, E. V. & Aravind, L. (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: Multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*, 343, 1-28.
- Leroy, T., Henry, A. M., Royer, M., Altosaar, I., Frutos, R., Duris, D. & Philippe, R. (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, 19, 382-389.
- Leroy, T., Henry, A. M., Royer, M., Altosaar, I., Frutos, R., Duris, D. & Philippe, R. (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, 19, 382-389.

- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., 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.
- Lin, C., Mueller, L., McCarthy, J., Crouzillat, D., Pétiard, V. & Tanksley, S. (2005) Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor. Appl. Genet.*, 5, 1-17.
- Lindbo, J. A., Silvarosales, L., Proebsting, W. M. & Dougherty, W. G. (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants - Implications for Regulation of Gene-Expression and Virus-Resistance. *Plant Cell*, 5, 1749-1759.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., Llorente, F., Molina, A., Parker, J., Somerville, S. & Schulze-Lefert, P. (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 310, 1180-1183.
- Loake, G. & Grant, M. (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466-472.
- Lohar, D. P., Schaff, J. E., Laskey, J. G., Kieber, J. J., Bilyeu, K. D. & Bird, D. M. (2004) Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant Journal*, 38, 203-214.
- Lorang, J. M., Sweat, T. A. & Wolpert, T. J. (2007) Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 14861-14866.
- Lordello, A. I. L. & Lordello, R. R. A. (2001) Nematóides encontrados em cafezais do Estado de São Paulo. XXIII Congresso Brasileiro de Nematologia. Marília, SBN/FAEF.
- Lordello, L. G. E. & Mello Filho, A. D. T. (1970) Mais um nematóide ataca o cafeeiro. *Revista de Agricultura*.
- Lordello, L. G. E. (1984) Nematóides das Plantas Cultivadas, Nobel, São Paulo.
- Lordello, R. R. A. & Lordello, A. I. L. (1987) Avaliação da resistência de cafeeiros às raças de *Meloidogyne incognita*. *Bragantia*, 49, 59-64.

- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J. & Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15, 165-178.
- Lukasik, E. & Takken, F. L. W. (2009) STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, 12, 427-36.
- McCarthy, A.A., Biget, L., Lin, C.W., Petiard, V., Tanksley, S.D., McCarthy, J.G. (2007) Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the XMT and DXMT N-methyltransferases from *Coffea canephora* (robusta). *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 63, 304-307.
- Macnab, R. M. (1992) Genetics and Biogenesis of Bacterial Flagella. *Annu. Rev. Genet.*, 26, 131-158.
- Maghuly, F., Khan, M., Fernandez, E., Druart, P., Watillon, B. & Laimer, M. (2008) Stress regulated expression of the GUS-marker gene (*uidA*) under the control of plant calmodulin and viral 35S promoters in a model fruit tree rootstock: *Prunus incisa* × *serrula*. *J. Biotechnol.*, 135, 105-116.
- Maghuly, F., Machado, A., Leopold, S., Khan, M., Katinger, H. & Laimer, M. (2007) Long-term stability of marker gene expression in *Prunus subhirtella*: A model fruit tree species. *J. Biotechnol.*, 127, 310-321.
- Mahé, L., Varzea, V. M. P., Le Pierres, D., Combes, M.-C. & Lashermes, P. (2007) A new source of resistance against coffee leaf rust from New-Caledonian natural interspecific hybrids between *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Plant Breeding*, 126, 638-641
- Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrillange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., Morant, M., Noirot, M., Hamon, S., De Kochko, A., Werck-Reichhart, D. & Campa, C. (2007) Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.*, 64, 145-159.
- Maheswaran, G., Pridmore, L., Franz, P. & Anderson, M. (2007) A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Rep.*, 26, 773-782.
- Mahmood Ur, R., Ali, I., Husnain, T. & Riazuddin, S. (2008) RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. *Biotechnol. Adv.*, 26, 202-209.

- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J. & Cameron, R. K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419, 399-403.
- Mansfield, J., Bennett, M., Bestwick, C. & Woods-Tör, A. (1997) Phenotypic expression of gene-for-gene interactions involving fungal and bacterial pathogens: variation from recognition to response. In: Crute, I. R., Holub, E. B. & Burdon, J. J. (Eds.), *The Gene-for-Gene Relationship in Plant-Parasite Interactions*. CAB International, Wallingford, UK/ New York, 265–291.
- Mao, Y. B., Xue, X. Y. & Chen, X. Y. (2009) Are small RNAs a big help to plants? *Sci. China Ser. C-Life Sci.*, 52, 212-223.
- Marraccini, P., A. Deshayes, et al. (1999). Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37(4), 273-282.
- Marraccini, P., C. Courjault, et al. (2003). Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41(1), 17-25.
- Martinez De Ilarduya, O., Moore, A. & Kaloshian, I. (2001) The tomato Rme1 locus is required for Mi-1-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid. *Plant* 27, 417-425.
- Martinez De Ilarduya, O., Nombela, G., Hwang, C.-F., Williamson, V. M., Muniz, M. & Kaloshian, I. (2004) Rme1 is necessary for Mi-1-mediated resistance and acts early in the resistance pathway. *Mol Plant Microbe Interact*, 17, 55-61.
- Maurin, O., Davis, A. P., Chester, M., Mvungi, E. F., Jaufeerally-Fakim, Y. & Fay, M. F. (2007) Towards a phylogeny for *Coffea* (Rubiaceae): identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany*, 100, 1565–1583.
- May, M. J., Hammondkosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiology*, 110, 1367-1379.
- Mchale, L., Tan, X. P., Koehl, P. & Michelmore, R. W. (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7.

- Meksem, K., Pantazopoulos, P., Njiti, V. N., Hyten, L. D., Arelli, P. R. & Lightfoot, D. A. (2001) 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. *Theor. Appl. Genet.*, 103, 710-717.
- Melakeberhan, H. & Ferris, H. (1988) Growth and energy demand of *Meloidogyne incognita* on susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *Journal of Nematology*, 20, 545-554.
- Melillo, M. T., 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.
- Mendes, A. J. T. (1961) Speed of pollen tube penetration in Coffee Arabica. *Bragantia* 20, 495 - 502.
- Meyers, B. C., Kaushik, S. & Nandety, R. S. (2005) Evolving disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 129-134.
- Michelmore, R. W. & Meyers, B. C. (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, 8, 1113-1130.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. & Williamson, V. M. (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. *Plant Cell*, 10, 1307-19.
- Mitchum, M. G., Sukno, S., Wang, X. H., Shani, Z., Tsabary, G., Shoseyov, O. & Davis, E. L. (2004) The promoter of the Arabidopsis thaliana Cell endo-1,4-beta glucanase gene is differentially expressed in plant feeding cells induced by root-knot and cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 5, 175-181.
- Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., Van Camp, W., Willekens, H., Inze, D. & Ellis, B. E. (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 14165-14170.
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Peragine, A., Endres, M. W., Li, J., Chen, X., Poethig, R. S., Bowman, L. H. & Vance, V. (2008) DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS One*, 3, e1755.

