

CÍNTIA DA SILVA ALVES ZAPPAVIGNA STARLING

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO PARASITISMO DE *Meloidogyne enterolobii* E *M. incognita* EM CULTIVARES DE PIMENTÃO

**Botucatu
2019**

CÍNTIA DA SILVA ALVES ZAPPAVIGNA STARLING

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO PARASITISMO DE *Meloidogyne enterolobii* E *M. incognita* EM CULTIVARES DE PIMENTÃO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientadora: Prof^a Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken

Coorientador: Prof^o Dr. Fernando Broetto

**Botucatu
2019**

S795c

Starling, Cintia da Silva Alves Zappavigna

Características bioquímicas do parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* e *M. incognita* em cultivares de pimentão / Cintia da Silva Alves Zappavigna Starling.
-- Botucatu, 2019

77 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientadora: Sílvia Renanta Siciliano Wilcken

Coorientador: Fernando Broetto

1. Nematoides-das-galhas. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Pimentão. 5. Defesa vegetal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DO PARASITISMO DE *Meloidogyne enterolobii* E *M. incognita* EM CULTIVARES DE PIMENTÃO"


AUTORA: CÍNTIA DA SILVA ALVES ZAPPAVIGNA STARLING

ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

COORIENTADOR: FERNANDO BROETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof.ª Dr.ª SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP


Pesquisadora Dr.ª MARIA JOSÉ DE MARCHI GARCIA
Descentralização e Desenvolvimento / APTA - Polo Regional Centro Oeste - Bauru


Pesquisadora Dr.ª JULIANA MAGRINELLI OSORIO ROSA
Laboratório de Nematologia / Instituto Biológico - Campinas


Pesquisadora Dr.ª MARIA MÁRCIA PEREIRA SARTORI
Produção e Melhoramento Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP


Prof. Dr. EDSON LUIZ LOPES BALDIN
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP

Botucatu, 04 de novembro de 2019.

Aos meus amados pais, Mariza e Carlecy,

À minha irmã, Cibele,

À minha cunhada, Juliana

Aos meus sobrinhos, Arthur, Helena e Suzanny,

Ao meu esposo, Renan,

À minha filha Valentina,

dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus queridos pais, Mariza e Carlecy, pelo apoio incondicional.

A Prof^a. Dra. Silvia Renata, pela orientação, ensinamentos, paciência e exemplo de profissional.

Ao Prof^o. Dr. Fernando Broetto, pela coorientação, amizade, dedicação e exemplo de profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a execução desse trabalho de pesquisa.

Ao Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociência, pela disponibilidade do laboratório para realização das análises bioquímicas.

Aos Colegas de trabalho, em especial Me. Mara Lúcia.

À minha querida irmã, Cibele, pelo amor e confidencialidade.

Aos meus sobrinhos, Arthur, Helena e Suzanny, por me completarem com a alegria e sinceridade.

Ao meu esposo e minha filha, Renan e Valentina, pelo amor, parceria, compreensão fazendo-me cada dia mais apaixonada pela missão sublime de ser esposa, mãe e profissional.

“Bem-aventurado todo aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos. Pois, comerás do trabalho das tuas mãos; feliz será e te irá bem. A tua mulher será como a videira frutífera, no interior da tua casa; os teus filhos como plantas de oliveira, ao redor da tua mesa.” Salmos 128:1-3

RESUMO

Essa pesquisa teve como objetivo avaliar as características bioquímicas de plantas de pimentão 'Beti-R' e 'AF-8253' sob influência ao parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* e *M. incognita*. O experimento foi conduzido em câmaras de BOD, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As plântulas foram transplantadas para vasos de 0,5 L contendo substrato autoclavada de solo, areia e matéria orgânica (1:2:1). A suscetibilidade e resistência dos genótipos foram determinadas e o protocolo de localização *in situ* de espécies reativas de oxigênio (EROs) adaptado. A classificação dos estádios de vida dos nematoides e a avaliação das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT), foram realizadas 2, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infestação. *M. enterolobii* se reproduziu nos genótipos 'Beti-R' e 'AF 8253' considerados suscetíveis. Já *M. incognita* não completou seu ciclo de vida após penetrar o sistema radicular da 'AF 8253', considerado resistente. As adaptações do protocolo de localização *in situ* de EROs permitiram determinar, eficientemente, o processo e a extensão da infestação pelo aumento da área das galhas, a qual foi determinada pela formação de radicais livres, delimitada pelo processo de formação das mesmas. A capacidade de resposta de defesa das plantas de pimentão 'Beti-R' à infecção por *M. enterolobii* pôde ser acompanhada qualitativamente pelas técnicas de detecção *in situ* de EROs, em especial para o radical superóxido. Observou-se ainda que níveis de respostas antioxidantes foram proporcionais ao aumento de espécies que penetraram e dos estádios de desenvolvimento *M. enterolobii* nas raízes do 'Beti-R'. Quando plantas de pimentão 'AF 8253' foram submetidas a interações compatível (*M. enterolobii*) e incompatível (*M. incognita*), desenvolveram diferentes respostas enzimáticas antioxidantes, onde as expressões das enzimas tiveram maior intensidade na interação compatível. Os resultados obtidos nos ensaios permitiram concluir, que é possível o estudo da relação patógeno-hospedeiro a partir de avaliações do comportamento bioquímico de plantas.

Palavras-chave: Nematoides-das-galhas. Enzimas antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio. Defesa vegetal.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the biochemical characteristics of 'Beti-R' and 'AF-8253' under the influence of the parasitism of *Meloidogyne enterolobii* e *M.incognita*. The experiment was conducted in BOD chambers, in a completely randomized design with four replicates. The seedlings were transplanted into 0.5 L pots containing autoclaved soil, sand and organic matter mixture (1:2:1). The susceptibility and resistance of the genotypes were determined and the in situ localization protocol of reactive oxygen species (ROS) adapted. The classification of the nematode life stages and the evaluation of the enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were performed 2, 7, 14, 21, 28 and 35 days after infestation. *M. enterolobii* was reproduced in the genotypes 'Beti-R' and 'AF 8253' considered susceptible. *M. incognita* did not complete its life cycle after penetrating the root system of 'AF 8253', considered resistant. The adaptations of the in situ localization protocol of ROS allowed to efficiently determine the process and extent of infestation by increasing the area of the galls, which was determined by the formation of free radicals, delimited by the formation process of the same. The defense response capacity of pepper plants 'Beti-R' to *M. enterolobii* infection could be accompanied qualitatively by the in situ detection techniques of ROS, especially for the superoxide radical. It was also observed that levels of antioxidative responses were proportional to the increase of species that penetrate and the stages of *M. enterolobii* development in the roots of 'Beti-R'. When plants of chili 'AF 8253' were subjected to interactions compatible (*M. enterolobii*) and incompatible (*M. incognita*), developed different antioxidative enzymatic responses, where the expressions of the enzymes had greater intensity in the compatible interaction. The results obtained in the tests allowed to conclude that it is possible to study the pathogen-host relationship based on biochemical behavior of plants.

Keywords: Root-knot nematode. Antioxidative enzymes. Oxygen reactive species. Vegetable defense.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1 - LOCALIZAÇÃO <i>in situ</i> DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM RAÍZES PARASITADAS POR <i>Meloidogyne enterolobii</i>.....	18
1.1 INTRODUÇÃO.....	19
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1.2.1 Confirmação da suscetibilidade.....	20
1.2.2 Localização <i>in situ</i> de EROs no sistema radicular.....	21
1.3 RESULTADOS.....	22
1.4 DISCUSSÃO.....	25
1.5 CONCLUSÃO.....	27
1.6 AGRADECIMENTOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 2- PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE INTERAÇÃO COMPATÍVEL DE <i>Meloidogyne enterolobii</i> EM PLANTAS DE PIMENTÃO.....	30
2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.2.1 Experimento de penetração.....	33
2.2.2 Localização <i>in situ</i> de EROs no sistema radicular.....	34
2.2.3 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e peroxidase (POD).....	34
2.3 RESULTADOS.....	35
2.3.1 Penetração de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	35
2.3.2 Localização <i>in situ</i> de EROs no sistema radicular.....	39
2.3.3 Atividade enzimática.....	40
2.3.4 Avaliação enzimática temporal.....	41
2.4 DISCUSSÃO.....	44
2.5 CONCLUSÃO.....	49

2.6	AGRADECIMENTOS.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	CAPÍTULO 3 - COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLANTAS DE PIMENTÃO SOB INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO COMPATÍVEL E INCOMPATÍVEL DE <i>Meloidogyne</i> spp.....	54
3.1	INTRODUÇÃO.....	55
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.2.1	Experimento de penetração.....	57
3.2.2	Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e peroxidase (POD).....	57
3.3	RESULTADOS.....	59
3.3.1	Penetração de <i>M. incognita</i> e <i>M. enterolobii</i>	59
3.3.2	Atividade enzimática.....	62
3.3.3	Avaliação enzimática temporal.....	63
3.4	DISCUSSÃO.....	66
3.5	CONCLUSÃO.....	69
3.6	AGRADECIMENTOS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	69
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

Para se proteger dos nematoides fitoparasitas, as plantas evoluíram eficientes mecanismos de defesa, incluindo barreiras químicas, físicas e defesa mediada por genes de resistência altamente especializados (WILLIAMSON, 1999).

Entre os nematoides endoparasitas sedentários, o gênero *Meloidogyne* tem complexa relação com plantas de importância econômica. A alta população deste patógeno no cultivo de hortaliças vem dificultando a atividade em termos econômicos. Na cultura do pimentão, as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* são as mais importantes em razão do dano e do difícil controle destas espécies (PINHEIRO et al., 2013).

Alguns porta-enxertos de pimentão ('Silver' e 'AF 8253') já possuem genes que conferem resistência à *M. javanica* e *M. incognita* (CARNEIRO et al., 2006). Já para *M. enterolobii* não se encontra material com esta característica, visto a capacidade da espécie de contornar resistência mediada pelo gene *Mi-1*, (MILLIGAN et al., 1998; VOS et al., 1998). Expressão associada à indução da resposta hipersensibilidade (DROPKIN, 1969).

Ao iniciar o processo de parasitismo, juvenis de segundo estágio (J2) penetram a epiderme, orientando-se em direção à região apical ao longo do eixo radicular. No cilindro vascular incitam locais de alimentação que aumentam de tamanho e atividade metabólica, possivelmente por meio de efetores (COSTA et al., 2017). De acordo com alguns autores, moléculas efetoras são responsáveis pela modificação e secreção de proteínas, modulação da parede celular, dismutação de EROs e formação de locais de alimentação (WILLIAMSON; GLEASON, 2003; AHMED et al., 2013).

A resistência de plantas a nematoide é caracterizada pela resposta de hipersensibilidade que consiste na morte celular localizada dos tecidos vegetais (MELILLO et al., 2006). Genes de resistência à *Meloidogyne* spp. foram identificados em várias espécies vegetais estando associada a reação de hipersensibilidade em células radiculares circundando o fitoparasita. Isso sugere a ativação concomitante de enzimas envolvidas no metabolismo EROs (ZACHEO; BLEVE, 1998).

Espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxílico (OH.) são subprodutos do metabolismo destrutivos para as células, capazes de oxidar proteínas, DNA e lipídios (MITTLER et al., 2004, GILL; TUTEJA, 2010, LIEBTHAL et al., 2018). Estresses abióticos e bióticos podem desencadear a formação de EROs, tais como seca, salinidade, resfriamento, toxicidade de metais e radiação UV-B. Entretanto, ataque de patógenos, levam a maior produção destes radicais, devido à ruptura da homeostase celular (SHAH et al., 2001; SHARMA; DUBEY, 2007; MITTLER et al., 2011).

Embora caracterizada pela ação destrutiva, EROs também atua como sinalizador de estresses (MITTLER, 2016). A ação tóxica ou sinalizadora dependerá do equilíbrio entre a produção e a dismutação de radicais livres. Para que isso ocorra é necessário que as células controlem o nível de produção de EROs, não eliminando-os completamente, mas evitando danos oxidativos (SHARMA et al., 2012; MITTLER et al., 2016).

Para conter os efeitos deletérios das EROs, um complexo mecanismo enzimático antioxidante é formado. De acordo com Mittler et al. (2004) e Sharma et al., (2012) as principais enzimas que dismutam as EROs em plantas, incluem superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione e peroxirredoxina (PrxR). Estas enzimas têm sido encontradas em quase todos os compartimentos celulares, demonstrando a importância de manter equilíbrio de EROs para a sobrevivência celular (MITTLER et al., 2004).

Genes que codificam SODs, PODs, CATs e APXs (ROZE et al., 2008; BELLAFIORE; BRIGGS., 2010) foram identificados em interações compatíveis em hospedeiro de *Meloidogyne* spp. Entretanto, a ativação destas enzimas dependerá da cultura, duração e severidade do estresse, órgão, estágio fenológico e do tipo de enzima antioxidante que atuam nas células (SCANDALIOS, 2005).

Durante interações incompatíveis, O_2^- são produzidos fora da célula e rapidamente convertidos em H_2O_2 . Visto que, H_2O_2 é um oxidante estável e ausente de carga, que facilita a passagem através da camada bilipídica da membrana celular, levando a rápida resposta de defesa vegetal. Em interações compatíveis, um

pico de H_2O_2 sinaliza genes codificadores de enzimas antioxidantes (LEVINE et al., 1994).

Embora as plantas desenvolvam eficientes estratégias de defesas, os nematoides adquiriram mecanismos para superá-las, ao produzir enzimas e proteínas homólogas capazes de manipular respostas de defesa, tornando a interação ainda mais complexa. Neste sentido, o objetivo foi avaliar características bioquímicas de cultivares de pimentão sob influência das interações compatível e incompatível de *Meloidogyne enterolobii* e *M. incognita* visando compreender os aspectos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, além da ativação de diferentes mecanismos de defesa do vegetal frente ao ataque por nematoides.

CAPÍTULO 1

LOCALIZAÇÃO *in situ* DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM RAÍZES PARASITADAS POR *Meloidogyne enterolobii*

Resumo - Plantas produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) para ativar respostas de defesa contra agentes patogênicos, estimulando a morte celular programada ou sinalizando outros mecanismos de defesa, determinando a interação compatível ou incompatível. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi adaptar o protocolo de infiltração do corante para tecidos radiculares infectados previamente, com *Meloidogyne enterolobii*. O experimento foi conduzido em câmaras tipo BOD, onde se determinou a suscetibilidade do genótipo 'Beti-R' e posteriormente as adaptações no protocolo de localização *in situ* de EROs. Os índices de galhas, massas de ovos, fator de reprodução e testes para localizar EROs foram feitos 60 dias após a inoculação. O nematoide se reproduziu no genótipo considerado suscetível. As adaptações no protocolo permitiram avaliar, eficientemente, o processo de infestação determinando a extensão da infestação pelo aumento da área de formação de radicais livres, delimitada pelo processo de formação das galhas.

Palavras-chave – Resposta de defesa, nematoides, resistência, nematoide de galhas, enzimas antioxidantes.

Abstract - Plants produce ROS to activate defense responses against pathogens, stimulating programmed cell death or signaling other defense mechanisms, determining compatible or incompatible interaction. In this sense, the objective was to adapt the protocol of dye infiltration to previously infected root tissues, with *Meloidogyne enterolobii*. The experiment was conducted in BOD chambers, where it determined the susceptibility of the Beti-R genotype and subsequently the adaptations in the *in situ* localization protocol of ROS. The rates of galls, egg masses, replication factor and tests to locate ROS were made 60 days after inoculation. The nematode reproduced in the genotype considered susceptible. The adaptations in the protocol allowed to evaluate, efficiently, the process of infestation determined the extent of infestation by the increase of the area of free radical formation, delimited by the gall formation process.

Keywords - Defense response, nematodes, resistance, root-knot nematode, antioxidant enzymes.

1.1 Introdução

Nematoides do gênero *Meloidogyne* estão entre os patógenos mais nocivos a agricultura mundial, parasitando culturas de importância econômica (Araújo Filho et al., 2016; Brida et al., 2018).

Juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne*, ao iniciar o parasitismo, penetram a epiderme em direção à região apical da raiz ao longo do eixo radicular. Esse fato causa a formação de locais de alimentação no cilindro vascular, geralmente com 2-12 células gigantes, que aumentam de tamanho e atividade metabólica. Células corticais, também aumentam de tamanho e sofrem desorganização além disso a raiz torna-se espessa caracterizando o sintoma conhecido como galhas (Karssen et al., 2013; Curtis, 2007).

Plantas podem reconhecer a infecção, ativando resposta de defesa a partir da interação patógeno-hospedeiro. Estes processos, induzidos por um gene de resistência podem ser rápidos e eficientes (interação incompatível), ou não impedir a infecção resultando em interação compatível (Greenberg & Yao 2004). Mudanças complexas podem ser desencadeadas em nível morfológico de células nutritoras e acompanhadas por alterações na expressão gênica das células radiculares (Greenberg & Yao 2004). Essas alterações podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas do sistema de defesa antioxidativo (Melillo et al., 2006; Ciuffetti et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo celular que podem oxidar compostos celulares importantes e causarem prejuízos ao metabolismo, caso não sejam dismutadas (Mittler et al., 2004; Gill & Tuteja, 2010; Liebthal et al., 2018). Plantas produzem EROs para ativar respostas de defesa contra agentes patogênicos e estimulam a morte celular programada para deter e eliminar patógenos invasores (Ali et al., 2017). EROs produzidas durante interações com patógenos, incluem os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), os quais podem afetar processos celulares envolvidos nas interações (Melillo et al., 2006). O monitoramento de EROs nas células vegetais é

difícil pois, algumas delas têm meia vida curta e estão expostas a mecanismos antioxidantes celulares (Mittler et al, 2011).

A metodologia para localizar EROs *in situ* é importante para avaliar a extensão das respostas do vegetal a patógenos da parte aérea e determinar a resposta de defesa das plantas. Tecidos radiculares podem absorver o corante NBT (*Nitrobluetetrazolium*) sem a imposição de vácuo, como no método original. Por isto, o objetivo foi adaptar o protocolo de infiltração do corante para tecidos radiculares infectados previamente com *M. enterolobii*.

1.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA/UNESP, Campus de Botucatu-SP. As análises de localização de EROs foram realizadas no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu-SP.

1.2.1 Confirmação da suscetibilidade

O genótipo comercial de pimentão ‘Betri-R’ foi avaliado para comprovar a suscetibilidade a *M. enterolobii*. As plantas foram obtidas por semeadura em bandejas de isopor com substrato comercial. Aos 35 dias após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 0,5 L contendo substrato autoclavado de solo, areia e matéria orgânica (1:2:1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, sendo cada parcela constituída de uma planta por vaso. O solo foi infestado com 3000 ovos de *M. enterolobii* em três orifícios igualmente espaçados e 2,5 cm de profundidade ao redor da base de cada planta. Os ovos de *M. enterolobii* foram extraídos (Hussey & Barker, 1973) a partir de população pura mantidas em tomate ‘Rutgers’.

Após 60 dias da infestação do solo, a parte aérea das plantas foi descartada, e o sistema radicular lavado em água corrente. E em seguida, as partes foram submersas em solução de floxina-B para colorir as massas de ovos e galhas. Os índices de galhas (GI) e massa de ovos (IMO) foram determinados (Taylor & Sasser,

1978), com (0) indicando ausência de galhas ou massas de ovos; (1) 1-2 galhas ou massas de ovos; (2) 3-10 galhas ou massas de ovos; (3) 11-30 galhas ou massas de ovos; (4) 31 a 100 galhas ou massas de ovos; e (5) mais de 100 galhas ou massas de ovos.

Em seguida, os sistemas radiculares foram processados separadamente de acordo com Hussey e Baker (1973). A população final (Pf) de ovos e juvenis foi determinada usando câmara de Peters sob um microscópio de luz. Este valor foi dividido pela população inicial inoculada (Pi) para obtenção do fator de reprodução do nematoide em cada parcela ($FR = Pf / Pi$). As plantas com $FR < 1$ foram consideradas resistentes, e com $FR > 1$ ou igual a 1, considerados suscetíveis (Oostenbrink, 1966).

1.2.2 Localização *in situ* de EROs no sistema radicular

O processo de infiltração do corante NBT foi inicialmente executado a partir da imposição de três ciclos de 5 min de vácuo, intercalados por intervalos de 30 segundos. Entretanto, este protocolo foi traçado para infiltrar o corante em tecidos foliares, nesse sentido, realizou-se algumas adaptações no método.

As plântulas de pimentão com cerca de 10 cm de altura foram transplantadas para vasos de 02 L conforme descrito anteriormente. O substrato foi infestado com cerca de 3000 ovos de *M. enterolobii* após cinco dias do transplântio. Mudas de tomateiro 'Rutgers' foram utilizadas como padrão de viabilidade do inóculo. As plantas foram mantidas por 30 dias após inoculação (DAI) em câmaras de BOD em temperatura de 26 C° com fotoperíodo de 12 h. A irrigação foi realizada duas vezes ao dia, quando necessário. O delineamento foi inteiramente casualizado, com seis repetições e dois tratamentos (solo infestado/não infestado).

A localização de EROs foi estimada aos 30 DAI, pelo método de coloração com nitrobluetetrazolium (NBT), adaptado da metodologia de Jabs et al., (1996). O sistema radicular de cada parcela foi lavado cuidadosamente com água deionizada, disposto em placas de Petri e mantidos em bandejas com gelo.

Cortes transversais no sistema radicular de aproximadamente 5 cm foram incubados em solução de NBT (0.5 mg mL⁻¹) preparado em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7.8. Posteriormente, placas contendo solução de NBT foram mantidas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a infiltração os

cortes radiculares foram clarificados em etanol 90%. Como controle, foram adicionados superóxido dismutase (10 unidades mL⁻¹) e MnCl₂ 10 mM para corar o meio antes da infiltração e neutralizar a ação do NBT.

A presença de EROs foi detectada por manchas escuras devido a deposição de formazana. Os resultados foram obtidos por meio de imagens adquiridas por microscópio câmera 500x digital USB Hd Lupa, marca ROHS.

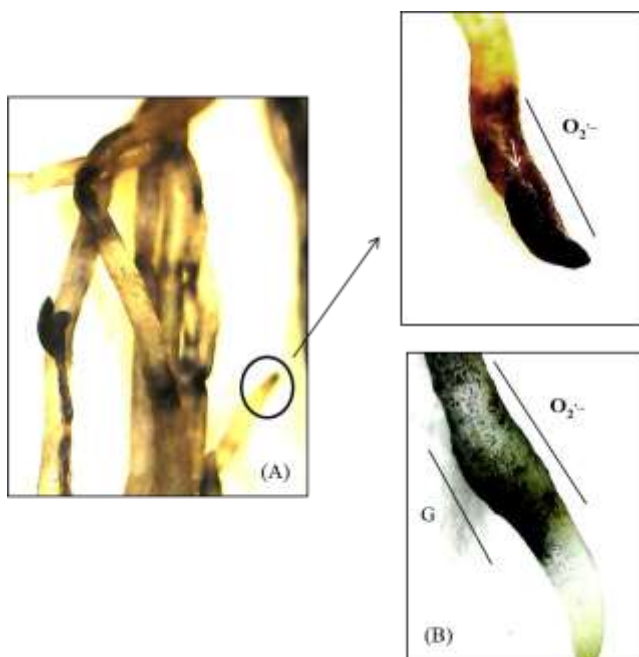
1.3 Resultados

O genótipo 'Beti-R' reagiu como suscetível a *M. enterolobii*, com FR= 7,86 e valor de IG e IMO iguais à cinco. O alto FR (11,56) confirmou a viabilidade do inóculo em tomateiro 'Rutgers'.

A coloração das áreas não infectadas pelo nematoide foi muito intensa, dificultando uma avaliação mais segura (Figura 1A) e, por isto, a metodologia projetada para infiltrar o corante (NBT) em tecidos foliares, não é efetiva para o sistema radicular, necessitando de adaptações.

O maior acúmulo de EROs nas células da epiderme não se restringiu ao sintoma das galhas (Figura 1 B), tornando-se desnecessária a utilização de três ciclos de 5 min de vácuo, como usado na metodologia para localização dos mesmos *in situ* em folhas. Este efeito ocorreu provavelmente devido aos tecidos radiculares serem mais tenros que os foliares. Por isso, essa metodologia foi adaptada, com os tecidos incubados em presença do NBT sem o vácuo. A infiltração foi muito eficiente com tempo de incubação, relativamente, curto, 15 min. (Figura 1).

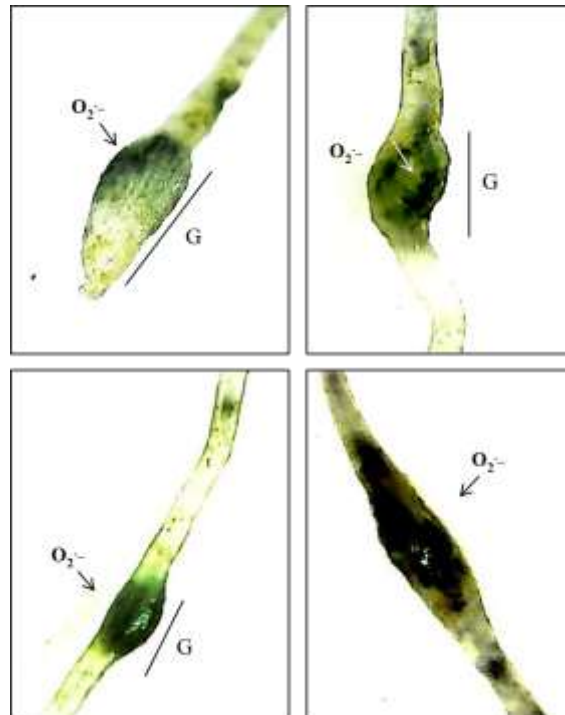
Figura 1. Áreas de coloração intensa com nitrobluetetrazolium, a partir da imposição de três ciclos de 5 min de vácuo (A); coloração com nitrobluetetrazolium não restrita no sintoma de galhas (G) em raiz de cultivar 'Betí-R' suscetível à *M. enterolobii* 30 DAI (B). Aumento 500 x.



Após este processo de adaptação de metodologia, os resultados de localização in situ de EROS foram bastante promissores e foi possível avaliar a extensão da capacidade de resposta das plantas frente ao desafio do parasita.

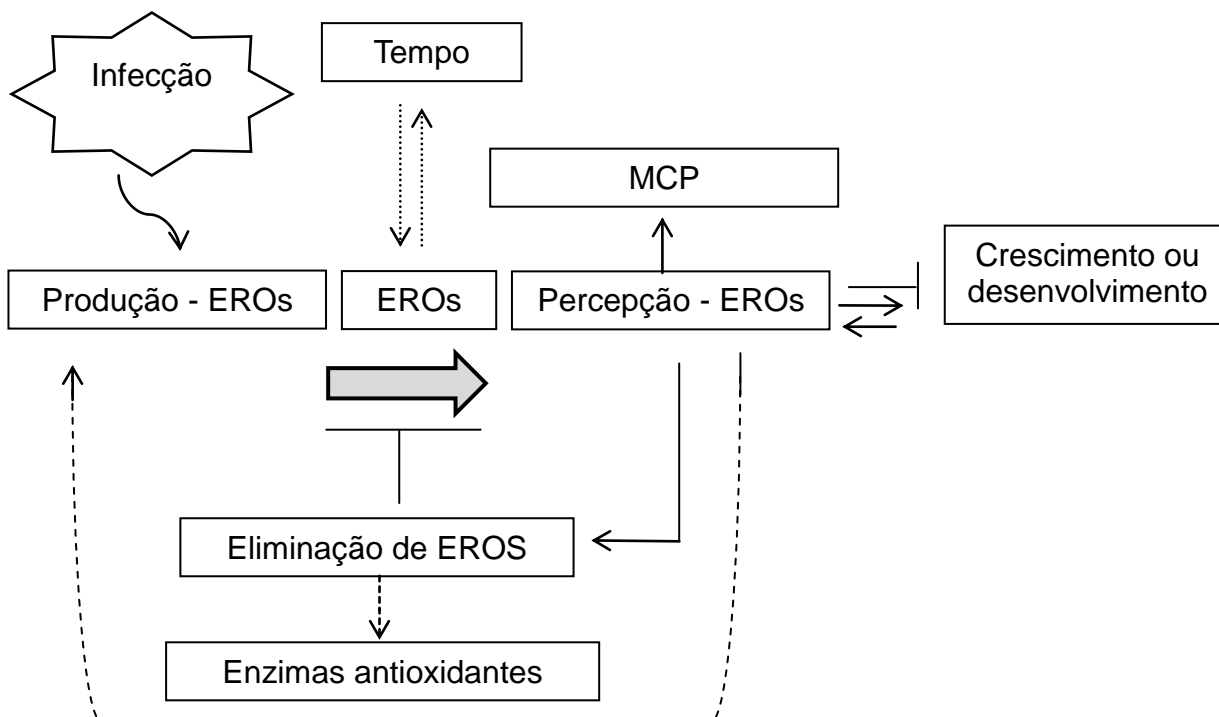
A intensidade do acúmulo de EROs nas células da epiderme pode ser visualizada na Figura 2. A presença de manchas escuras (formazana resultante da fotoredução do NBT) demonstra a localização dos pontos de formação de O_2^- . Este efeito foi observado especialmente no início do processo de infecção, na formação das galhas. Regiões não parasitadas da raiz, após a infiltração, denotam partes saudias da mesma quando não se observou acúmulo de O_2^- (S/ O_2^-).

Figura 2. Acúmulo (O_2^-) de EROs em raízes de cultivar 'Beti-R' suscetível à *M. enterolobii* 30 DAI. Galhas (G). Aumento 500x.



O processo de modulação da sinalização de EROs, através de sinais celulares do reconhecimento da infecção é demonstrado de modo simplificado na figura 3. A produção aumentada de EROs nas células vegetais pelas vias produtoras, é percebida por diferentes sensores que ativam respostas celulares de defesa contra o parasita. A intensidade e o tempo dos sinais de EROs são determinados pela interação entre as vias de produção e de eliminação, sendo a última também responsáveis por manter um baixo nível de estado estacionário de EROs, por meio de enzimas antioxidantes. Entretanto a modulação dos níveis de EROs também pode envolver um feedback positivo entre a percepção e a produção de EROs (linha tracejada). Além de ativar ou suprimir diferentes respostas celulares, a percepção de EROs pode afetar o crescimento e o desenvolvimento, inibindo o estresse durante a infecção ou regulando durante o crescimento normal.

Figura 3. Modulação da sinalização de espécies reativas de oxigênio. MCP - morte celular programada; EROs - espécies reativas de oxigênio.



1.4 Discussão

O hospedeiro suscetível permite a reprodução do fitonematoide, resultando em $FR > 1$ (Oostenbrink, 1966), conforme verificado no pimentão 'Beti-R'. No entanto, a resistência varia entre plantas e, portanto, cada processo é importante para se compreender a interação parasita-hospedeiro compatível. A taxa de penetração do nematoide pode ser menor (Dropkin & Webb, 1967), semelhante (Siddiqui & Taylor, 1970) ou maior (Schneider, 1991) em plantas resistentes, dependendo da espécie de *Meloidogyne* e do hospedeiro. Isto pode estar relacionado com a defesa vegetal e a reação de hipersensibilidade e ocorrer, precocemente, durante a invasão do tecido, no final da migração ou no início da formação de células gigantes (Davis et al., 2000; Huang et al., 2004).

A absorção rápida da solução reagente, pelo tecido radicular mostra a especialização dessa parte da planta, maior que a do tecido foliar. A localização de EROs na parte aérea da planta baseia-se na produção de vácuo no interior do tubo, repetindo o processo em ciclos curtos de dois a cinco minutos com a interrupção do vácuo facilitando a entrada da solução reagente no disco foliar e tornando a coloração azulada, sinal da presença de EROs (Jabs et al., 1996).

A alta produção de EROs, especificamente, próximo aos pontos de formação de galhas se deve à alterações morfológicas causadas na raiz e modificações fisiológicas complexas das células que se tornam locais de alimentação dos J2 (Karssen et al., 2013). Plantas resistentes à patógenos estimulam a morte celular programada visando deter e/ou eliminar o invasor (Ali et al., 2017). A superprodução e acúmulo de EROs, resultante do contato da planta com o patógeno, é uma das principais questões a serem discutidas por afetar a resistência ou uma característica interação bem-sucedida (Melillo et al., 2006).

A detecção da presença de O_2^- em raízes de 'Beti-R' foi eficiente, após a adaptação metodológica, sem o uso do vácuo no processo de infiltração do NBT. A presença de O_2^- , indicada pela formação de manchas escuras como resultado da fotorredução do NBT processo de infecção, especialmente, na formação das galhas, indica a resposta de defesa do hospedeiro durante o processo de infestação.