- Moncada, P. & Mccouch, S. (2004) Simple sequence repeat diversity in diploid and tetraploid *Coffea* species. *Genome*, 47, 501-509.
- Mondego, J. M. C., Guerreiro-Filho, O., Bengtson, M. H., Drummond, R. D., Felix, J. D., Duarte, M. P., Ramiro, D., Maluf, M. P., Sogayar, M. C. & Menossi, M. (2005) Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. *Plant Sci.*, 169, 351-360.
- Montillet, J. L., Agnel, J. P., Ponchet, M., Vaillau, F., Roby, D. & Triantaphylides, C. (2002) Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 633-639.
- Montillet, J. L., Cacas, J. L., Garnier, L., Montane, M. H., Douki, T., Bessoule, J. J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J. P., Vial, A. & Triantaphylides, C. (2004) The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. *Plant Journal*, 40, 439-451.
- Montillet, J. L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van De Cotte, B., Agnel, J. P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. & Triantaphylides, C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 138, 1516-1526.
- Morais, M. V., Lorderello, L. G. E., Reis, A. J., Thomaziello, R. A., Lorderello, A. I. L. & Gonçalves, W. (1977) Ensaio de rotação de culturas para reaproveitamento, com cafeeiro de terra contaminadas por *Meloidogyne exigua*. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, 2, 257-265.
- Mur, L. A. J., Kenton, P. & Draper, J. (2005) In planta measurements of oxidative bursts elicited by avirulent and virulent bacterial pathogens suggests that H₂O₂ is insufficient to elicit cell death in tobacco. *Plant Cell and Environment*, 28, 548-561.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. & Prats, E. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59, 501-520.
- Mur, L., Kenton, P., Harren, F., Laarhoven, L. & Smith, A. (2007) NO provides mainly avr-dependent inputs into cell death mechanisms associated with the hypersensitive response in tobacco. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 146, DOI 10.1016/j.cbpa.2007.01.644/4.

- Muskett, P. & Parker, J. (2003) Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signalling. *Microbes and Infection*, 5, 969-976.
- Nandi, B., Kundu, K., Banerjee, N. & Babu, S. P. S. (2003) Salicylic acid-induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Nematology*, 5, 747-752.
- Narasimhaswamy, R. L. (1968) Report on visit to coffee areas in Ethiopia, 1964-65. In: Ethiopia, F. C. M. T. (Ed.), FAO.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. & Jones, J. D. G. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312, 436-439.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y. & Voinnet, O. (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 321, 964-967.
- 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. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, 1077-1084.
- Noe, J. (2004) Plant-parasitic nematodes. In: Trigiano Rn, W. M., Windham As (Ed.), *Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Raton, 413.
- Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M. C. & 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.
- Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M. & Sano, H. (2004) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol*, 54, 931-941.
- Osório, N. (2005) Comunicação da OIC à Cúpula do G-8 Gleneagles. Escócia, 6-8 julho 2005. <http://www.ico.org/documents/ed1959p.pdf>.
- Paal, J., Henselewski, H., Muth, J., Meksem, K., Menendez, C. M., 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. *Plant Journal*, 38, 285-297.
- Padilla, I., Golis, A., Gentile, A., Damiano, C. & Scorza, R. (2006) Evaluation of transformation in peach *Prunus persica* explants using green fluorescent protein

- (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 84, 309-314.
- Padmanabhan, M., Cournoyer, P. & Dinesh-Kumar, S. P. (2009) The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular Microbiology*, 11, 191-198.
- Pan, Q., Wendel, J. & Fluhr, R. (2000) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.*, 50, 203-213.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. & Klessig, D. F. (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318, 113-116.
- Paulson, R. & Webster, J. (1972) Ultrastructure of hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Physiology Plant Pathology*, 2, 227-234.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., Alvarez, M. E. & Foyer, C. H. (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 1291-1303.
- Pearl, H. M., Nagai, C., Moore, P. H., Steiger, D. L., Osgood, R. V. & Ming, R. (2004) Construction of a genetic map for arabica coffee. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 829-835.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. & Djian-Caporalino, C. (2005) Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology*, 95, 158-165.
- Petitot, A. S., A. C. Lecouls, et al. (2008). Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomes* 4(3), 379-390.
- Pierson, E. S., Van Lammeren, A. A. M., Schel, J. H. N. & Starisky, G. (1983) *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 15, 208-216.
- Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Ton, J., Leon-Kloosterziel, K. M., Van Pelt, J. A., Keurentjes, J. J. B., Knoester, M. & Van Loon, L. C. (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis*: Involvement of jasmonate and ethylene. *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol 2, 291-296.

- Pinto, M. C., Tommasi, F. & De Gara, L. (2002) Changes in the Antioxidant Systems as Part of the Signaling Pathway Responsible for the Programmed Cell Death Activated by Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130, 698-708.
- Pozo, M. J. & Azcon-Aguilar, C. (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 393-398.
- Proite, K., Carneiro, R., Falcao, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P. & Bertioli, D. (2008) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57, 974-980.
- Proite, K., Carneiro, R., Falcao, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimaraes, P. & Bertioli, D. (2008) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, 57, 974-980.
- Qi, Y. H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Ling, J. Q., Li, D. B. & Tanaka, K. (2005) Identification and cloning of a submergence-induced gene OsGGT (glycogenin glucosyltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.) by suppression subtractive hybridization. *Planta*, 221, 437-445.
- Rairdan, G. & Moffett, P. (2007) Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. *Microbes and Infection*, 9, 677-686.
- Rance, I., Fournier, J. & Esquerre-Tugaye, M. T. (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6554-6559.
- Randig, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R. M. D. G. & Castagnone-Sereno, P. (2002) Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil as inferred from RAPD analysis and development of SCAR markers specific for the coffee damaging species *Genome Research*, 45, 862-870.
- Rena, A. B. & Maestri, M. (1986) Fisiologia do cafeeiro. In: Rena, A. B., Malavolta, E., Rocha, M. & Yamada, T. (Eds.), *Cultura do cafeeiro fatores que afetam a produtividade*. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, 16 – 17.