A coloração escura da parede e dos compartimentos celulares indica alta produção de EROs em fileiras de células com o nematoide aprisionado (Melillo et al., 2006). As células podem responder ao estímulo com produção de radical superóxido (O_2^-) além do produto de dismutação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). De modo geral, a reação inicial de defesa do hospedeiro suscetível pode ser semelhante à de um resistente com secreções liberadas pelo tecido vegetal durante a migração dos indivíduos de *M. enterolobii*. (Davis et al., 2000; Huang et al., 2004). O número de galhas nas raízes varia entre planta hospedeira e o nematoide envolvido na interação. Diferentes EROs podem desencadear efeitos opostos em plantas, dependendo da intensidade e do tempo de sua geração (Delledonne et al., 2002; Mellersh et al., 2002). Portanto, plantas que não desenvolvem este sintoma necessitam ser mais bem estudadas, aumentando a importância desta forma de metodologia de detecção *in situ* de EROs.

A detecção da produção aumentada de EROs nas células, mostra que diferentes sensores ativam respostas celulares de defesa contra o nematoide. Isso se deve a produção e eliminação de EROs na célula vegetal que controlam a modulação para sinalização do processo de infecção causada pelo fitoparasita. Os níveis de EROs, produzidos após o reconhecimento do estresse, são percebidos por proteínas, enzimas ou receptores que modulam diferentes vias metabólicas de defesa (Mittler, et al., 2004).

A atividades enzimáticas, como as NADPH oxidases, podem gerar EROs e são removidas por enzimas de eliminação, incluindo superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e peroxirredoxina (PrxR). O tempo de sinalização pode ser determinado, somente, através da interação entre as vias produtoras e eliminadoras de EROs da célula (Mittler, et al., 2011) .

1.5 Conclusão

A metodologia de localização *in situ* de EROs permite avaliar, eficientemente, o processo de infestação de plantas por *M. enterolobii* e a extensão de infestação pelo aumento da área de formação de radicais livres, delimitada pela formação das galhas.

O protocolo desenvolvido é viável para aplicação em tecidos não clorofilados com menor tempo de incubação e sem a necessidade de aplicação de vácuo.

1.6 Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PELD) pela concessão da bolsa de estudo, a Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Departamento de Proteção Vegetal e ao Departamento de Química e Bioquímica, pelo financiamento e suporte.

Referências

- Ali, M. A., Azeem F., Li H., Bohlmann, H. (2017). Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-21.
- Araújo Filho, J. V., Machado, A. C. Z., Dallagnol, L. J., Camargo, L. E. A. (2016). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing resistant tobacco cultivars in Southern Brazil. *Plant Disease* 100, 1222-1231.

- Ciuffetti, L. M., Manning V. A., Pandelova L., Betts M. F., Martinez, J. P. (2010) Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis-wheat* interaction. *New Phytologist* 187, 911-919.
- Curtis, R. H. C. (2007) Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. *Briefings in Functional Genomics* 6, 50-58.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M. N., Abad, P. (2000). Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* 38, 365–396.
- Davis, E. L., Mitchum, M. G. (2005). Nematodes: sophisticated parasites of legumes. *Plant Physiology* 137, 1182-1188.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P. F., Biodani, 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.
- Dropkin, V. H. (1963). Cellulase in phytoparasitic nematodes. *Nematologica* 9, 444-454.
- Gheysen, G., Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40, 191-219.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry* 48, 909–930.
- Greenberg, G. T., Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6, 201–21.
- Huang, G., Dong R., Maier T., Allen R., Davis E. L., Baum T. J., Hussey, R. S. (2004). Use of solid-phase subtractive hybridization for the identification of parasitism gene candidates from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology* 5, 217–222.
- Hussey, R. S., Baker, K. R. A. (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* species, including a new technique. *Plant Disease Report* 57, 1025-1028.

- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 27, 1853–1856
- Karssen, G., Liao, J. L., Kan, Z., van Heese, E. Y. J. & den Nijs, L. J. M. F (2013). On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann. *Zookeys* 181, 67-77.
- Liebthal M., Maynard D., Dietz K. J., (2018). Peroxiredoxins and redox signaling in plants, antioxidant redox sign. *Antioxidants Redox Signaling* 7, 609-624.
- 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.
- Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J., Heath M. (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *Plant Journal* 29, 257–268.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van B. F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490–498.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele K., Gollery, M., Shulaev, V., Breusegem, F. V. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16, 300–309.
- Oostenbrink, M. (1966). Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 66, 1–46.
- Schneider, S. M. (1991) Penetration of susceptible and resistant tobacco cultivars by *Meloidogyne* juveniles, *Journal of Nematology* 23, 225-228.
- Siddiqui, L. A. (1971) Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in oat roots, *Nematologica* 17, 237-242.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE INTERAÇÃO COMPATÍVEL DE *Meloidogyne enterolobii* EM PLANTAS DE PIMENTÃO

Resumo - O estudo avaliou a localização *in situ* de espécies reativas de oxigênio (EROs) no tecido radicular, bem como o processo de eliminação das mesmas, durante interação compatível de plantas de pimentão e *M. enterolobii*. Plantas de pimentão 'Beti-R' foram transplantadas para vasos de 0,5 L, contendo substrato autoclavada de solo e mantidas em câmara de BOD. Posteriormente, as plântulas foram infestadas com níveis populacionais de 0, 100, 333 e 1000 juvenis de segundo estágio (J2). Os estádios de vida do nematoide, a localização de EROs e a expressão enzimática foram avaliados com 2, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infestação. Foi possível acompanhar qualitativamente a capacidade de defesa das plantas sob infecção por meio das técnicas de detecção *in situ* de EROs. Observou-se que os níveis de respostas antioxidativas foram proporcionais ao aumento de espécimes que penetraram o sistema radicular e dos estádios de desenvolvimento de *M. enterolobii*. Os resultados obtidos permitiram concluir que, o tempo de exposição do hospedeiro ao parasita em uma interação compatível proporciona o estudo cinético e apresenta correlações, considerando-se a atividade de enzimas antioxidantes.

Palavras chave: Nematóide-das-galhas, enzimas antioxidantes, EROs, nematóides, interação compatível.

Abstract - The study evaluated the *in situ* localization of reactive oxygen species (ROS) in root tissue, as well as the process of elimination of them, during compatible interaction of pepper plants and *M. enterolobii*. Plants of chili 'Beti-R' were transplanted into 0.5 L vessels, containing autoclaved soil mixture and maintained in a BOD chamber. Subsequently, the seedlings were infested with 0, 100, 333 and 1000 J2. The nematode life stages, ROS localization and enzymatic expression were evaluated 2, 7, 14, 21, 28 and 35 days after infestation. It was possible to qualitatively monitor the defense capacity of the plants under infection through *in situ*

detection techniques of ROS. It was observed that the levels of antioxidative responses were proportional to the increase of specimens that penetrated the root system and the stages of development of *M. enterolobii*. The results obtained allowed to conclude that the time of exposure of the host to the parasite in a compatible interaction provides the kinetic study and presents correlations, considering the activity of antioxidative enzymes.

Keywords: Root-knot nematode, antioxidative enzymes, EROs, peppers, nematodes, compatible interaction.

2.1 Introdução

Meloidogyne spp. são nematoides endoparasitas sedentários, altamente especializados em contornar resistência para estabelecer interações compatíveis. Conseqüentemente, espécies deste gênero vêm causando danos em inúmeras culturas de importância econômica (Araújo Filho et al., 2016; Brida et al., 2018).

Moléculas efetoras liberadas pelo nematoide para iniciar e estabelecer o processo de parasitismo são responsáveis pela biossíntese, modificação e secreção de proteínas. Esses compostos induzem ainda a modulação da parede celular, dismutação de EROs e estabelecimento específico de locais de alimentação (Williamson & Gleason, 2003; Ahmed et al., 2013). Interações envolvendo parasitas biotróficos são moduladas por reações bioquímicas, estabelecendo relações específicas, compatível ou incompatível.

Para se proteger de patógenos invasores, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa, incluindo barreiras químicas, físicas e a defesa mediada por genes de resistência (Williamson, 1999; Williamson & Kumar., 2006). A expressão fenotípica da resistência é caracterizada pela reação de hipersensibilidade que consiste na morte celular localizada nos tecidos vegetais no local da infecção (Melillo et al., 2006; Williamson & Kumar 2006). Genes que conferem resistência à *Meloidogyne* spp. foram identificados em várias espécies vegetais estando associados à reação de hipersensibilidade, sugerindo a ativação concomitante de enzimas do sistema de resposta antioxidativo, responsáveis pela dismutação de EROs, como oxigênio singleto (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH.) (Zacheo & Bleve., 1998; Apel & Hirt, 2004).

As EROs são subprodutos do metabolismo destrutivas para as células, possivelmente resultado da perturbação mecânica exercida no processo de penetração do nematoide. Nesse movimento, os nematoides inserem seu estilete nas células externas da raiz, no início da infecção causada por juvenis de segundo estágio (J2). Nos estádios posteriores, a infecção é bloqueada apenas em interações incompatíveis, ocorrendo duas explosões oxidativa associada à reação de hipersensibilidade (Melillo et al., 2006). Já em interações compatíveis, apenas um pico de H_2O_2 ocorre, levando a ativação de outros mecanismos de defesa. Portanto, a atividade de EROs não se limita em causar reação de hipersensibilidade, mas atua na sinalização de outras respostas de defesa, entre elas mecanismos antioxidantes.

As principais enzimas que dismutam as EROs em plantas, incluem superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona e peroxirredoxina (PrxR) (Mittler et al., 2004). Juntamente com ácido ascórbico e glutatona, essas enzimas desencadeiam mecanismos eficientes desintoxicação de $O^{\cdot-}_2$ e H_2O_2 . Além disso, auxiliam no equilíbrio entre as SODs e as diferentes enzimas de eliminação de H_2O_2 nas células que é considerado crucial na determinação do nível estacionário dessas moléculas.

A elucidação dos mecanismos bioquímicos da capacidade das plantas em resistirem à infecção por patógenos é crucial para compreender e controlar as doenças. A hipótese central do estudo é que as plantas iniciaram mecanismos de respostas oxidativas, em função da infecção pelo parasita nas raízes, esta reação será acompanhada pela ativação das enzimas antioxidativas? Nesse sentido, o estudo propôs a localização *in situ* de EROs no tecido radicular após infestação com *M. enterolobii*, bem como o processo de desintoxicação durante interação compatível de *M. enterolobii* em plantas de pimentão.

2.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA/UNESP, Campus de Botucatu-SP. As análises de localização de EROs e atividade enzimática foram conduzidas no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Os nematoides utilizados como fonte de inóculo consistiram em juvenis infectantes de segundo estágio (J2) extraídos das raízes de tomateiro 'Rutgers'. O genótipo comercial de pimentão 'Beti-R', com suscetibilidade já comprovada em estudos prévios, foi utilizada como objeto de estudo da interação parasita-hospedeiro.

Plantas jovens de pimentão foram cultivadas individualmente (n=4) em substrato autoclavada de solo, areia e matéria orgânica (1:2:1). Posteriormente, o substrato foi infestada com suspensão aquosa de 0, 100, 333 e 1000 J2 de *M. enterolobii* e mantida em câmara de BOD em temperatura de 26 C° com fotoperíodo de 12 h.

Aos 2, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infestação (DAI), os sistemas radiculares foram lavados cuidadosamente para avaliação da penetração e localização de EROs. As folhas foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer a -80 °C, para posterior avaliação da atividade enzimática.

O delineamento foi inteiramente casualizado, e os dados de cada momento de análise submetidos á análise de variância seguidos por teste de Tukey. Para avaliar o comportamento da atividade enzimática em função do tempo foi realizada análise regressão linear. O software utilizado foi o Minitab 16 e considerou-se significativo quando $p < 0,05$.

2.2.1 Experimento de penetração

O sistema radicular foi submetido à coloração com fucsina ácida (McBeth et al., 1941 apud Daykin & Hussey 1988) e dissecadas sob microscópio estereoscópico, para avaliação do desenvolvimento dos nematoides. A classificação das fases foi feita de acordo com Triantaphyllou e Hirschmann (1960) como: juvenil infectantes de segundo estágio que não induziu as células alimentadoras (J2a); juvenil de segundo estágio que induziu as células alimentadoras (J2b); juvenil de terceiro estágio que se formou após a segunda ecdise e é desprovido de estilete (J3); juvenil de quarto estágio formado após a terceira ecdise, por semelhança foi considerado (J3)/(J4); fêmeas sem ovos (F1) e fêmeas com ovos (F2). O número de juvenis dos diferentes estádios de desenvolvimento foi contabilizado nas seis épocas de coleta (2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI).

2.2.2 Localização *in situ* de EROs no sistema radicular

A localização de EROs foi estimada pelo método de coloração com nitrobluetetrazolium (NBT), conforme adaptação do método de Jabs et al., 1996. O sistema radicular de cada parcela foi lavado cuidadosamente com água deionizada, disposto em placas de Petri e mantidos em bandejas com gelo.

Cortes transversais no sistema radicular de aproximadamente 5 cm foram incubados em solução de NBT (0.5 mg mL^{-1}) preparado em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7.8. Posteriormente, placas contendo solução de NBT foram mantidas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a infiltração os cortes foram clarificados em etanol 90%. Para os controles, algumas amostras foram pré - incubadas por 30 min em solução tampão contendo $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de superóxido dismutase (SOD) e então tratadas por 1 h com a solução contendo NBT.

A presença de EROs foi detectada devido a manchas escuras resultante da fotoredução do NBT, gerando formazana. Os resultados foram obtidos por meio de imagens adquiridas em microscópio câmera 500x digital USB Hd Lupa, marca ROHS.

2.2.3. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD)

O extrato foliar para analisar a atividade de cada enzima foi obtido pela maceração de 300 mg de tecido vegetal em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0.1 M a pH 6,8, suplementado com 200 mg de PVPP. O homogenato foi centrifugado a $5.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , retirando-se em seguida o sobrenadante que foi armazenado em ultrafreezer a -80°C .

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, E.C 1.15.1.1) foi determinada pelo método descrito por Giannopolitis e Ries (1977) com modificações. A reação foi conduzida em placas de ELISA com capacidade de 3mL, adicionando 5 μL do extrato foliar a 2.995 μL do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7,8, EDTA 0,1 μM , azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT) 75,0 μM , metionina 13,0 mM e riboflavina 2,0 μM . As placas foram dispostas em câmara escura com luz fluorescente de 15 W por 10 minutos. Ao término do tempo, a iluminação foi interrompida e o azul de formazana formado pela fotorredução do

NBT foi determinado em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) na absorvância de 560 nm. Os tubos considerados brancos (para zerar o aparelho) receberam 3 mL do meio de reação, porém foram mantidos no escuro. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em UI de SOD mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima catalase (CAT, E.C 1.11.1.6) foi obtida utilizando 50 µL do extrato foliar em 950 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7,0, suplementado com H₂O₂ 12,5 mM. A reação foi monitorada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) a 240 nm, considerando a variação de absorção no intervalo de 8 a 40 segundos, sendo a atividade da enzima calculada pelo coeficiente de extinção molar $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em kat µg⁻¹ proteína (Peixoto et al., 1999).

A atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada utilizando 100 µL do extrato foliar em 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM a pH 6,8, contendo Pyrogallol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. Após a incubação por 1 min a reação foi paralisada com 0,5 mL de ácido sulfúrico 5%. As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) a 420 nm. A atividade da enzima foi calculada pelo coeficiente de extinção molar $\epsilon = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em kat µg⁻¹ proteína (Peixoto et al., 1999).