- Ribas, A. F., Kobayashi, A. K., Pereira, L. F. P. & Vieira, L. G. E. (2005) Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. *Biologia Plantarum*, 49, 493-497.
- Richter, T. E. & Ronald, P. C. (2000) The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol Biol*, 42, 195-204.
- Robatzek, S., Chinchilla, D. & Boller, T. (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes & Development*, 20, 537-542.
- Rodrigues, A., Abrantes, I. M. D., Melillo, M. T. & Bleve-Zacheo, T. (2000) Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M.megadora*. *Nematropica*, 30, 201-210.
- Rodrigues, C. J., Medeiros, E. F. & Lewis, B. G. (1975) Relationship between a Phytoalexin-Like Response in Coffee Leaves (*Coffea-Arabica* L) and Compatibility with *Hemileia-Vastatrix* Berk and Br. *Physiological Plant Pathology*, 6, 35-41.
- Rohde, A., Morreel, K., Ralph, J., Goeminne, G., Hostyn, V., De Rycke, R., Kushnir, S., Van Doorselaere, J., Joseleau, J. P., Vuylsteke, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., Messens, E. & Boerjan, W. (2004) Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on and carbohydrate metabolism. *Plant Cell*, 16, 2749-2771.
- Rosillo, A. G., Acuna, J. R., Gaitan, A. L. & De Pena, M. (2003) Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 74, 45-49.
- Rosso, M.-N., Dubrana, M. P., Cimbolini, N., Jaubert, S. & Abad, P. (2005) Application of RNA interference to root-knot nematode genes encoding esophageal gland proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, 615-20.
- Roupe Van Der Voort, J. N. A. M., Van Eck, H. J., Van Zandvoort, P. M., Overmars, H., Helder, J. & Bakker, J. (1999) Linkage analysis by genotyping of sibling populations: A genetic map for the potato cyst nematode constructed using a "pseudo-F2" mapping strategy. *Molecular and General Genetics*, 261, 1021-1031.
- Roze, E., Hanse, B., Mitreva, M., Vanholme, B., Bakker, J. & Smant, G. (2008) Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology*, 9, 1-10.

- Rusterucci, C., Espunya, M. C., Diaz, M., Chabannes, M. & Martinez, M. C. (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiology*, 143, 1282-1292.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. & Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. H. G., Chang, C. R., Medrano, L. J., Bleecker, A. B. & Meyerowitz, E. M. (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5812-5817.
- Salmona, J., Dussert, S., Descroix, F., De Kochko, A., Bertrand, B. & Joet, T. (2008) Deciphering transcriptional networks that govern *Coffea arabica* seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. *Plant Mol. Biol.*, 66, 105-124.
- Samson, N., Bausher, M. G., Lee, S. B., Jansen, R. K. & Daniell, H. (2007) The complete nucleotide sequence of the coffee (*Coffea arabica* L.) chloroplast genome: organization and implications for biotechnology and phylogenetic relationships amongst angiosperms. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 339-353.
- Sanchez, P., Zabala, M. D. & Grant, M. (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax Inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant Journal*, 21, 393-399.
- Sanz-Alferez, S., Mateos, B., Alvarado, R. & Sanchez, M. (2008) SAR induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 417-425.
- Saunders, J. R. & Burr, A. H. (1978) Pumping Mechanism of Nematode Esophagus. *Biophysical Journal*, 22, 349-372.
- Schaff, J. E., Nielsen, D. M., Smith, C. P., Scholl, E. H. & Bird, D. M. (2007) Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiology*, 144, 1079-1092.
- Sera, G. H., Sera, T., Ito, D. S., Mata, J. S., Doi, D. S., Azevedo, J. A. D. & Ribeiro Filho, C. (2007) Progenies de *Coffea arabica* cv IPR-100 resistentes ao nematóide *Meloidogyne paranaensis*. *Bragantia*, 66, 43-49.
- Shingles, J., Lilley, C. J., Atkinson, H. J. & Urwin, P. E. (2007) *Meloidogyne incognita*: molecular and biochemical characterisation of a cathepsin L cysteine proteinase

- and the effect on parasitism following RNAi. *Experimental Parasitology*, 115, 114-120.
- Sidhu, G. S. (1981) The genetics of plant-nematode parasitic systems. *The Botanical Review*, 47, 987-419.
- Sijmons, P. C. (1993) Plant-nematode interections. *Plant Mol Biol*, 23, 917-931.
- Silva, J. & Campos, V. P. (2008) Management of *Meloidogyne* spp. in Coffee Plantations. In: Souza, R. M. (Ed.), *Plant-Parasitic Nematodes of Coffee*. Springer Netherlands, Berlim, 149-164.
- Silvarolla, M. B., Gonçalves, W. & Lima, M. M. A. (1998) Resistência do cafeeiro a nematóides V - Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. *Nematologia Brasileira*, 22, 51-59.
- Silvarolla, M. B., Mazzafera, P. & De Lima, M. M. A. (2000) Caffeine content of Ethiopian *Coffea arabica* beans,. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 213-215.
- Smith, P. (1944) Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 44, 413-416.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q. M. & Ecker, J. R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12, 3703-3714.
- Sondahl, M. R. & Loh, W. H. T. (1988) Coffee biotechnology. In: Clarke, R. J. & Macrae, R. (Eds.), *Coffee*. Elsevier Applied Science Publishers, London, 235-261.
- Sondahl, M. R. & Sharp, W. R. (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. *L.Z. Pflanzenphysiol.*, 81, 395-408.
- Song, J. Q., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H. H., Austin-Phillips, S., Buell, C. R., Helgeson, J. P. & Jiang, J. M. (2003) Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9128-9133.
- Song, J. T., Koo, Y. J., Park, J. B., Seo, Y. J., Cho, Y. J., Seo, H. S. & Choi, Y. D. (2009) The expression patterns of AtBSMT1 and AtSAGT1 encoding a salicylic acid (SA) methyltransferase and a SA glucosyltransferase, respectively, in Arabidopsis plants with altered defense responses. *Molecules and Cells*, 28, 105-109.

- Souza, R. M. & Bressan-Smith, R. (2008) Coffee-associated *Meloidogyne* spp. - ecology and interactions with plants. In: Souza Ricardo, M. (Ed.), Plant-parasitic nematodes of coffee. Springer, Berlin, 123-147.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. (2005) Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II, Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Spiral, J., Leroy, T., Paillard, M. & Petiard, V. (1999) Transgenic Coffee (*Coffea* Species). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.), Transgenic Trees. Springer-Verlang, Berlin, 55-76.
- Stakman, E. C. (1915) Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* 4, 193-200.
- Starisky, G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta bot. Neerl.*, 19, 509-514.
- Stukenbrock, E. H. & McDonald, B. A. (2009) Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22, 371-380.
- Stukenbrock, E. H. & McDonald, B. A. (2009) Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 22, 371-380.
- Sweat, T. A., Lorang, J. M., Bakker, E. G. & Wolpert, T. J. (2008) Characterization of natural and induced variation in the LOV1 gene, a CC-NB-LRR gene conferring victorin sensitivity and disease susceptibility in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 21, 7-19.
- Tai, Y. S. (2008) Interactome of signaling networks in wheat: the protein-protein interaction between TaRAR1 and TaSGT1. *Mol. Biol. Rep.*, 35, 337-343.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K. & Shirasu, K. (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11777-11782.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y. & Martin, G. B. (1996) Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science*, 274, 2060-2063.