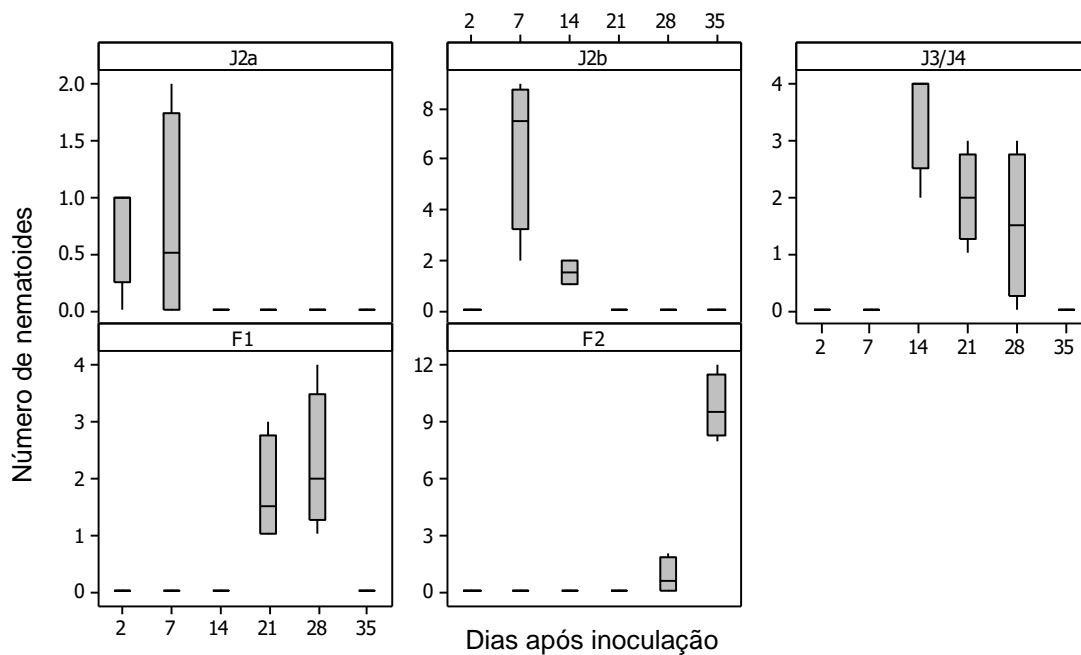
2.3 Resultados

2.3.1 Penetração de *Meloidogyne enterolobii*

Ao avaliar o ciclo de vida dos diferentes níveis populacionais (0, 100, 333 e 1000) de *M. enterolobii* inoculados em pimentão 'Beti-R', nota-se o mesmo perfil de desenvolvimento em relação ao tempo, embora o aumento populacional proporcione maior número de indivíduos penetrados na raiz (Figura 1, 2 e 3). Na infestação com 100 espécimes, houve baixa penetração dos nematoides (Figura 1). Entretanto, todas as fases de desenvolvimento foram observadas (J2a, J2b, J3/J4, F1 e F2). Dois DAI, J2a (1) de *M. enterolobii* foi encontrado. Aos sete dias, dois estágios foram verificados, sendo J2a (1) e J2b (6). Já aos 14 DAI, foram encontrados nematoides no estágio J2b (1), entretanto, a fase J3/J4 (3) já havia se estabelecido. Aos 21 DAI

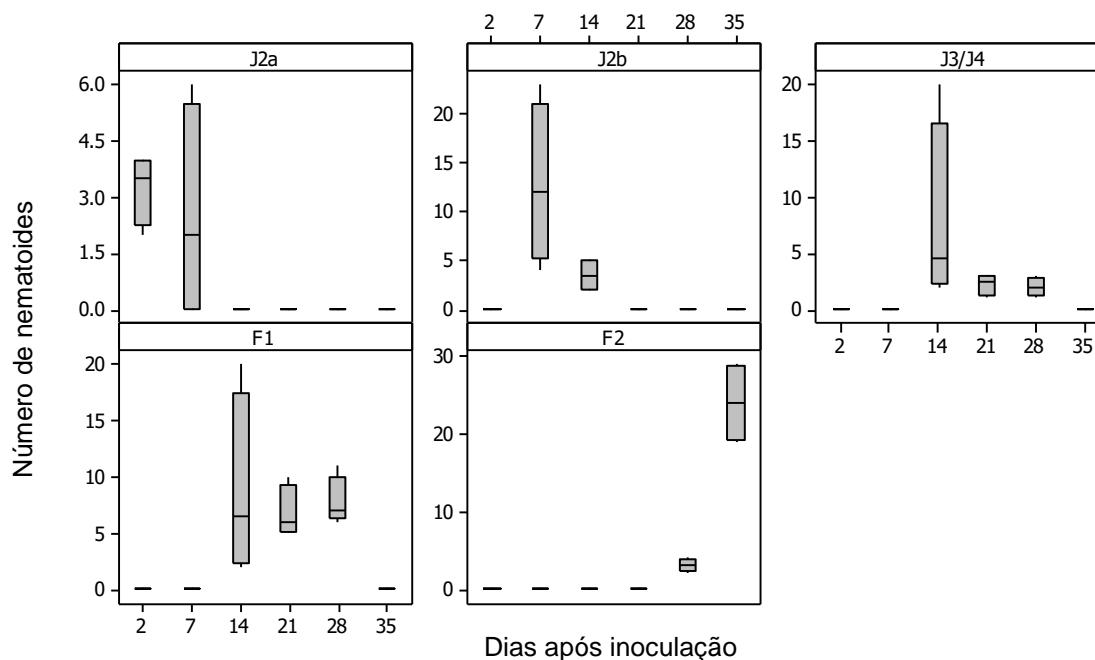
observou-se J3/J4 e fêmeas sem ovos (F1). As fases J3/J4, F1 e F2 foram constatados aos 28 DAI enquanto que aos 35 DAI, detectou-se em média nove fêmeas com ovos (F2).

Figura 1. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* após inoculação de 100 indivíduos em pimentão 'Beti-R' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação (2, 7, 14, 21, 28,35 DAI). J2a: Juvenil infectante do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



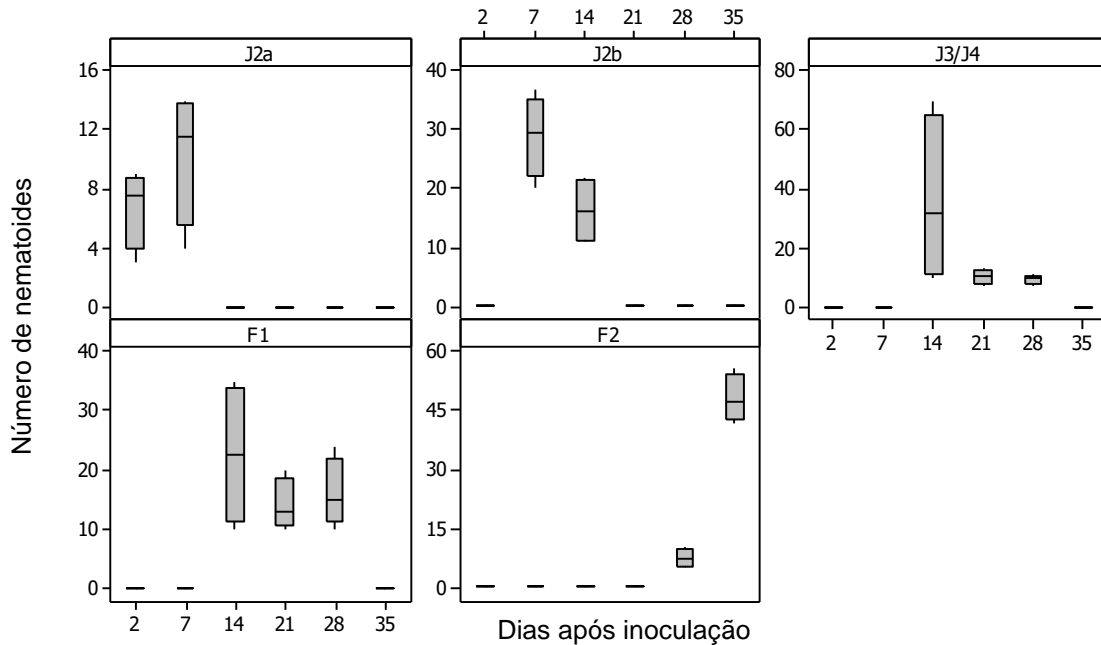
Com aumento do número de espécimes inoculadas (333), verificou-se maior taxa de penetração (Figura 2), quando comparada a população anterior (Figura 1). Dois DAI, três indivíduos em média de J2a havia penetrado o sistema radicular. Aos sete DAI, observou-se dois estágios de desenvolvimento, sendo, J2a (2) e J2b (12). Já J2b (3), J3/J4 (7) e F1 (8) aos 14 DAI. Aos 21 dias, verificou-se a presença J3/J4 (2) e seis fêmeas sem ovos (F1). J3/J4, F1 e F2 foram encontrados aos 28 dias e aos 35 dias média de 24 F2 (Figura 2).

Figura 2. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* após inoculação de 333 indivíduos em pimentão 'Beti-R' mantidos a 26 ° C em seis períodos de avaliação. J2a: Juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



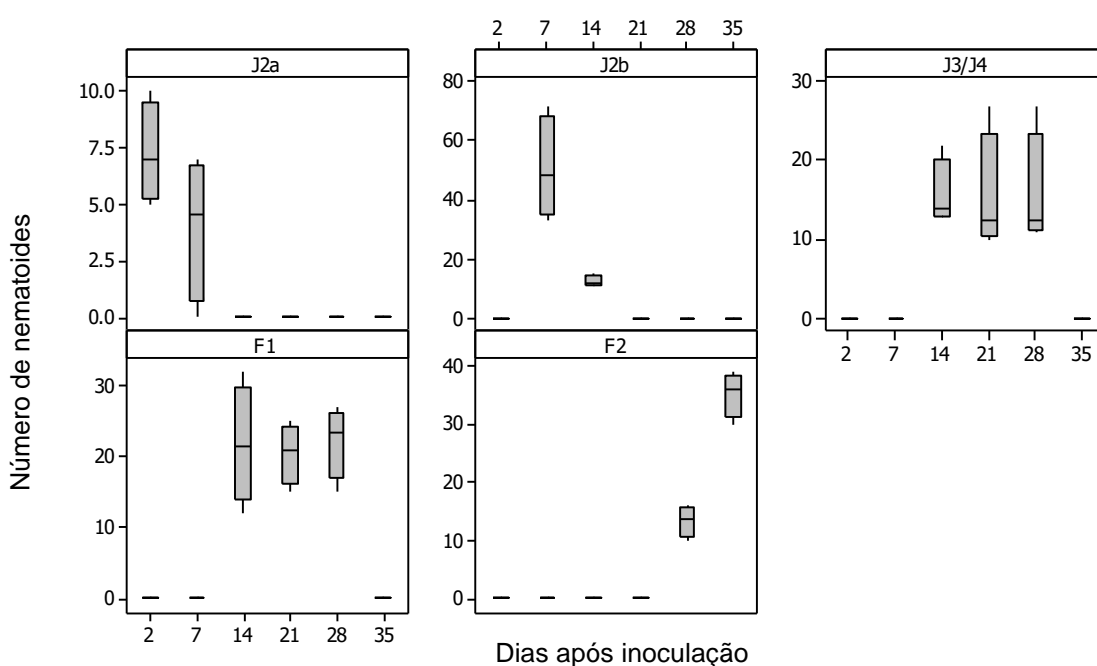
Nas plantas infestadas com 1000 espécimes de *M. enterolobii*, houve um aumento proporcional ao número de indivíduos penetrados, além do desenvolvimento precoce de alguns estágios do nematoídeo, ao comparar com níveis populacionais anteriores. Aos dois DAI, indivíduos de J2a (6) já havia penetrado o sistema radicular. Já sete DAI, foi observado dois estágios de desenvolvimento, sendo, J2a (10) e J2b (29). Os estágios J2b (16), J3/J4 (34) e F1 (22) foram encontrados aos 14 DAI. Aos 21 dias, observou-se J3/J4 (10) e F1 (14). Aos 28 DAI nove J3/J4, F1 (16) e F2 (7). E aos 35 dias 48 fêmeas com ovos foram encontradas (Figura 3).

Figura 3. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* após inoculação de 1000 indivíduos em pimentão 'Beti-R' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação. J2a: Juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



Nas raízes de tomateiro, as fêmeas (F1) já foram observadas aos 14 DAI, em seguida, desenvolvido para fêmeas com ovos (F2) em 28 DAI a 35 DAI. Estes resultados comprovam a viabilidade do inóculo utilizado (Figura 4).

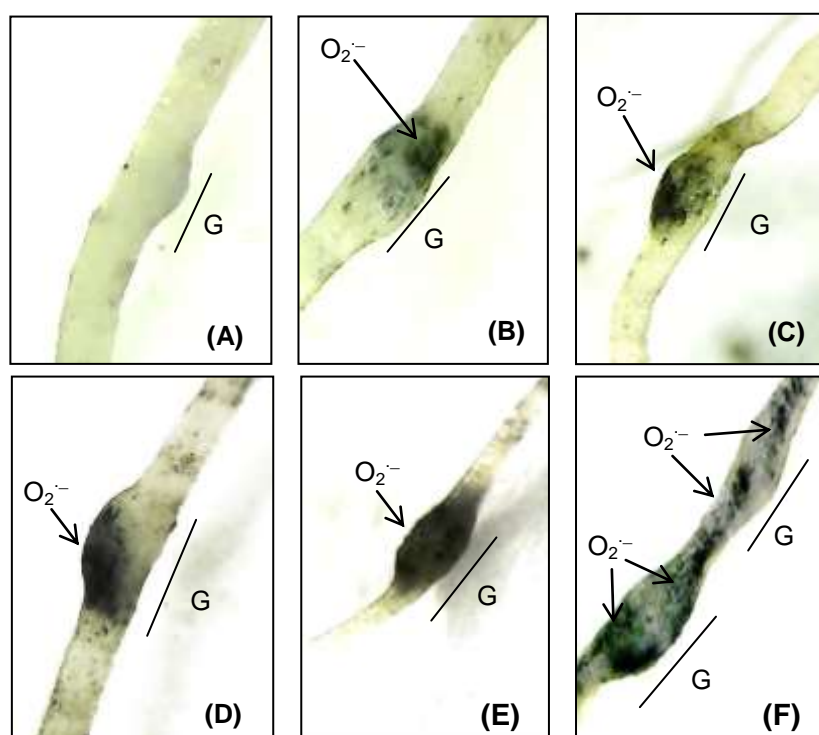
Figura 4. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* após inoculação de 333 indivíduos em Tomateiro 'Rutgers' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação. J2a: Juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



2.3.2 Localização *in situ* de EROs no sistema radicular

A presença de O_2^- denotado pela formação de manchas escuras, resultado da fotorredução do NBT, indica o local da penetração do nematoide (Figura 5). Não foi possível observar a presença de O_2^- imediatamente após a inoculação (2 DAI). Já aos sete DAI, verificou-se níveis de EROs *in situ*, no local da infecção (Figura 5B), momento o qual J2b induziu células alimentadoras (Figura 2), além do início da formação de galhas (Figura 5B); já aos 14 dias observou-se discreto aumento da coloração escura que caracteriza a presença de O_2^- (Figura 5C). Vinte e um DAI, momento o qual J3/J4 se formaram após a terceira ecdise e dependendo da intensidade da doença, fêmeas já se estabeleceram, onde manchas pontuais nas galhas foram observadas (Figura 5D). Aos 28 DAI as galhas estavam completamente comprometidas por fotorredução do NBT, indicando alta intensidade de EROs no local do estabelecimento do nematoide (Figura 5E). Os níveis de O_2^- foram reduzidos aos 35 DAI (Figura 5F), quando fêmeas com ovos foram encontradas (Figura 2) em pimentão 'Beti-R'.

Figura 5. Detecção e extensão *in situ* do acúmulo de EROs em raízes de pimentão 'Beti-R' suscetível à *M. enterolobii*, 2 (A); 7 (B); 14 (C); 21 (D); 28 (E) e 35 (F) dias após a infestação. Galhas (G); ânion superóxido (O_2^-). Aumento 500 x.



2.3.3 Atividade enzimática

Verificou-se influência na atividade das enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) em plantas submetidas a diferentes níveis populacionais de *M. enterolobii* (100, 333 e 1000), durante o processo de estabelecimento do nematoide. As plantas submetidas à infestação de 1000 espécimes apresentaram maior nível atividade para todas as enzimas estudadas (Figura 6, 7 e 8), atribuído ao aumento considerável de indivíduos que penetram o sistema radicular, quando comparado aos demais tratamentos (Figura 3).

As três primeiras avaliações da atividade SOD foram semelhantes estatisticamente entre os tratamentos, havendo diferença significativa aos 21, 28 e 35 DAI, para os tratamentos quando comparado a plantas não inoculadas (Tabela 1). No geral, houve aumento da atividade SOD nas folhas durante a fase de maior acúmulo de O_2^- (Figura 5e), além da mudança de estágio de desenvolvimento do nematoide de J3/J4. F1 e F2 (Figuras 1, 2 e 3).

A enzima peroxidase, apresentou diferença estatística em todas as avaliações, quando comparado plantas infectada e/ou não infectadas, independentemente dos diferentes níveis populacionais (tratamentos). Na infestação com 1000 indivíduos, as plantas apresentaram atividade enzimática POD superior em todos os momentos, embora aos sete e quatorze DAI não tenha diferenciado estatisticamente do tratamento 333 indivíduos. Aos 35 DAI, o tratamento com 333 espécimes não apresentou diferença estatística ao compará-la a população de 100 indivíduos (Tabela 1).

Para a enzima catalase, o tratamento com 1000 espécimes de *M. enterolobii*, em todas as avaliações apresentou diferença estatística quando comparada a plantas não inoculadas. Já a população de 333 espécimes apresentou atividade a partir da sétima avaliação e a menor população (100 indivíduos) a partir de 21 DAI, quando comparada com plantas não inoculadas em cada momento (Tabela 1).