- Teixeira, J. B., Junqueira, C. S., Pereira, A. J. P. C., Mello, R. I. S., Silva, A. P. D. & Mundim, D. A. (2004) Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática, Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.
- Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. & Broekaert, W. F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15107-15111.
- Thorpe, M. R., Ferrieri, A. P., Herth, M. M. & Ferrieri, R. A. (2007) C-11-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta*, 226, 541-551.
- Torregrosa, L., Pradal, M., Souquet, J.-M., Rambert, M., Gunata, Z. & Tesniere, C. (2008) Manipulation of *VvAdh* to investigate its function in grape berry development. *Plant Sci.*, 174, 149-155.
- Torres, M. A., Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2002) *Arabidopsis* gp91(phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 517-522.
- Triantaphyllou, A. C. (1985) Gametogenesis and the Chromosomes of *Meloidogyne Nataliei* - Not Typical of Other Root-Knot Nematodes. *Journal of Nematology*, 17, 1-5.
- Trudgill, D. L. & Blok, V. C. (2001) Apomitic, Polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39 53-77.
- Trudgill, D. L. (1997) Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathology*, 46, 26-32.
- Trujillo, M., Troeger, M., Niks, R. E., Kogel, K. H. & Huckelhoven, R. (2004) Mechanistic and genetic overlap of barley host and non-host resistance to *Blumeria graminis*. *Molecular Plant Pathology*, 5, 389-396.
- Truman, W., Bennett, M. H., Kubigsteltig, 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 the United States of America*, 104, 1075-1080.
- Tuzun, S. & Bent, E. (1999) The role of hydrolytic enzymes in multigenic and microbially-induced resistance in plants. *Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores*, 95-115.
- Van Boxtel, J., Berthouly, M., Carasco, C., Dufour, M. & Eskes, A. (1995) Transient expression of beta-glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. *Plant Cell Rep.*, 14, 748-752.
- Van Der Biezen, E. A. & Jones, J. D. G. (1998) The NB-ARC domain: A novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, 8, R226-R227.
- Van Der Hoorn, R. A. L. & Kamoun, S. (2008) From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*, 20, 2009-2017.
- Van Der Vossen, E. A. G., Van Der Voort, J., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., Bakker, J., Stiekema, W. J. & Klein-Lankhorst, R. M. (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant Journal*, 23, 567-576.
- Van Der Vossen, H. A. M. (2001) Coffee breeding practices. In: Clarke, R. J. & Macrae, R. (Eds.), *Coffee – Recent Developments*. Blackwell Science, Oxford, 184—201.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. & Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Vazquez, F. (2006) Arabidopsis endogenous small RNAs: highways and byways. *Trends in Plant Science*, 11, 460-468.
- Vercauteren, I., Niebel, A., Van Montagu, M. & Gheysen, G. (2002) Arabidopsis thaliana mutants with an altered susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 67, 51-61.
- Vercauteren, I., Niebel, A., Van Montagu, M. & Gheysen, G. (2002) Arabidopsis thaliana mutants with an altered susceptibility to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent*, 67, 51-61.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. & Ryals, J. (1994) Salicylic acid is not the translocated signal

responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction *Plant Cell*, 6, 959-965.

Vieira, L. G. E., Andrade, A. C., Colombo, C. A., Moraes, A. A. H., Metha, A., Oliveira, A. C., Labate, C. A., Marino, C. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Monte, D. C., Giglioti, E., Kimura, E. T., Romano, E., Kuramae, E. E., Lemos, E. G. M., Almeida, E. R. P., Jorge, E. C., Barros, E. V. S. A., Da Silva, F. R., Vinecky, F., Sawazaki, H. E., Dorry, H. F. A., Carrer, H., Abreu, I. N., Batista, J. A. N., Teixeira, J. B., Kitajima, J. P., Xavier, K. G., Lima, L. M., Camargo, L. E. A., Pereira, L. F. P., Coutinho, L. L., Lemos, M. V. F., Romano, M. R., Machado, M. A., Costa, M. M. C., Grossi De Sá, M. F., Goldman, M. H. S., Ferro, M. I. T., Tinoco, M. L. P., Oliveira, M. C., Sluys, M.-A. V., Shimizu, M. S., Maluf, M. P., Eira, M. T. S., Guerreiro Filho, O., Arruda, P., Mazzafera, P., Mariani, P. D. S. C., Oliveira, R. L., Harakava, R., Balbao, S. F., Tsai, S. M., Mauro, S. M. Z., Santos, S. N., Siqueira, W. J., Costa, G. G. L., Formighieri, E. F., Carazzolle, M. F. & Pereira, G. A. G. (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18, 95-108.

Vieira, L. G. E., Andrade, A. C., Colombo, C. A., Moraes, A. A. H., Metha, A., Oliveira, A. C., Labate, C. A., Marino, C. L., Monteiro-Vitorello, C. B., Monte, D. C., Giglioti, E., Kimura, E. T., Romano, E., Kuramae, E. E., Lemos, E. G. M., Almeida, E. R. P., Jorge, E. C., Barros, E. V. S. A., Da Silva, F. R., Vinecky, F., Sawazaki, H. E., Dorry, H. F. A., Carrer, H., Abreu, I. N., Batista, J. A. N., Teixeira, J. B., Kitajima, J. P., Xavier, K. G., Lima, L. M., Camargo, L. E. A., Pereira, L. F. P., Coutinho, L. L., Lemos, M. V. F., Romano, M. R., Machado, M. A., Costa, M. M. C., Grossi De Sá, M. F., Goldman, M. H. S., Ferro, M. I. T., Tinoco, M. L. P., Oliveira, M. C., Sluys, M.-A. V., Shimizu, M. S., Maluf, M. P., Eira, M. T. S., Guerreiro Filho, O., Arruda, P., Mazzafera, P., Mariani, P. D. S. C., Oliveira, R. L., Harakava, R., Balbao, S. F., Tsai, S. M., Mauro, S. M. Z., Santos, S. N., Siqueira, W. J., Costa, G. G. L., Formighieri, E. F., Carazzolle, M. F. & Pereira, G. A. G. (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18, 95-108.

Viniegra-González, G. (2000) Biotechnology and the future of coffee production. In: Al, T. S. E. (Ed.), *Coffee biotechnology and quality*. Kluwer academic publishers, Netherlands, 1-16.

- Vlot, A. C., Klessig, D. F. & Park, S. W. (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 436-442.
- Vogt, T. & Jones, P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science*, 5, 380-386.
- Voinnet, O. (2008) Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 464-470.
- Voltan, R. B. Q., Cabral, L. P. & Paradela Filho, O. (2002) Avaliação preliminar do efeito do *Colletotrichum* spp. na estrutura de plantas de café. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Caxambu, MG, MAPA/Procafé.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J. & Zabeau, M. (1998) The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* 16, 1365 - 1369.
- Waetzig, G. H., Sobczak, M. & Grundler, F. M. W. (1999) Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*.
- Wang, C. L., Ulloa, M. & Roberts, P. A. (2008) A transgressive segregation factor (RKN2) in *Gossypium barbadense* for nematode resistance clusters with gene *rkn1* in *G-hirsutum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 41-52.
- Wang, Z. H., Potter, R. H. & Jones, M. G. K. (2003) Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Pathology*, 4, 361-371.
- Ward, H. M. (1902) On the relations between host and parasite in bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikks.). *Annals of Botany* 16, 233-315.
- Wasson, A. P., Ramsay, K., Jones, M. G. K. & Mathesius, U. (2009) Differing requirements for flavonoids during the formation of lateral roots, nodules and root knot nematode galls in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 183, 167-179.
- Watanabe, N. & Lam, E. (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Molecular Plant Pathology*, 5, 65-70.

- Webber, H. J. & Orton, W. A. (1902) Some diseases of cowpea. II. A cowpea resistant to root knot (*Heterodera radicumicola*). US Department of Agriculture Bureau of Plant Industry, 17, 23-28.
- Wiermer, M., Feys, B. J. & Parker, J. E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 383-389.
- Williamson, V. M. & Hussey, R. S. (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8, 1735-1745.
- Williamson, V. M. & Kumar, A. (2006) Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics*, 22, 396-403
- Williamson, V. M. (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 327-331.
- Williamson, V. M. (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 327-331.
- Wolpert, T. J., Dunkle, L. D. & Ciuffetti, L. M. (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annual Review of Phytopathology*, 40, 251-+.
- Xia, Y. J., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z. J., Patel, K., Dixon, R. A. & Lamb, C. (2004) An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *Embo J.*, 23, 980-988.
- Xing, W., Zou, Y., Liu, Q., Liu, J. N., Luo, X., Huang, Q. Q., Chen, S., Zhu, L. H., Bi, R. C., Hao, Q., Wu, J. W., Zhou, J. M. & Chai, J. J. (2007) The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature*, 449, 243-U11.
- Xu, H. X. & Heath, M. C. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*, 10, 585-597.
- Yaghoobi, J., Yates, J. L. & Williamson, V. M. (2005) Fine mapping of the nematode resistance gene Mi-3 in *Solanum peruvianum* and construction of a *S-lycopersicum* DNA contig spanning the locus. *Molecular Genetics and Genomics*, 274, 60-69.
- Yasuda, T., Fujii, Y. & Yamaguchi, T. (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, 26, 595-597.

- Yoon, J., Chung, W. I. & Choi, D. (2009) NbHB1, *Nicotiana benthamiana* homeobox 1, is a jasmonic acid-dependent positive regulator of pathogen-induced plant cell death. *New Phytologist*, 184, 71-84.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J. D. G. & Doke, N. (2003) *Nicotiana benthamiana* gp91(phox) homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 15, 706-718.
- Zacheo, G. & Blevezacheo, 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. & Blevezacheo, T. (1993) Characterization of Anionic Peroxidases in Tomato Isolines Infected by *Meloidogyne-Incognita*. *Journal of Nematology*, 25, 249-256.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J. F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M. & Van Breusegem, F. (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology*, 141, 404-411.
- Zambolin, L., Vale, F. X. R. & Zambolin, E. M. (2003) Produção integrada do cafeeiro: manejo de doenças. In: Zambolin, L. (Ed.), *Produção integrada de café*. UFV, Viçosa, 443-508.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. & Lamb, C. (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiology*, 136, 2875-2886.
- Zeier, J., Pink, B., Mueller, M. J. & Berger, S. (2004) Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*, 219, 673-683.
- Zhang, X., Dai, Y., Xiong, Y., Defraia, C., Li, J., Dong, X. & Mou, Z. (2007) Overexpression of Arabidopsis MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant Journal*, 52, 1066-1079.
- Zhou, J. M., Loh, Y. T., Bressan, R. A. & Martin, G. B. (1995) The Tomato Gene Pti1 Encodes a Serine/Threonine Kinase That Is Phosphorylated by Pto and Is Involved in the Hypersensitive Response. *Cell*, 83, 925-935.

- Zhou, J. M., Tang, X. Y. & Martin, G. B. (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *Embo J.*, 16, 3207-3218.
- Zipfel, C. & Felix, G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 353-360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T. & Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125, 749-760.

CURRICULUM VITAE

Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire

possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília (1991) e mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília (1995). Atualmente é Pesquisadora II da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e cursa doutorado nas universidades UFRGS e Montpellier II - França. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: biologia molecular vegetal, genômica funcional e marcadores moleculares.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 30/10/2009
Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/2175569608934287>

Dados pessoais

Nome Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire

Nome em citações bibliográficas ALBUQUERQUE, E.V.S.

Sexo Feminino

Endereço profissional Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Recursos Genéticos e Biotecnologia.
Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final) Norte
Asa
70970-900 - BRASÍLIA, DF - Brasil
Telefone: (61) 34484670 Fax: (61) 33403658
URL da Homepage: <http://www.cenargen.embrapa.br>

Formação acadêmica/Titulação

- 2005 Doutorado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6) .
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
com período sanduíche em Université Montpellier 2(Orientador:Diana Fernandez).
Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE CAFEIEIRO PARA ESTUDO DE RESISTÊNCIA A FITONEMATÓIDES., *Orientador:* Maria Fatima Grossi-de-Sá.
Bolsista do(a): Embrapa, .
Palavras-chave: Meloydogine; genômica; Coffea.
- 1992 - Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (Conceito CAPES 6) .
1995 Universidade de Brasília, UNB, Brasil.
Título: Construção de um vetor de clonagem molecular em Escherichia coli com múltiplas funções utilizando o gene da alfa-amilase de Bacillus subtilis como marcador genético., *Ano de Obtenção:* 1995.
Orientador: Spartaco Astolfi Filho.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,

Palavras-chave: vetor; clonagem; gene marcador; seleção direta; seleção positiva.

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Biologia Molecular.