Tabela 1- Proteínas solúveis e atividade da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) em plantas de pimentão 'Betí-R' sob infestação de diferentes níveis populacionais de *M. enterolobii*.

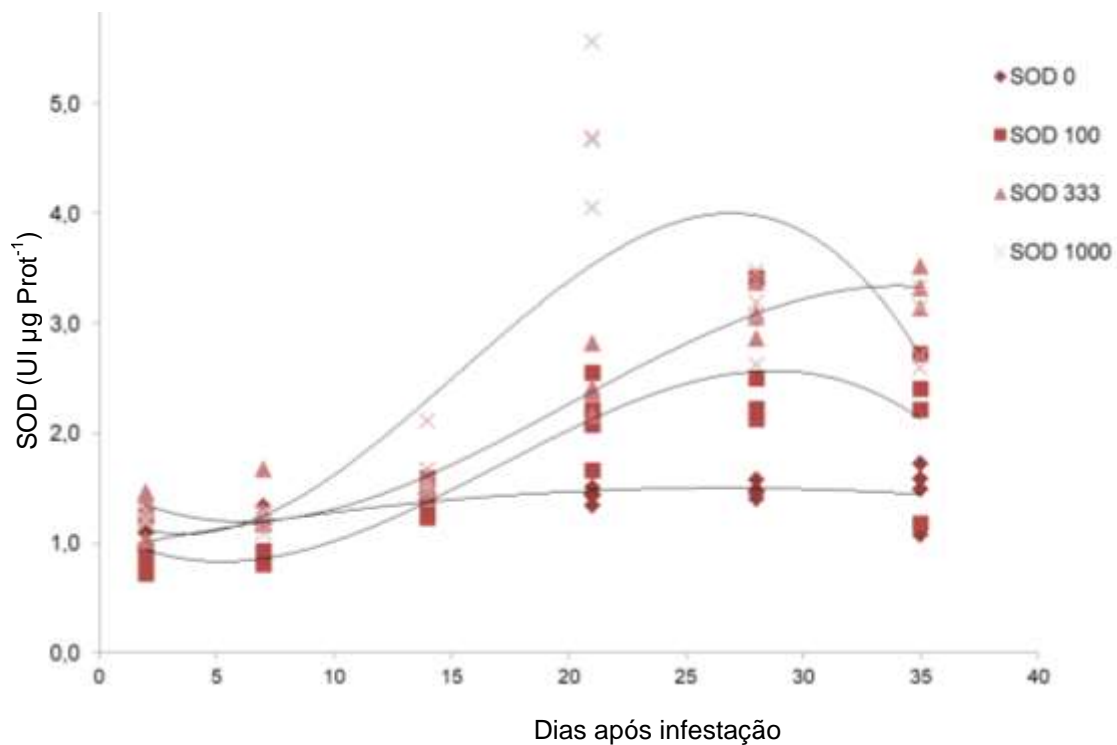
	SOD (UI $\mu\text{g Prot}^{-1}$)					
	2 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	35 DAI
0	0,97 A	1,23 A	1,42 A	1,42 C	1,47 B	1,46 C
100	0,93 A	1,35 A	1,38 A	2,12 BC	2,56 A	2,12 BC
333	1,30 A	1,32 A	1,47 A	2,44 B	3,09 A	3,32 A
1000	1,22 A	1,20 A	1,70 A	4,74 A	3,08 A	2,94 AB
	POD ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$)					
	0	223,94 D	224,85 C	155,61 C	225,92 D	226,66 D
100	281,58 C	335,09 B	340,03 B	421,55 C	670,19 C	814,28 B
333	427,31 B	599,38 A	778,05 A	809,34 B	846,39 B	899,90 B
1000	554,92 A	546,69 A	813,45 A	1272,87 A	1440,83 A	1870,61 A
	CAT ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$)					
	0	135,23 B	139,02 C	115,53 C	144,52 D	181,94 D
100	130,15 B	149,68 C	155,73 C	280,31 C	342,47 C	375,99 C
333	157,17 B	272,39 B	280,39 B	461,28 B	634,17 B	1309,37 B
1000	306,32 A	443,80 A	899,79 A	984,27 A	1054,31 A	1815,18 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.4 Avaliação enzimática temporal

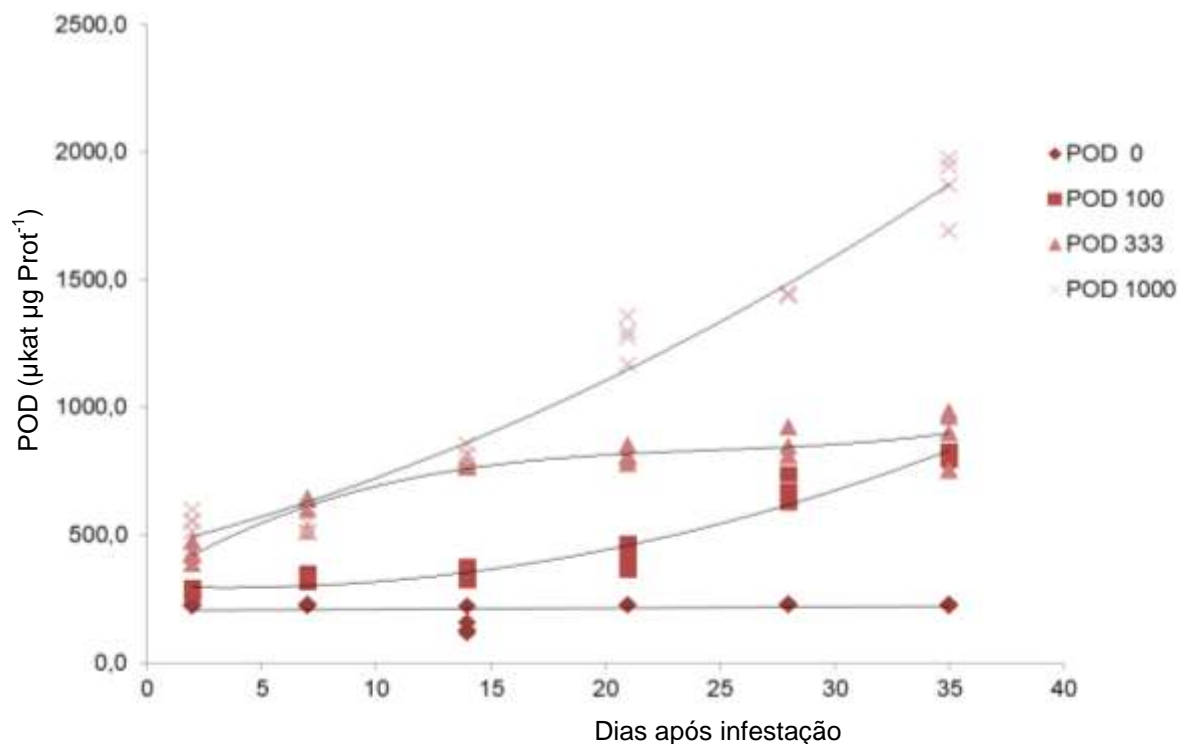
A atividade da superóxido dismutase foi semelhante entre as plantas de acordo com incremento populacional do nematoide (Figura 6). A partir de sete DAI, verificou-se aumento constante da atividade enzimática em todos os tratamentos, exceto na ausência do nematoide. Plantas sob infestação de 1000 espécimes, apresentaram atividade superior às demais, com valor máximo aos 21 DAI e média de 4,74 UI de SOD mg^{-1} proteína, com posterior queda da atividade. Já plantas infestadas com 333 espécimes aos 35 DAI o comportamento da enzima manteve-se constante, com 3,32 UI de SOD mg^{-1} proteína, sem decréscimo da atividade. Nas plantas infestadas com 100 espécimes, apresentou maior atividade da enzima aos 28 DAI (2,56 UI de SOD mg^{-1} proteína) com posterior decréscimo. No geral, houve aumento no comportamento da enzima superóxido dismutase nas folhas, quando indivíduos de *M. enterolobii* alcançaram o estágio de desenvolvimento J3/J4, F1 e F2, sendo mais evidenciada aos 21 a 28 DAI (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 6 – Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em plantas de pimentão ‘Beti-R’ infestadas com diferentes níveis populacionais de *M. enterolobii* (♦ 0, ■ 100, ▲ 333 e X1000) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



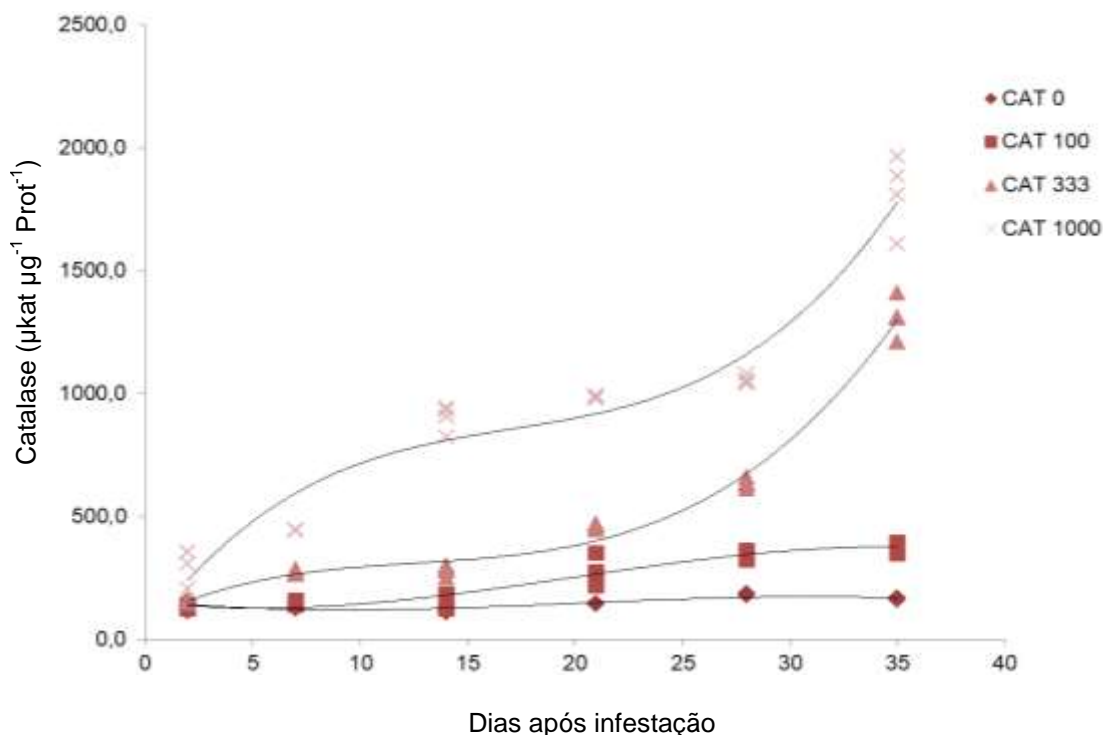
Para plantas não infectadas, não houve variação importante da atividade de peroxidase no tempo, com média de 213,77 kat μg^{-1} de proteína (Figura 7). Plantas infestadas independente do tratamento apresentaram aumento da atividade POD de acordo com acréscimo populacional e tempo. Quando submetidas à infestação de 1000 espécimes, as plantas apresentaram atividade de POD superior às demais, onde aos dois DAI resultou em 554,92 kat μg^{-1} de proteína e aos 35 DAI 1870,61 kat μg^{-1} de proteína. A enzima inicia a atividade desde o estágio J2, tendo aumento de acordo com a mudança do desenvolvimento dos nematoides que penetraram o sistema radicular (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 7 – Atividade do peroxidase (POD) em plantas de pimentão 'Betí-R' infestadas com diferentes níveis populacionais de *M. enterolobii* (♦ 0, ■ 100, ▲ 333 e ×1000) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



A atividade da catalase foi em média de 182 kat μg^{-1} de proteína no início dos tratamentos, onde os níveis populacionais 333 e 1000 causou crescente atividade enzimática nas plantas em função do tempo, não havendo queda da atividade por todo o ciclo de vida do nematoide. A infestação com 100 espécimes do nematoide não provocou acréscimo importante na atividade da CAT, o mesmo aconteceu com plantas não inoculadas (Figura 8). A atividade desta enzima, assim como da peroxidase, aumentou de acordo com a mudança do desenvolvimento dos nematoides, a partir do estágio J2 (Figuras 1, 2 e 3), embora tenha apresentado aumento apenas nas plantas que receberam tratamento de 333 e 1000 espécimes de *M. enterolobii*.

Figura 8 – Atividade da catalase (CAT) em plantas de pimentão ‘Beti-R’ infestadas com diferentes níveis populacionais de *M. enterolobii* (♦ 0, ■ 100, ▲ 333 e ×1000) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



2.4 Discussão

Os nematoides fitoparasitas são parasitas obrigatórios e alimentam-se do citossol das células vegetais vivas, portanto, biotróficos. Para estabelecer interações com hospedeiro, complexos mecanismos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos são ativados. Entretanto, estas respostas podem diferenciar de acordo com a espécie do nematoide e do hospedeiro, considerando-se diferenças nas características dos ciclos parasitários (Williamson & Gleason 2003), além das respostas de defesa da planta.

Na infestação com 100 espécimes de *M. enterolobii*, houve baixa penetração, embora, todas as fases do desenvolvimento tenham ocorrido. De acordo com alguns estudos, um indivíduo que infecta a raiz, à medida que migra entre as células, pode causar uma série de resposta de defesa, detectada logo na penetração de J2 (Davis et al., 2000; Huang et al., 2004). Nesse estágio, em que o nematoide busca o hospedeiro e é responsável pelo estabelecimento do local de alimentação, moléculas efetoras são liberadas pelo nematoide para iniciar e estabelecer o processo de parasitismo (Williamson & Gleason, 2003; Ahmed et al., 2013; Costa et

al., 2017). Em casos de interação compatível os indivíduos completam o ciclo, independentemente do nível populacional.

Na população de 333 espécimes *M. enterolobii* infestado, verificou-se discreto aumento de indivíduos penetrados em raízes de pimentão 'Beti-R', comparado ao tratamento com 100 espécimes. Embora, uma alta população de nematoides possa interferir diretamente na severidade da doença, dependendo da agressividade entre espécies, nas etapas iniciais da interação a penetração de J2 nos tecidos radiculares tende ser baixa, em situações compatíveis e incompatíveis (Karssen e Moens, 2006; Melillo et al., 2006). Portanto, a primeira reação bioquímica detectada inicial do parasitismo, isso é, a resposta de hipersensibilidade, pode ser causada pelas secreções liberadas pelos nematoides durante a migração (Huang et al., 2004). Este efeito pode estar relacionado, provavelmente, com o aumento do dano mecânico gerado nas células externas da raiz (Melillo et al., 2006). Desta forma, quanto maior o número de nematoides efetivamente penetrados e a agressividade da espécie em estudo, maior o desafio do hospedeiro em resistir ao ataque.

Nas plantas infestadas com 1000 espécimes de *M. enterolobii*, houve aumento proporcional de indivíduos penetrados, assim como o desenvolvimento precoce de alguns estágios. O processo de penetração dos nematoides nas células radiculares não depende apenas do uso do estilete, mas da força mecânica exercida, além do composto secretado fora da membrana plasmática ou diretamente no citoplasma, o qual produz cascata de sinalizações bioquímicas (Mitchum et al., 2013). Proteínas homólogas às vegetais, estimuladas ou induzidas pelo nematoide, podem resultar na modulação do ciclo celular do hospedeiro, reprogramando a expressão gênica e favorecendo o parasitismo (Bellafiore & Briggs, 2010). Contudo, com o aumento de indivíduos penetrando o sistema radicular e incitando a formação de locais de alimentação no cilindro vascular e aumentando a atividade metabólica através de efetores, maior o estresse causado no hospedeiro. Estes eventos desencadeiam respostas eficientes e complexas de defesa que, quando contornadas, gera interação compatível e o nematoide completa o ciclo.

Através de ensaios com tomateiro 'Rutgers', foi possível comprovar a viabilidade do inóculo utilizado, devido sua alta suscetibilidade à *M. enterolobii*. As respostas de defesa mediadas pelo gene *Mi-1*, presente em plantas de tomate, estão associadas à indução reações de hipersensibilidade (Dropkin 1969; Delledonne et al., 2002), uma das características da resistência gene-para-gene.

Entretanto, tal gene confere resistência a apenas três espécies de nematoide-das-galhas, *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica* (Dropkin 1969).