- 1991 - Especialização em Biologia Molecular
 1992 Universidade de Brasília, UNB, Brasil.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .
- 1987 - Graduação em Ciências Biológicas
 1991 Universidade de Brasília, UNB, Brasil.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .

Atuação profissional

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, Brasil.

Vínculo institucional

- 1998 - Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Pesquisador II, Carga horária:
 Atual 40

Atividades

- 2005 - Atividades de Participação em Projeto, Recursos Genéticos e Biotecnologia, .
 Atual
- Projetos de pesquisa
Estratégias moleculares aplicadas para o melhoramento genético do cafeeiro
 visando resistência a fitonematóides

- 11/1998 - Pesquisa e desenvolvimento , Centro Nacional de Pesquisa de Recursos
 Atual Genéticos e Biotecnologia, .
- Linhas de pesquisa
Transformação genética de cafeeiro
Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para Cafeeiro

Linhas de Pesquisa

1. Transformação genética de cafeeiro
2. Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para Cafeeiro

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Genética / *Subárea:* Genética Vegetal.

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Biologia Geral.
Setores de atividade: Produção vegetal.

Projetos de Pesquisa

Estratégias moleculares aplicadas para o melhoramento genético do cafeeiro visando

resistência a fitonematóides

Situação: Desativado; *Natureza:* Outra.
Integrantes: Érika Valéria Saliba Albuquerque Freire - Coordenador.

Revisor de periódico

2006 - Atual Periódico: Magistra

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Bioquímica / *Subárea:* Biologia Molecular.
2. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia / *Subárea:* Biologia e Fisiologia dos Microorganismos.
3. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Genética / *Subárea:* Genética Molecular e de Microorganismos.
4. *Grande área:* Ciências Biológicas / *Área:* Genética / *Subárea:* Genética Vegetal.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.

Francês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ✨ [doi](#) > ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; Barbosa, A. E. A. D. ; COSTA, P. M. ; TEIXAEIRA, J. B. ; VIANNA, G. R. ; CABRAL, G. B. ; FERNANDEZ, D. ; Grossi de Sa, M. F. . Albuquerque, E.; Cunha, W.; Barbosa, A.; Costa, P.; Teixeira, J.; Vianna, G.; Cabral, G.; Fernandez, D.; Grossi-de-Sa, M. Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment.. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, v. 45, p. 532, 2009.
2. ✨ VIEIRA, L. G. E. ; ANDRADE, Alan Carvalho ; COLOMBO, Carlos A ; MORAES, Ana Heloneida de Araújo ; MEHTA, Ângela ; OLIVEIRA, Angélica Carvalho de ; LABATE, Carlos Alberto ; MARINO, Celso Luis ; MONTEIRO-VITORELLO, Cláudia de Barros ; MONTE, Damares de Castro ; GIGLIOTI, Éder ; KIMURA, Edna Teruko ; ALBUQUERQUE, ERIKA V. S. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; PEREIRA, G. A. G. . Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 18, p. 95-108, 2006.
3. ✨ CRUZ, A. R. R. ; MACHADO, F. R. B. ; JUNQUEIRA, C. S. ; CABRAL, G. B. ; TEIXAEIRA, J. B. ; KOBAYASHI, A. K. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Metodologia para obtenção de plantas transformadas de *Coffea canephora* por co-cultivo de calos embriogênicos com *Agrobacterium tumefaciens*.. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa, v. 58, 2004.

4. CUNHA, W. G. ; MACHADO, F. R. B. ; VIANNA, G. R. ; TEIXAEIRA, J. B. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Obtenção de plantas de *Coffea arabica* geneticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogênicos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Brasília, v. 73, p. 1-15, 2004.
5. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; MANFIO, G. P. ; MALDONADO, L. A. ; BATAUS, L. A. M. ; GOODFELLOW, M. ; KIM, S. B. ; MAITAN, V. R. . *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil.. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology., Reading, UK, v. 53, n. 1, p. 29-33, 2003.
6. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; SANTOS, M. O. ; TINOCO, M. L. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; ARAGAO, F. J. L. . REPETITIVE SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CACAO AND OPTIMIZATION OF GENE EXPRESSION BY PARTICLE BOMBARDMENT. Journal of Plant Biotechnology, v. 4, n. 2, p. 71-76, 2002.
7. ✨ ALBUQUERQUE, E.V.S. ; VALÊNCIA, F. F. ; BATAUS, L. A. M. ; MARANHÃO, A. Q. ; ASTOLFI FILHO, S. . A novel cloning system for direct screening using a suicidal strategy.. Gene (Amsterdam), v. 179, p. 287-289, 1996.

Capítulos de livros publicados

1. Campos M. A. ; SILVA, F. B. ; SILVA, M. S. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; Amaral A. M. ; Teixeira C. C. ; MEHTA, A. ; Grossi de Sa, M. F. . Identification of the Putative Class 3 R Genes in *Coffea arabica* from CafEST Database. Lecture Notes in Computer Science. : Springer Berlin / Heidelberg, 2007, v. 4643, p. 171-175.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. MACHADO, F. R. B. ; BERCOT, M. A. ; DAYLER, C. ; PALACIO, T. C. ; VIANNA, G. R. ; PEREIRA, R. A. ; SA, M. F. G. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Obtenção de plantas *Coffea arabica* geneticamente modificadas com gene para inibição da broca. In: I Workshop de Interação Planta-Praga, 2004, Brasília. Anais do I Workshop de Interação Planta-Praga, 2004.
2. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; TEIXAEIRA, J. B. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Expressão do gene *gus* em embriões zigóticos e calos embriogênicos de *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2001, Vitória. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília : Embrapa Café, 2001.
3. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; ARAUJO, G. B. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Transformação genética de *Coffea arabica* através de bombardeamento. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2000, Poços de Caldas. I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília : Embrapa Café, 2000. v. 1.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; SILVA, M. S. ; Teixeira C. C. ; Campos M. A. ; Grossi de Sa, M. F. ; da SILVA, F. R. . Análise in silico dos ESTs isolados de *Coffea arabica* infestada com *Meloidogyne paranaensis*. In: 5º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. 5º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007.
2. SILVA, M. S. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; Teixeira C. C. ; Campos M. A. ; MEHTA, A. ; MARTINS, N. F. ; Grossi de Sa, M. F. . Identificação de prováveis genes R classe

1 e 2 de *Coffea arabica* no Banco Brasileiro Genoma Funcional de Café (CafEST).. In: 5º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007, Águas de Lindóia. 5º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2007.