A presença de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) denotado pela formação de manchas escuras, indica o local da penetração do nematoide no tecido radicular. A rápida geração de EROs, com destaque para $O_2^{\cdot-}$ e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é a reação pioneira da planta em resposta ao ataque de patógenos avirulento ou virulento (Mittler et al., 2004; Gill & Tuteja., 2010; Liebthal et al., 2018). A excitação no elétron externo, formando oxigênio singleto (1O_2) ou de uma sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular, produz tais espécies reativas (Resende et al., 2003). Aos dois DAI não foi detectada a presença de $O_2^{\cdot-}$ *in situ*, entretanto a pesquisa aponta superprodução de EROs após a penetração do J2, sendo as primeiras 24 h críticas para se determinar a resposta de defesa vegetal ao ataque de nematoides avirulentos ou virulentos (Melillo et al., 2006). De contra partida, estudos também demonstraram que diferentes EROs podem desencadear efeitos opostos em plantas, dependendo da intensidade e do tempo de sua geração (Mellersh et al., 2002). A partir de sete DAI, foi possível verificar a presença de EROs *in situ*, devido ao maior número de indivíduos J2a penetrados. Estudos avaliando a produção de EROs em interações compatível e incompatível, verificaram que a superprodução foi resultado da perturbação mecânica da migração do nematoide, independentemente do desenvolvimento posterior da interação (Melillo et al., 2006). Plantas de soja infectada por *Heterodera glycines* apresentaram sintomas de reação de hipersensibilidade proveniente da formação de EROs durante a invasão e indução de sincício, levando a degradação do mesmo, que é a única fonte de nutrientes para o nematoide (Waetzig et al., 1999).

Os níveis de $O_2^{\cdot-}$ foram reduzidos aos 35 DAI onde, fêmeas com ovos foram encontradas no material estudado. Levine et al., (1994), argumentam que durante a interação compatível apenas um pico intenso de H_2O_2 ocorre, atuando não apenas como molécula causadora de reação de hipersensibilidade, mas como sinalizadora ativando genes codificadores de enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) que impedem danos oxidativos nas células. Vários genes que codificam as SOD foram descobertos em nematoides-das-galhas (Molinari & Miagola 1997; Bellafiore & Briggs, 2010). Além dessa, as plantas podem dismutar EROs a partir de enzimas acessórias como ascorbato peroxidases,

catalases, tioredoxinas e glutathiona peroxidases, que protegem as células dos danos produzidos por EROS (Mittler et al., 2016; Bellafiore & Briggs, 2010).

As defesas antioxidativas induzem enzimas capazes de neutralizar ou dismutar radicais livres e seus intermediários. Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e peroxidase (POD) são sistemas eficientes, onde a ação combinada converte os radicais livres $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em água e oxigênio molecular, evitando assim danos à componentes celulares (Singh et al., 2008). A base bioquímica da resistência à infecção por nematoides-das-galhas é discutida com ênfase nas toxinas pré-existentes, proteínas relacionadas à patogênese, mecanismos oxidantes e antioxidantes. Quando submetidos a estresses, os vegetais desencadeiam alterações das vias metabólicas, levando ao aumento drástico na produção de EROs provocando estresse oxidativo celular (Miller et al., 2010; Tripathy & Oelmüller, 2012).

Independentemente do tratamento com número de espécimes neste ensaio, encontrou-se diferença significativa para a SOD apenas aos 21 DAI. Entretanto, a atividade da SOD pode ser considerada como fator importante na tolerância ao estresse biótico, pois atua como umas das primeiras linhas de defesa enzimática, minimizando os efeitos deletérios de EROs (Dorneles et al., 2017). De acordo com Zhang e Kirkham (1996) a ativação dos mecanismos antioxidantes, depende de vários fatores, como o genótipo, modalidade de estresse biótico ou abiótico, elevando, diminuindo ou mantendo tais substâncias inalteradas.

A atividade da POD apresentou aumento em resposta à intensidade e severidade do estresse. Assim como as demais enzimas estudadas, a atividade da POD no tratamento com 1000 espécimes foi superior em todos os momentos avaliados. Entretanto, aos sete e quatorze DAI não houve diferença significativa para o tratamento com 333 espécimes. Estudos indicam que a atividade de uma ou mais enzimas antioxidativas, em plantas expostas a condições estressantes, pode estar relacionado ao aumento da tolerância ao estresse (Sharma et al., 2012).

O aumento populacional de *M. enterolobii*, também proporcionou maior atividade da CAT, a qual dismuta diretamente H_2O_2 em H_2O e O_2 (Gill & Tuteja, 2010) sendo, indispensável para a desintoxicação de EROs (Garg & Manchanda, 2009). As plantas possuem várias isoformas de CAT, sendo sua atividade mais efetiva em concentrações altas de H_2O_2 , por isso são consideradas indispensáveis em condições de estresse severo, quando os níveis de H_2O_2 estão maiores, a

exemplo de estresses causados por nematoides (Molinari & Miagola 1997). De acordo com Miller et al., (2009) ERO desencadeada por diferentes estímulos bióticos ou abióticos, pode ser bloqueada pela aplicação local de CAT ou inibidor da NADPH oxidase.

Após a inoculação das plantas de pimentão com *M. enterolobii* realizou-se estudo cinético da atividade antioxidativas em relação ao tempo de exposição.

Aos sete DAI, a enzima SOD aumentou a atividade em todos os tratamentos, exceto na ausência do nematoide. Paralelamente, J2a e J2b se estabeleceram plenamente na raiz. Nesta fase, o nematoide é responsável pela busca do hospedeiro e pela formação do local alimentação permanente na zona de diferenciação da raiz, induzindo a divisão nuclear sem citocinese nas células hospedeiras (Williamson & Gleason, 2003; Costa et al., 2017). Plantas sob infestação com 1000 espécimes, apresentaram atividade da SOD superior às demais, com valores máximos aos 21 DAI. Posteriormente a atividade diminuiu o que pode estar relacionado o estágio F1 do parasitismo detectado no sistema radicular. Este resultado, corrobora com os trabalhos de Huang et al., (2004) e Melillo et al., (2006) que associam o processo de migração intercelular a liberação de efetores associados ao acionamento da resposta de defesa da planta ao parasitismo em interações compatíveis. Vinte e um dias após a penetração é o período em que os nematoides desse gênero aumentam rapidamente de tamanho e passam por ecdises, transformando-se em 3^o e 4^o estágio juvenil e finalmente em adultos sedentários.

Plantas infestadas independente do tratamento aplicado apresentaram aumento da atividade POD de acordo com acréscimo populacional (333 e 1000 espécimes) a partir de dois DAI. Nesse sentido, a atividade desta enzima também teve início no momento o qual J2 migrava intercelularmente nos tecidos corticais (Curtis, 2007). A POD apresentou aumento da atividade até o final do ciclo, demonstrando complexa interação entre nematoides do gênero *Meloidogyne* e seu hospedeiro. De acordo com Fagerstedt et al., (2010) a POD atua na defesa vegetal contra patógenos, através de vários processos fisiológicos, catalisando a oxidação de compostos fenólicos, que se acumulam em resposta à infecção, através da biossíntese de lignina, com objetivo de reforçar a parede celular.

Catalase teve aumento da atividade nos níveis populacionais 333 e 1000 de *M. enterolobii* em função do tempo. Esta enzima tem importante função na proteção

das células contra o estresse oxidativo, pela degradação direta do H_2O_2 (Gill & Tuteja 2010). Atuando em todo o ciclo de vida quando submetidas em população elevada, esta enzima parece ser fundamental na defesa vegetal (Dorneles et al., 2017). Isso é, desde o processo de penetração até o desenvolvimento de fêmeas, onde apresentou máxima atividade, atuando desta forma na redução de danos oxidativos causados pelo nematoide.

2.5 Conclusão

Os resultados obtidos nos ensaios permitiram concluir que é possível o estudo da relação patógeno-hospedeiro a partir de avaliações de respostas antioxidativas;

A capacidade de resposta de defesa das plantas à infestação por *M. enterolobii* pode ser acompanhada qualitativamente por técnicas de detecção *in situ* de EROs, em especial para radical superóxido;

Os níveis de respostas antioxidativas são proporcionais ao número de espécimes infestados e dos estágios de desenvolvimento do nematoide em estudo, de acordo com os tratamentos;

O tempo de exposição do hospedeiro ao parasita proporciona o estudo cinético e apresenta correlações, considerando-se a atividade de enzimas antioxidativas.

2.6 Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PELD), e a Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Departamento de Proteção Vegetal e ao Departamento de Química e Bioquímica, pelo financiamento e suporte.

Referências

Ahmed, M., Vossenbergh, B. T. L. H. V., Cornelisse, V., Karssen, G. (2013). On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne ulmi* Palmisano & Ambrogioni, (2000) (Nematoda, Meloidogynidae). *Zoo Keys* 362, 1-27.

Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55, 373-399.

Araújo Filho, J. V., Machado, A. C. Z., Dallagnol, L. J.; Camargo, L.E.A. (2016). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing resistant tobacco cultivars in Southern Brazil. *Plant Disease* 100, 1222-1231.

Bellafiore, S., Briggs, S. P. (2010) Nematode effectors and plant responses to infection. *Plant Biology*, 13, 442-448.

Brida, A. L., Castro, B. M., Zanuncio, J. C., Serrão, J. E., Wilcken, S. R. S. (2018). Oat, wheat and sorghum cultivars for the management of *Meloidogyne enterolobii*. *Nematology*, 20 (2), 170-173.

Costa, M. G. S., Correia E. C. S. S., Garcia M. J. D. M., Wilcken S. R. S. (2017). Resistance to root-knot nematodes on passion fruit genotypes in Brazil. *Phytoparasitica* 45, 325-331.

Curtis, R. H. C. (2007) Plant parasitic nematode proteins and the host-parasite interaction. *Briefings in Functional Genomics* 6, 50-58.

Davis E.L, Hussey RS, Baum TJ, Bakker J, Schots A, et al. (2000) Nematode parasitism genes. *Annual Review Phytopathology* 38, 365-96.

Daykin, M. E., Hussey, R. S. (1988). Staining and histopathological techniques in nematology. In K. R. Barker, C. C. Carter, & J. N. Sasser (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne* 39–48. Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biodani, 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.

Dorneles, K. R., Dallagnol, L. J., Pazdiora, P. C., Rodrigues, F. A., Deuner, S. (2017). Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 97, 69-78.

Dropkin, V. H. (1969). Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review Phytopathology* 7, 101-122.

- Fagerstedt, K.V., Kukkola, E. M., Koistinen, V.V., Takahashi, J., Marjamaa, K. (2010). Cell wall lignin is polymerised by class I secretable plant peroxidases in Norway spruce, J. I. *Plant Biology* 52, 186-194.
- Garg, N., Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys.* 143, 8-96.
- Giannopolitis C. N., Reis, S. K., (1997). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiological* 59, 309-314.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Huang, G., Dong, R., Maier T., Allen, R., Davis E. L., Baum T. J., Hussey R. S. (2004) Use of solid-phase subtractive hybridization for the identification of parasitism gene candidates from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology* 5, 217-222.
- Hussey, R. S.; Baker, K. R. A (1973). Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* species, including a new technique. *Plant Disease Report* 57, 1025-1028.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 27, 1853-1856
- Karszen, G.; Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In: Perry, R. N.; Moens, M. *Plant nematology*. 362, 59-90.
- 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.
- Liebthal M., Maynard D., Dietz K. J. (2018). Peroxiredoxins and redox signaling in plants. *Antioxidants Redox Signaling* 7, 609-624.
- 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.

- Mellersh, D. G., Foulds I. V., Higgins V. J., Heath M. (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *Plant Journal* 29, 257-268.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R., (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*. 33, 453-467.
- Miller, G. et al. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2, 1-10.
- Mitchum, M.G., Hussey, R. S., Baum, T. J., et al. . (2013). Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist* 199, 879-894.
- Mittler, R. (2016) ROS Are Good. *Trends in Plant Science* 20, 1-9.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.
- Molinari, S., Miagola C. (1997). Antioxidant Enzymes in Phytoparasitic Nematodes. *Journal of Nematology* 29, 153-159.
- Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., (1999). Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11, 137–143.
- Resende, M. L. V., Salgado S. M. L., Chaves Z. M. (2003). Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatologia brasileira* 28, 123-130.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress ful conditions. *Journal of Botany* 1-26.
- Singh, S., Anjum N.A., Khan N.A., Nazar R. Metal-binding peptides and antioxidant defence system in plants: significance in cadmium tolerance. In: N.A. Khan, S. Singh, (2008). *Abiotic Stress and Plant Responses*, IK International, *New Delhi* 159-189.
- Triantaphyllou, A. C., Hirschmann, H. (1960). Post infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annales de L'Institut Phytopathologique Benaki*, 3, 1-11.

Tripathy, B. C., Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1621-1633.

Waetzig GH, Sobczak M, Grundler FMW. (1999). Localization of hydrogen peroxide during the defence response of *Arabidopsis thaliana* against the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* 1, 681-686.

Williamson, V. M. (1999). Plant nematode resistance gene. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 327 – 331.

Williamson, V. M., Gleason, C. A. (2003). Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 327-333.

Williamson, V. M., Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *TRENDS in Genetics* 22, 396-403.

Zacheo, G., Bleve-Zacheo, T. (1988). Involvement of superoxide dismutases and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 313-322.

Zhang, J., Kirkham, M. B., (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist* 132, 361-373.

CAPÍTULO 3

COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLANTAS DE PIMENTÃO SOB INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO COMPATÍVEL E INCOMPATÍVEL DE *Meloidogyne enterolobii* E *M. incognita*

Resumo- Este estudo teve como objetivo avaliar se em algum momento da interação incompatível entre plantas de pimentão e *M. incognita*, há ativação do complexo enzimático antioxidativo, assim como em interações compatíveis. O experimento foi conduzido em câmara de BOD. O delineamento foi inteiramente casualizado, constituído por seis épocas de avaliação (2, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infestação) e duas espécies de *Meloidogyne* spp. (*M. enterolobii* e *M. incognita*), com quatro repetições. Porta enxertos de pimentão 'AF 8253' foram transplantadas para vasos de 0,5 L, contendo substrato autoclavada. Avaliou-se a penetração dos nematoides no sistema radicular e a atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e peroxidase nas folhas. As respostas antioxidativas foram expressas com maior intensidade na interação compatível envolvendo *M. enterolobii*. Já plantas infestadas com *M. incognita* apresentaram menor atividade das enzimas, sendo mais evidente no início da interação.

Palavras-chave: Interação planta-nematoide, nematoide-das-galhas, enzimas antioxidativas, reação de hipersensibilidade, resistência.

Abstract - The objective of this study was to evaluate whether at some point in the incompatible interaction between pepper plants and *M. incognita*, there is activation of the antioxidative enzymatic complex, as well as in compatible interactions. The experiment was conducted in a BOD chamber. The design was completely randomized, consisting of six evaluation periods (2, 7, 14, 21, 28 and 35 days after infestation) and two species of *Meloidogyne* spp. (*M. enterolobii* and *M. incognita*), with four replicates. Plants of chili 'AF 8253' were transplanted into 0.5 L vessels, containing autoclaved soil mix. The penetration of the nematodes in the root system and the enzymatic activity of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in the leaves were evaluated. Antioxidative responses were expressed with greater intensity in the compatible interaction involving *M. enterolobii*. However, plants

infested with *M. incognita* presented lower enzyme activity, being more evident at the beginning of the interaction.

Keywords: Plant-nematode interaction, root-knot nematode, antioxidative enzymes, hypersensitivity reaction, resistance.

3.1 Introdução

Interações planta-patógeno, sobretudo as que envolvem parasitas biotróficos, como o gênero *Meloidogyne*, são governadas por interações específicas, podendo ser compatíveis ou incompatíveis. O reconhecimento do alelo de avirulência pelo hospedeiro resistente resulta na interação incompatível. Neste caso, o nematoide não completa o ciclo, embora o desenvolvimento do início do local de alimentação já tenha sido estabelecido (Costa et al., 2017). Em hospedeiros suscetíveis, o nematoide completa o ciclo de vida, resultando em uma interação compatível, levando à doença.

A resistência de plantas é geralmente caracterizada pela reação de hipersensibilidade, a qual consiste na morte celular localizada nos tecidos vegetais no local da infecção, resultado da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Segundo Melillo et al. (2006), esta é a primeira reação da planta em resposta ao ataque de patógenos avirulentos ou virulentos (Sharma et al., 2012).

No momento em que nematoides juvenis infectantes de segundo estágio (J_2) penetram o sistema radicular, ocorre intensa produção de EROs, provavelmente resultado do dano mecânica nas células. Nos estádios posteriores, quando a infecção é bloqueada, no caso de interações incompatíveis, ocorre uma segunda explosão oxidativa associada à reação de hipersensibilidade. Em interações compatíveis, ocorre apenas uma explosão oxidativa (Melillo et al., 2006), quando posteriormente é ativado um complexo mecanismo de defesa antioxidativa.

A função primária do sistema antioxidante composto por componentes não enzimáticos e enzimáticos, é dismutar radicais livres presentes nas células vegetais. Os sistemas específicos de produção e eliminação de EROs podem ser encontrado em diferentes organelas, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Sharma et al., 2012). Na ausência de estresse, EROs são gerados em níveis baixos,

mantendo equilíbrio intracelular. Entretanto na presença de estresses ambientais adversos, é gerado um rápido aumento de EROs nos níveis intracelulares podendo induzir danos oxidativos a macromoléculas como lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos.

A fim de evitar o dano oxidativo, as plantas aumentam o nível de defesa antioxidante endógena. Entre os componentes enzimáticos responsáveis pela dismutação de radicais livres, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione e peroxirredoxina (PrxR) conforme Mittler et al. (2004). A SOD atua como primeira linha de defesa contra EROS, dismutando O_2^- e H_2O_2 . As enzimas APX e CAT são responsáveis por eliminar subsequentemente o H_2O_2 , gerando água. Em contraste com a CAT, a APX requer um sistema de regeneração que envolve a participação do ascorbato (Apel & Hirt, 2004).

A hipótese central do estudo é que as plantas podem desenvolver mecanismos de defesa devido à infecção por *Meloidogyne enterolobii* e *M. incognita*. Em algum momento da interação incompatível entre plantas de pimentão 'AF 8253' e *M. incognita*, poderá haver ativação do complexo enzimático antioxidativo, assim como interação compatível entre a mesma cultivar e *M. enterolobii*.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas, FCA/UNESP, Campus de Botucatu-SP. As análises da atividade enzimática foram conduzidas no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências – UNESP, Campus de Botucatu-SP.

Os nematoides utilizados como fonte de inóculo consistiram em juvenis infectantes de segundo estágio (J2) extraídos das raízes de tomateiro 'Rutgers'. O pimentão 'AF 8253', com suscetibilidade (*M. enterolobii*) e resistência (*M. incognita*) já comprovada em estudos prévios, foi utilizada como objeto de estudo das interações parasitas-hospedeiro.

Plantas jovens de pimentão foram cultivadas individualmente (n=4) em substrato autoclavado contendo solo, areia e matéria orgânica (1:2:1). Posteriormente, o substrato foi infestada com suspensão aquosa de 333 J2 de *M.*

enterolobii e 333 J2 de *M. incognita*. As plantas foram mantidas em câmara de BOD em temperatura de 26 °C com fotoperíodo de 12 h.

Aos 2, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a infestação (DAI), os sistemas radiculares foram lavados cuidadosamente para avaliação da penetração. As folhas foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer a -80 °C, para posterior avaliação da atividade enzimática.

O delineamento foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância seguido do teste de Tukey. Para avaliar o comportamento da atividade enzimática em função do tempo foi realizada a regressão linear dos dados. O software utilizado foi o Minitab 16 e considerou-se significativo quando $p < 0,05$.

3.2.1 Experimento de penetração

O sistema radicular foi submetido à coloração com fucsina ácida (McBeth et al., 1941 apud Daykin e Hussey 1988) e dissecadas sob microscópio estereoscópico, para avaliação do desenvolvimento dos nematoides. A classificação das fases foi feita de acordo com Triantaphyllou e Hirschmann (1960) como: juvenil infectantes de segundo estágio que não induziu as células alimentadoras (J2a); juvenil de segundo estágio que induziu as células alimentadoras (J2b); juvenil de terceiro estágio que se formou após a segunda ecdise e é desprovido de estilete (J3); juvenil de quarto estágio formado após a terceira ecdise, por semelhança foi considerado (J3)/(J4); fêmeas sem ovos (F1) e fêmeas com ovos (F2). O número de juvenis dos diferentes estádios de desenvolvimento foi contabilizado nas seis épocas de coleta (2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI).

3.2.2 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e peroxidase (POD)

O extrato foliar para analisar a atividade de cada enzima foi obtido pela maceração de 300 mg de tecido vegetal em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0.1 M a pH 6,8, suplementado com 200 mg de PVPP. O homogenato foi centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C, retirando-se em seguida o sobrenadante que foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, E.C 1.15.1.1) foi determinada pelo método descrito por Giannopolitis e Ries (1977) com modificações. A reação foi conduzida em placas de ELISA com capacidade de 3mL, adicionando 5 μ L do extrato foliar a 2.995 μ L do meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7,8, EDTA 0,1 μ M, azul de nitrotetrazólio cloreto (NBT) 75,0 μ M, metionina 13,0 mM e riboflavina 2,0 μ M. As placas foram dispostas em câmara escura com luz fluorescente de 15 W por 10 minutos. Ao término do tempo, a iluminação foi interrompida e o azul de formazana formado pela fotorredução do NBT foi determinado em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) na absorvância de 560 nm. Os tubos considerados brancos (para zerar o aparelho) receberam 3mL do meio de reação, porém foram mantidos no escuro. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em UI de SOD mg^{-1} de proteína.

A atividade da enzima catalase (CAT, E.C 1.11.1.6) foi obtida utilizando 50 μ L do extrato foliar em 950 μ L de tampão fosfato de potássio 50 mM a pH 7,0, suplementado com H_2O_2 12,5 mM. A reação foi monitorada em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) a 240 nm, considerando a variação de absorção no intervalo de 8 a 40 segundos, sendo a atividade da enzima calculada pelo coeficiente de extinção molar $\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{kat } \mu\text{g}^{-1}$ proteína (Peixoto et al., 1999).

A atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada utilizando 100 μ L do extrato foliar em 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM a pH 6,8, contendo Pyrogallol 20 mM e H_2O_2 20 mM. Após a incubação por 1 min a reação foi paralisada com 0,5 mL de ácido sulfúrico 5%. As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-2700, Kyoto, Japão) a 420 nm. A atividade da enzima foi calculada pelo coeficiente de extinção molar $\epsilon = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\text{kat } \mu\text{g}^{-1}$ proteína (Peixoto et al., 1999).

3.3 Resultados

3.3.1 Penetração de *M. incognita* e *M. enterolobii*

Aos 14 DAI das plântulas com *M. incognita* J2a foram encontradas em raízes de pimentão 'AF 8253' e tomateiro (Figuras 1 e 2). No entanto, no tomateiro os juvenis já haviam atingido o estágio J2b aos dois DAI. A penetração de juvenis em plântulas de pimentão 'AF 8253' foi limitada ao longo do experimento, onde o último estágio encontrado foi de J2b aos 21 DAI. Em contraste, nas raízes de tomateiro, fêmeas (F1) já foram observadas aos 14 DAI e em seguida, desenvolvido para fêmeas com ovos (F2) em 28 DAI a 35 DAI. Nenhum ciclo completo foi observado em plântulas de pimentão 'AF 8253', embora *M. incognita* tenha conseguido penetrar nas raízes (Figura 1).

Figura 1. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne incognita* após inoculação de 333 indivíduos em pimentão 'AF 8253' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação 2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI. J2a: juvenil infectantes de segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.

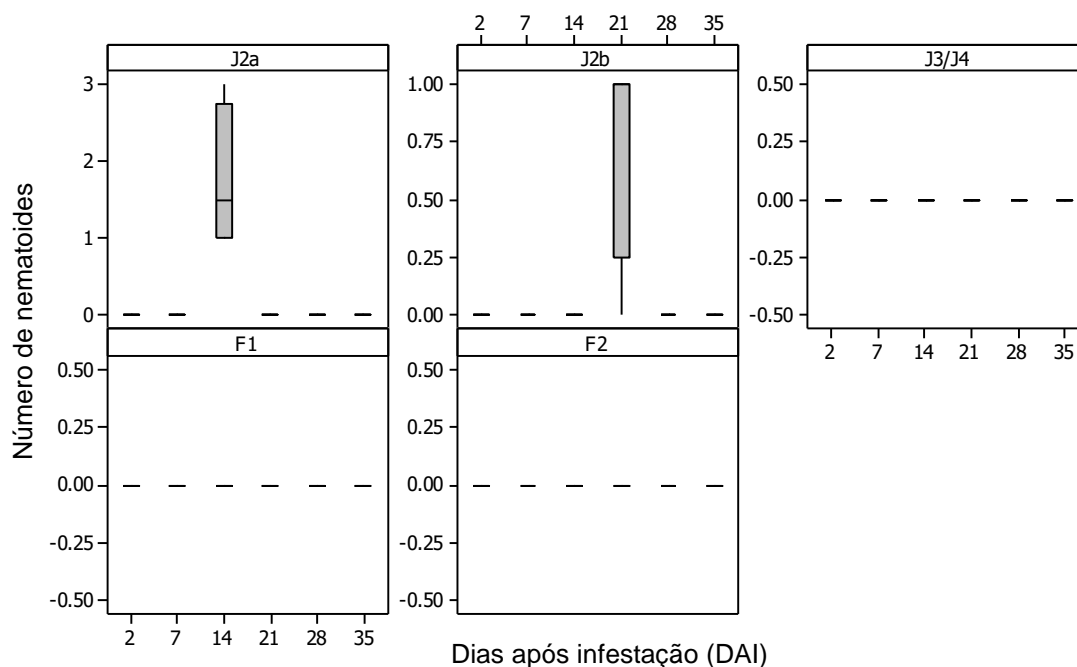
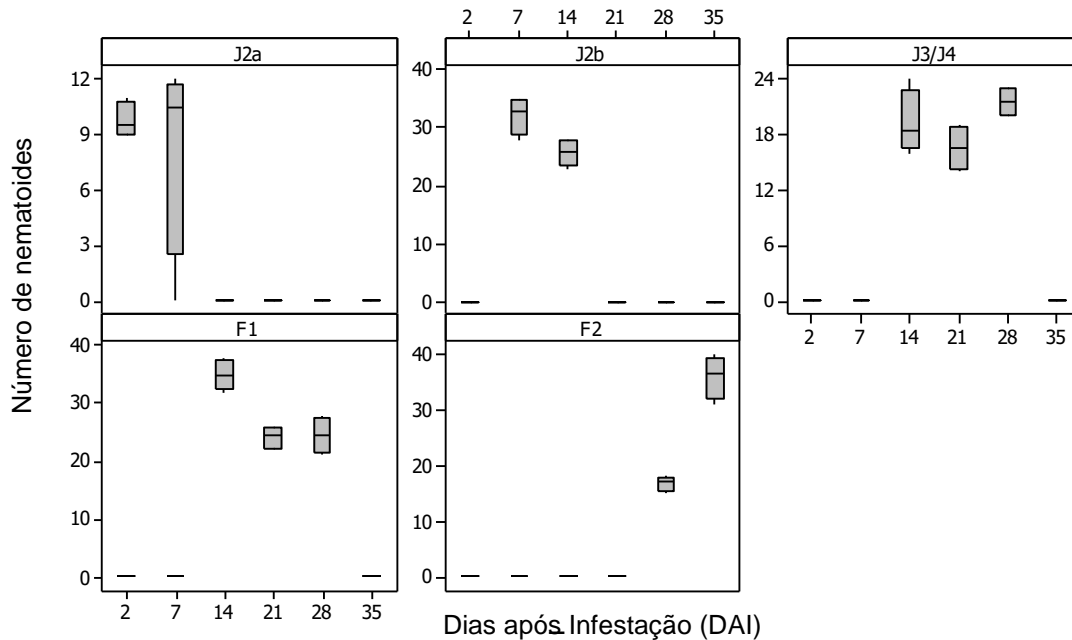


Figura 2. Diferentes fases de desenvolvimento de *M. incognita* após inoculação de 333 indivíduos em tomateiro 'Rutgers' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação 2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI. J2a: juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



Ao avaliar o ciclo de vida de *M. enterolobii* em plântulas de pimentão 'AF 8253', observou-se que aos dois DAI, indivíduos J2a haviam penetrado o sistema radicular, similar ao observado em tomateiro 'Rutgers' (Figuras 3 e 4). Aos sete DAI, verificou-se dois estádios de desenvolvimento, J2a e J2b. Embora com menor número de indivíduos, aos 14 DAI já foi possível detectar fêmeas sem ovos (F1) nas plântulas de pimentão (Figura 3), assim como no tomateiro (Figura 4). Aos 28 DAI, nematoides já havia completando o ciclo de vida em ambos os cultivares avaliados, demonstrando desta maneira a suscetibilidade das cultivares e viabilidade do inóculo.

Figura 3. Diferentes fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* após inoculação de 333 indivíduos em pimentão 'AF 8253' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação 2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI. J2a: juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.

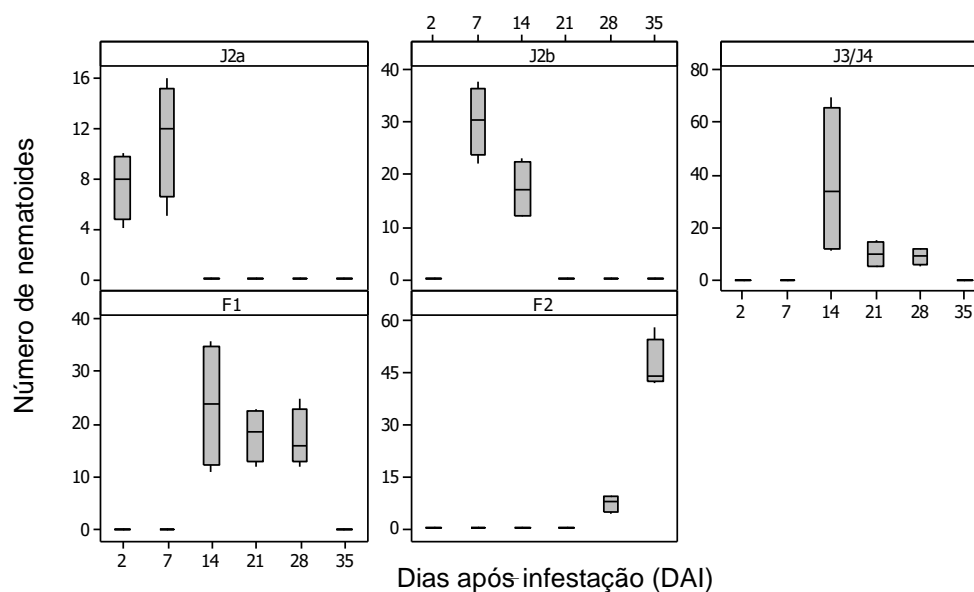
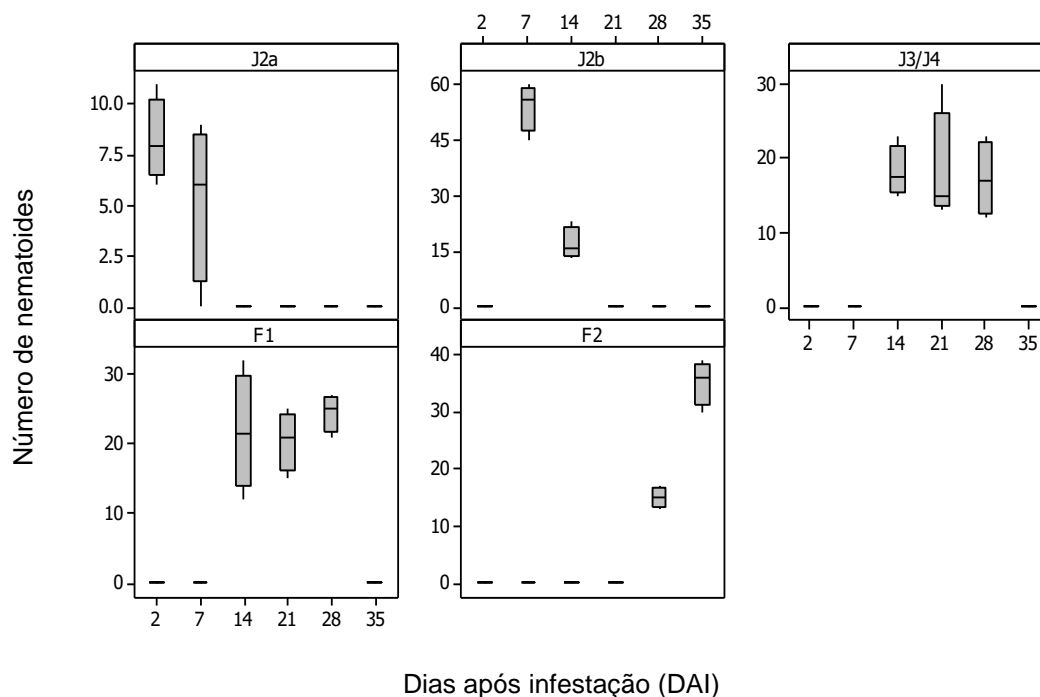


Figura 4. Diferentes fases de desenvolvimento de *M. enterolobii* após inoculação de 333 indivíduos em tomateiro 'Rutgers' mantidos a 26 °C em seis períodos de avaliação 2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI. J2a: Juvenil infectantes do segundo estágio que não induziu as células alimentares; J2b: juvenil parasitário de segundo estágio que induziu as células de alimentação; J3/J4: juvenil de terceiro e quarto estágio; F1: fêmeas sem ovos e F2: fêmeas com ovos.