Resumos publicados em anais de congressos

1. BARROS, E. V. S. A. ; Fernandes D. G. ; CABRAL, G. B. ; Grossi de Sa, M. F. . Analysis of the expression pattern of gene *gus* in *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho genetically transformed by biobalistic.. In: I Simpósio Nacional de Genética Molecular de Plantas, 2007, Natal. I Simpósio Nacional de Genética Molecular de Plantas, 2007.
2. BARROS, E. V. S. A. ; COSTA, P. M. ; GOMES, A. C. M.M. ; FALCAO, R. ; RIBEIRO, V. S. ; EIRA, M. T. S. ; PEREIRA, A. A. ; NICOLE, M. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Grossi de Sa, M. F. . Estudo histopatológico da reação de hipersensibilidade na interação *Coffea arabica* x *Meloidogyne incognita*.. In: 27º Congresso Brasileiro de Nematologia, 2007, Goiânia. 27º Congresso Brasileiro de Nematologia, 2007.
3. BARROS, E. V. S. A. ; Teixeira C. C. ; Grossi de Sa, M. F. . The Use of Resistance Genes Analogues (RGAs) as molecular markers in *Coffea arabica*.. In: I Simpósio Nacional de Genética Molecular de Plantas,, 2007, Natal. I Simpósio Nacional de Genética Molecular de Plantas,, 2007.
4. ✨ BARROS, E. V. S. A. ; COSTA, P. M. ; GOMES, A. C. M.M. ; FALCAO, R. ; EIRA, M. T. S. ; PEREIRA, A. A. ; NICOLE, M. ; FERNANDEZ, D. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Grossi de Sa, M. F. . HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MELOIDOGYNE INCOGNITA INFECTION IN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE *COFFEA ARABICA* GENOTYPES.. In: XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, Sorrento. XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007. p. 333-333.
5. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; COSTA, P. M. ; GOMES, A. C. M.M. ; FALCAO, R. ; RIBEIRO, V. S. ; EIRA, M. T. S. ; PEREIRA, A. A. ; NICOLE, M. ; FERNANDEZ, D. ; Grossi de Sa, M. F. ; CARNEIRO, R. M. D. G. . Caracterização dos efeitos histológicos da infecção de *Meloidogyne incognita* em genótipos suscetíveis e resistentes de *Coffea arabica*. In: Talento Estudantil, 2006, Brasília. Anais do XI Encontro do Talento Estudantil, 2006.
6. COSTA, P. M. ; MARTINS, N. F. ; MEHTA, A. ; PAES, N. S. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; Grossi de Sa, M. F. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA SUBTRATIVA DE cDNAs DE PLANTAS *COFFEA ARABICA* INOCULADA E NÃO INOCULADA COM O NEMATÓIDE DA GALHA MELOIDOGYNE INCOGNITA.. In: XI Encontro do Talento Estudantil, 2006, Brasília. Anais do XI Encontro do Talento Estudantil, 2006.
7. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; LECOULS, A. C. ; PEF Oliveira ; da SILVA, F. R. ; CARNEIRO, R. M. D. G. ; FERNANDEZ, D. ; SA, M. F. G. . Construção e análise de uma biblioteca subtrativa de cDNAs de plantas de *Coffea arabica* inoculada e não inoculada com o nematóide da galha *Meloidogyne paranaensis*. In: 51o. Congresso Nacional de Genética, 2005, Águas de Lindóia. 51o. Congresso Nacional de Genética, 2005.
8. PALACIO, T. C. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; SA, M. F. G. ; TEIXAEIRA, J. B. . Indução de Calos Embriogênicos de Explantes Foliares de *Coffea canephora* Submetidos a Diferentes Tratamentos com o Hormônio 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). In: X Talento Estudantil, 2005, Brasília. X Talento Estudantil - anais, 2005.

9. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; MACHADO, F. R. B. ; BARBOSA, M. F. F. ; TEIXAEIRA, J. B. ; VIANNA, G. R. . *Coffea arabica* plants genetically modified through bombardment. In: REDBIO 2004, 2004, Boca Chica. V Latin American and Caribbean Meeting on Agricultural Biotechnology, 2004. p. 195.
10. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; MACHADO, F. R. B. ; CRUZ, A. R. R. ; PAIXAO, A. L. D. ; BARBOSA, M. F. F. ; CABRAL, G. B. . Obtention of *Coffea canephora* Transformed Plants by Co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. In: REDBIO 2004, 2004, Boca Chica. V Latin American and Caribbean Meeting on Agricultural Biotechnology, 2004. p. 197.
11. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; da SILVA, F. R. ; FRAGOSO, R. R. ; BERTIOLI, D. ; SA, M. F. G. . Resistance Gene Homologues in *Coffea canephora*. In: REDBIO 2004, 2004, Boca Chica. V Latin American and Caribbean Meeting on Agricultural Biotechnology, 2004. p. 196.
12. MACHADO, F. R. B. ; BERCOT, M. A. ; PALACIO, T. C. ; VIANNA, G. R. ; SA, M. F. G. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Obtenção de plantas *Coffea arabica* geneticamente modificadas através do bombardeamento de calos embriogênicos.. In: 50o. Congresso Brasileiro de Genética, 2004, Florianópolis. 50o. Congresso Brasileiro de Genética, 2004. p. 1393.
13. MACHADO, F. R. B. ; BERCOT, M. A. ; PALACIO, T. C. ; VIANNA, G. R. ; SA, M. F. G. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Obtenção de plantas *Coffea arabica* geneticamente modificadas através do bombardeamento de calos embriogênicos.. In: IX Encontro do Talento Estudantil, 2004, Brasília. Anais do IX Encontro do Talento Estudantil, 2004.
14. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; FRAGOSO, R. R. ; MACHADO, F. R. B. ; BERTIOLI, D. ; SA, M. F. G. . Identificação de sequências NBS-RGA de *Coffea canephora*. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2003, Porto Seguro. III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília : Embrapa Café, 2003. p. 98-98.
15. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. . Transformação genética de *Coffea arabica* através do bombardeamento de calos embriogênicos e seleção em canamicina. In: III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2003, Porto Seguro. III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Brasília : Embrapa Café, 2003. p. 106-106.
16. BARBOSA, M. F. F. ; VIANNA, G. R. ; MACHADO, F. R. B. ; PAIXAO, A. L. D. ; SOARES, F. Q. ; SA, M. F. G. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Construção de vetores para bombardeamento de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. 49o. Congresso Nacional de Genética. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p. 603-603.
17. PAIXAO, A. L. D. ; CRUZ, A. R. R. ; MACHADO, F. R. B. ; BARBOSA, M. F. F. ; SOARES, F. Q. ; CABRAL, G. B. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. . Obtenção de embriões de *Coffea canephora* transformados através do co-cultivo com *Agrobacterium*. In: 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003. p. 602-602.
18. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; MACHADO, F. R. B. ; BARBOSA, M. F. F. ; SOARES, F. Q. ; PAIXAO, A. L. D. ; VIANNA, G. R. . Transformação Genética de *Coffea arabica* através do bombardeamento de calos embriogênicos e seleção em canamicina. In: 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. 49o. Congresso Nacional de Genética. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p. 587-587.

19. MACHADO, F. R. B. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; FRAGOSO, R. R. ; BARBOSA, M. F. F. ; BERTIOLI, D. ; SA, M. F. G. . Identificação e análise de sequências NBS-LRR de *Coffea canephora*. In: 49o. Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. 49o. Congresso Nacional de Genética. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p. 571-571.
20. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CRUZ, A. R. R. ; GUIMARAES, C. R. S. ; TEIXAEIRA, J. B. . Avaliação do efeito dos antibióticos Timentin e Cefotaxima em explantes foliares de *Coffea arabica* sp. e *C. canephora* sp.. In: XLVIII Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia, Brasil. A GENÉTICA NA INCLUSÃO SOCIAL. RIBEIRÃO PRETO : SBG, 2002.
21. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. . Transformação genética de calos embriogênicos de *Coffea arabica* via biobalística e seleção em canamicina. In: XLVIII Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia, Brasil. A GENÉTICA NA INCLUSÃO SOCIAL. RIBEIRÃO PRETO : SBG, 2002.
22. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Transient and stable expression of gus gene in the meristematic region of *C. arabica* embryos at different stages of in vitro cultivation. In: IV Encontro Latino Americano de Biotecnologia Vegetal, 2001, Goiânia. REDBIO 2001. Goiânia : CEGRAF, 2001. v. 1.
23. SANTOS, M. O. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Increase in the genetic transformation efficiency of cocoa (*Theobroma cacao* L.) calli after osmotic treatment. In: IV Encontro Latino -Americano de Biotecnologia Vegetal, 2001, Goiânia. REDBIO 2001. Goiânia : CEGRAF, 2001. v. 1.
24. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Expressão do gene gus em embriões zigóticos e calos embriogênicos de *Coffea arabica* e *C. canephora*. In: VI Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001, Brasília. VI Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.
25. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; SANTOS, M. O. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; TINOCO, M. L. . Effect of 2,4-D on repetitive somatic embryogenesis in cacao (*Theobroma cacao* L.). In: Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia. A Genética no século XXI Desafios. Ribeirão Preto : SBG, 2001.
26. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; CUNHA, W. G. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; CID, L. P. B. ; CRUZ, A. R. R. . Particle bombardment-mediated transient transformation of *Coffea arabica* callus induced by picloram. In: 47o. Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia. A genética no século XXI Desafios. Ribeirão Preto : SBG, 2001.
27. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; SANTOS, M. O. ; MARBACH, P. A. S. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Transient and stable expression of gus in *Theobroma cacao* calli.. In: 46o. Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia. Genetics and Molecular Biology. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2000. v. 23. p. 406-406.
28. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; BRASILEIRO, A. C. M. ; ARAGAO, F. J. L. . Morphological study of *Coffea arabica* meristem tip for transformation purposes.. In: 46o. Congresso Nacional de Genética, 2000, Águas de Lindóia. Genetics and Molecular Biology. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2000. v. 23. p. 428-428.
29. CUNHA, W. G. ; ALBUQUERQUE, E.V.S. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Expressão

- transiente do gene *gus* em meristemas apicais de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. In: V Talento Estudantil, 2000, Brasília. V Talento Estudantil, 2000. p. 31-31.
30. ALBUQUERQUE, E.V.S. ; ARAUJO, L. F.C. ; BRASILEIRO, A. C. M. . Preliminary assays of coffee transformation through biobalistic process. In: 45o. congresso nacional de genética, 1999, Gramado - RS. Genetics and Molecular Biology, 1999. v. 1.
 31. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Genetic characterization of actinomycetes isolated from cerrado soil. In: 21a. reunião anual de genética de microrganismos, 1997, Londrina - PR. 21a. reunião anual de genética de microrganismos, 1997.
 32. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Identificação quimiotaxonômica e molecular de actinomicetos do cerrado. In: 43o. congresso nacional de genética, 1997, Goiânia, 1997.
 33. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Alteração da taxa de crescimento em *Escherichia coli* causada por aumento da taxa de expressão da alfa-amilase de *Bacillus subtilis*. In: 19a. reunião anual de genética de microrganismos, 1994, Serra Negra - SP, 1994.
 34. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Análise e caracterização da atividade proteolítica do prossoma/MCP do fungo *Neurospora crassa*. In: 18a. reunião anual de genética de microrganismos, 1992, São Paulo, 1992.
 35. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Construction of new direct screening vectors. In: 21a. reunião anual da sociedade brasileira de bioquímica e biologia molecular, 1992, Caxambu - MG. 21a. sbg, 1992.
 36. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Aprimoramento de um vetor de seleção direta para clonagem moleculares. In: 17a. reunião anual de genética de microrganismos, 1991, Brasília, 1991.
 37. ALBUQUERQUE, E.V.S. . Melhoramento genético da produção de amilase de *Bacillus subtilis* por *Escherichia coli*. In: II national fair and congress of biotechnology, 1991, São Paulo. II national fair and congress of biotechnology, 1991.

Bancas

Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação

1. ALBUQUERQUE, E.V.S.. Participação em banca de Thaís de Carvalho Palácio. Indução de Calos Embriogênicos de Explantes Foliares de *Coffea canephora* Submetidos a Diferentes Tratamentos com o Hormônio 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Brasília.
2. PEREIRA, E. A.; MATTOS, J. K. A.; FREITAS, J. A. C.; ALBUQUERQUE, E.V.S.. Participação em banca de Welcimar Gonçalves da Cunha. Estudo da expressão transiente e estável do gene *gus* em meristemas apicais de embriões zigóticos de *Coffea arabica*, variedades IAPAR-59 e Acaia cerrado.. 2002. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia e Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília.

Eventos

Participação em eventos

1. V Latin American and Caribbean Meeting on Agricultural Biotechnology. *COFFEA ARABICA* PLANTS GENETICALLY MODIFIED THROUGH BOMBARDEMENT. 2004. (Congresso).
2. .51o. Congresso Nacional de Botânica. 2000. (Congresso).
3. 7ème Colloque National de la Société Française de Phytopathologie, SFP Phytopathologie 2009 - Lyon. Réponses de résistance du caféier (*Coffea arabica*) aux nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.).
author(s): Érika Albuquerque, Anne-Claire Lecouls, Anne-Sophie Petitot, Maria Grossi-De-Sa, D. Fernandez
4. 5th International Congress of Nematology. 2008 - Brisbane. Early resistance responses of coffee (*Coffea arabica*) to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) infection.
5. IV ème Workshop Consortium International pour la Biologie Avancée CIBA - Montpellier