3.3.2 Atividade enzimática

Verificou-se influência na atividade das enzimas antioxidativas SOD, POD e CAT em plantas submetidas aos tratamentos com *M. enterolobii* e *M. incognita*. As plantas infestadas com *M. enterolobii* apresentaram maior nível atividade para todas as enzimas estudadas (Figura 6, 7 e 8), atribuído à suscetibilidade da cultivar à *M. enterolobii* (Figura 3).

Aos 14 DAI a atividade da SOD em folhas foi de 1,5 UI $\mu\text{g Proteína}^{-1}$ para plantas infestadas com *M. enterolobii*, diferenciando estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1). Plantas de pimentão infestadas com *M. incognita* (21 DAI) também apresentaram atividade da SOD, ao comparar com plantas não infestadas, mantendo a atividade até aos 28 DAI. Nesta fase alguns indivíduos J2 penetraram o sistema radicular, embora sem completar ciclo vital. O mesmo ocorreu com plantas infestadas com *M. enterolobii*.

A enzima POD apresentou diferença estatística a partir de 14 DAI em plantas suscetíveis a *M. enterolobii*, quando comparado aos demais tratamentos. Já plantas infectadas com *M. incognita*, apenas aos 35 DAI houve diferença estatística quando comparadas a plantas não infestadas (Tabela 1).

A atividade da CAT nas folhas teve início aos dois DAI para o tratamento com *M. enterolobii*, diferenciando dos demais tratamentos em todas as coletas avaliadas (Tabela 1). Plantas infestadas com *M. incognita* apresentaram diferença estatística de plantas controle, onde aos sete DAI a atividade foi de 103,8 e 46,5 $\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$ e aos quatorze DAI 135,7 e 53,7 $\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Proteínas solúveis e atividade da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) em plantas de pimentão 'AF 8253' sob infestação *M. incognita* e *M. enterolobii* em seis períodos (2, 7, 14, 21, 28 e 35 DAI).

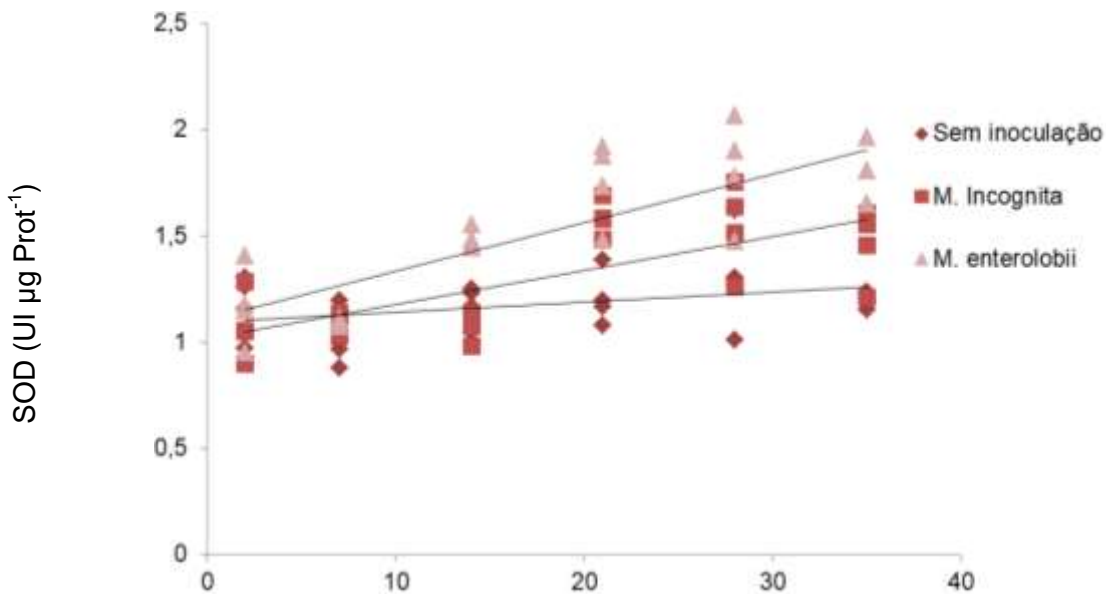
	SOD (UI µg Proteína ⁻¹)					
	2 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	35 DAI
Sem infestação	1,2 A	1,0 A	1,2 B	1,2 B	1,3 B	1,2 A
<i>M. incognita</i>	1,2 A	1,1 A	1,1 B	1,6 A	1,5 AB	1,6 A
<i>M. enterolobii</i>	1,1 A	1,1 A	1,5 A	1,8 A	1,8 A	2,1 A
	POD (µKat µg Prot ⁻¹)					
	2 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	35 DAI
Sem infestação	436,5 A	416,1 A	446,6 B	452,7 B	311,5 B	390,9 B
<i>M. incognita</i>	470,9 A	534,5 A	514, AB	355,9 B	435,2 B	749,0 A
<i>M. enterolobii</i>	514,4 A	563,0 A	642,7 A	727,7 A	714,2 A	551,8 AB
	CAT (µKat µg Prot ⁻¹)					
	2 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	35 DAI
Sem infestação	63,4 B	46,5 C	53,7 C	160,6 B	54,8 B	68,9 B
<i>M. incognita</i>	72,6 B	103,8 B	135,7 B	148,3 B	59,0 B	65,5 B
<i>M. enterolobii</i>	113,0 A	262,9 A	224,8 A	301,4 A	267,2 A	367,3 A

Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.3 Avaliação enzimática temporal

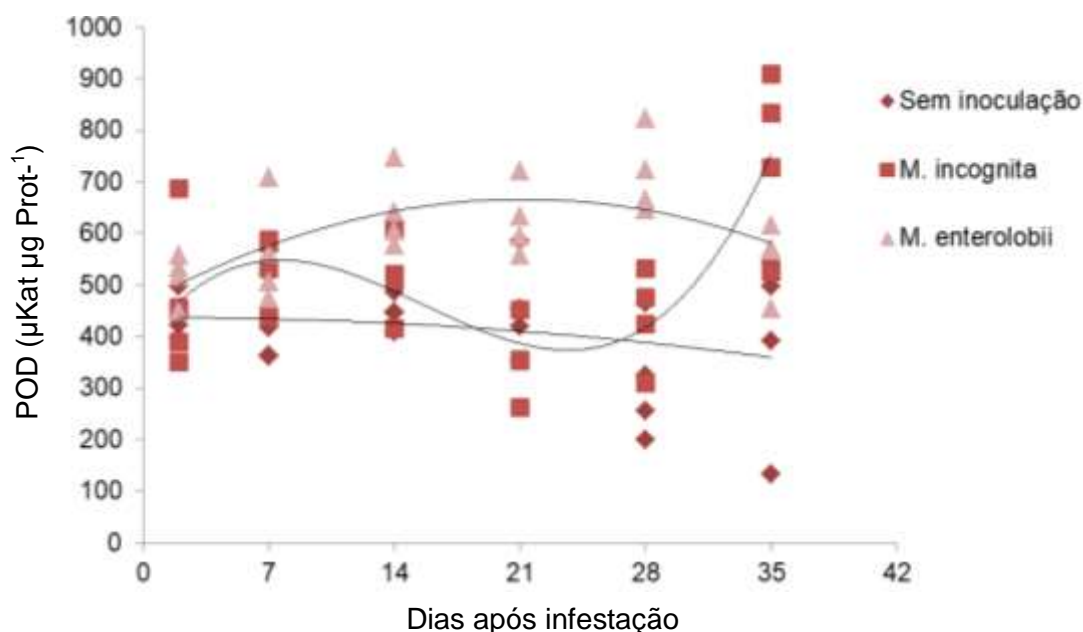
O comportamento da atividade da SOD foi semelhante, tanto para plantas infectadas com *M. incognita* (resistente), quanto *M. enterolobii* (suscetível). A partir de dois DAI, verificou-se aumento constante da atividade enzimática em ambos os tratamentos, exceto na ausência do nematoide. Plantas infectadas com *M. enterolobii*, apresentaram atividade superior, com valor máximo aos 35 DAI, com média de 2,1 UI de SOD mg⁻¹ proteína. Já plantas infestadas *M. incognita*, embora com menor atividade da enzima, aos 35 DAI a SOD apresentou 1,6 UI. Este efeito foi semelhante à das plantas suscetíveis a *M. enterolobii*. No geral, houve aumento da atividade da SOD nas folhas, em ambas as situações de suscetibilidade e resistência aos fitoparasitas avaliados (Figura 5).

Figura 5. Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em plantas de pimentão 'AF 8253' infestadas com *M. incognita* e *M. enterolobii* (♦ sem inoculação, ■ *M. incognita*, ▲ *M. enterolobii*) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



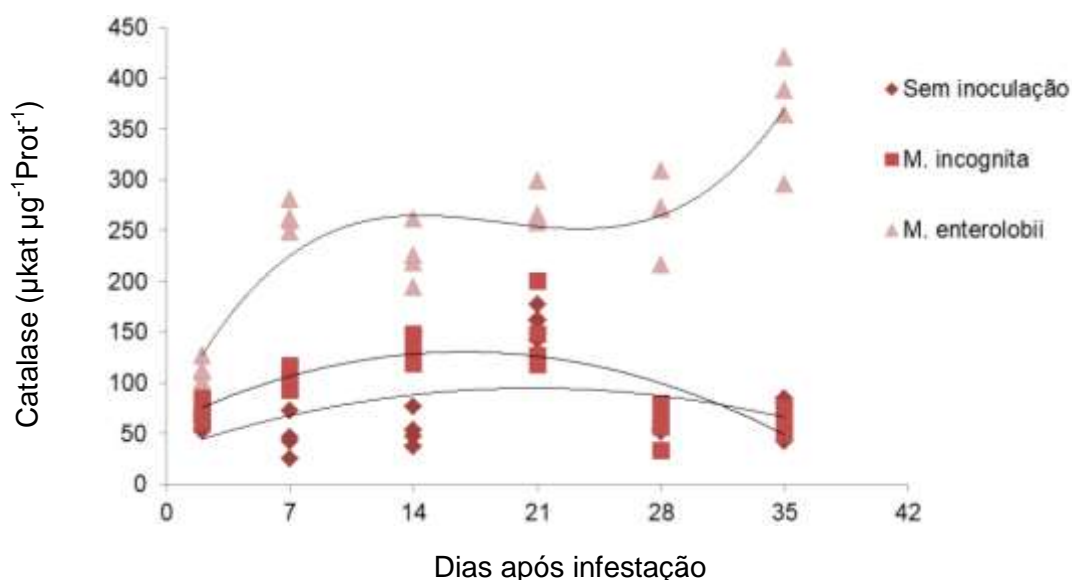
Para plantas não infectadas, não houve variação importante da atividade da enzima POD no tempo (Figura 6). No intervalo de dois a sete DAI, verificou-se aumento da atividade enzimática em ambos os tratamentos. Posteriormente, plantas que foram infestadas com *M. enterolobii* mantiveram os níveis da peroxidase, com valor máximo de 727,7 µkat µg⁻¹ de proteína (21 DAI). Já as plantas infestadas com *M. incognita*, a partir de sete DAI, houve queda da atividade POD, com menor valor aos 21 DAI (355,9 µkat µg⁻¹ de proteína). Entretanto, a partir de 28 DAI verificou-se contínuo aumento da atividade desta enzima, com valor máximo de 749,0 µkat µg⁻¹ de proteína (35 DAI), como ilustrado na figura 6.

Figura 6. Atividade da peroxidase (POD) em plantas de pimentão 'AF 8253' infestadas com *M. incognita* e *M. enterolobii* (♦ sem inoculação, ■ *M. incognita*, ▲ *M. enterolobii*) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



A atividade da CAT em plantas infectadas com *M. enterolobii*, aumentou em função do tempo no início do cultivo até sete DAI, manteve-se estável entre 14 e 28 DAI, voltando a subir até 35 DAI no final do ensaio. A infestação com *M. incognita* não provocou acréscimos importantes na atividade da CAT, com valor máximo de $148,3 \mu\text{kat } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína. O mesmo aconteceu com plantas não inoculadas ($160,6 \mu\text{kat } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) como demonstrado na figura 7.

Figura 7. Atividade da Catalase (CAT) em plantas de pimentão 'AF 8253' infestadas com *M. incognita* e *M. enterolobii* (♦ sem inoculação, ■ *M. incognita*, ▲ *M. enterolobii*) durante fase inicial de desenvolvimento. Botucatu, SP, 2015.



3.4 Discussão

No segundo estágio, *Meloidogyne* spp. é responsável pela busca do hospedeiro e principalmente pelo estabelecimento do sítio de alimentação, formado pelas células nutridoras no cilindro vascular (Costa et al., 2017). Esta invasão resulta na hipertrofia e hiperplasia sem citocinese das células, devido às substâncias injetadas pelo nematoide, às chamadas efetoras. A ação das moléculas presentes nessa secreção é primordial para facilitar do parasitismo, já que muitas destas substâncias são homólogas às produzidas pelos hospedeiros no processo de defesa. Além disso, Dutta et al. (2011) relatam o papel das substâncias químicas secretadas pelas raízes das plantas, como moléculas ligadas à regulação do movimento dos nematoides em direção a hospedeiros específicos, caracterizando a interação como compatível ou incompatível.

Em relação à penetração dos nematoides, poucos indivíduos de *M. incognita* foram capazes de penetrar raízes de pimentão 'AF 8253' comparado ao tomateiro. Além disso, os indivíduos que conseguiram penetrar o sistema radicular não completaram o ciclo de vida. Possivelmente isso está relacionado ao mecanismo de resistência desenvolvido pelo hospedeiro, com objetivo de bloquear a penetração e/ou a atratividade de J2 (Costa et al., 2017). Uma resposta de resistência semelhante foi observada em mostarda (*Rapistrum rugosum*) parasitadas com *M. incognita* (Curto et al., 2005) e em plantas de maracujá 'FB 200' infestadas com *M. enterolobii* (Costa et al., 2017) no qual J2 foi incapaz de se desenvolver e completar seu ciclo de vida. Segundo Faske (2013), o primeiro efeito da resistência é a redução da penetração, posteriormente o bloqueio do estabelecimento do J2 na formação do local de alimentação e por último o atraso no desenvolvimento do nematoide para atingir a maturidade.

Meloidogyne enterolobii completou seu ciclo de vida aos 28 DAI, sendo que aos dois DAI alguns indivíduos já haviam penetrado o sistema radicular de plântulas de pimentão 'AF 8253'. Em conformidade com Karssen e Moens, (2006), situações em que o hospedeiro é suscetível, o nematoide completa o ciclo de vida com formação normal do local de alimentação, conseguindo se desenvolver rapidamente, com reprodução bem sucedida. O contrário ocorre com hospedeiro resistente, embora o início do local de alimentação seja frequentemente relatado.

Verificou-se que plantas submetidas aos tratamentos com *M. incognita* e *M. enterolobii* apresentaram variações na atividade das enzimas antioxidativas SOD, POD e CAT. De acordo com Huang et al. (2004), a reação inicial de cultivares suscetíveis são geralmente semelhantes às resistentes, possivelmente resultado das substâncias secretadas pelos nematoides nos tecidos vegetais no início da interação.

A partir de 14 DAI a atividade da SOD foi detectada em plantas infestadas com *M. enterolobii*. Já as plantas infestadas com *M. incognita* só apresentaram atividade significativa de 21 aos 28 DAI, conjuntamente, com o estádio J2b parasitando o sistema radicular, ainda que em poucos indivíduos. Esta interação pode parecer justificar a ativação de defesa da planta em diferentes momentos, quando detectada ou não a resistência. Levine et al. (1994) argumentam que durante a interação compatível apenas um pico intenso de EROs ocorre nas plantas, atuando desta forma como ativador de genes codificadores, como superóxido dismutase, uma das enzimas que dismuta radicais livres nas células. Vários genes que codificam as SOD também foram descobertos em nematoides-das-galhas, evidenciando a produção de enzimas homólogas as do hospedeiro e caracterizando a tentativa de um parasitismo bem sucedido (Molinari & Miagola 1997; Bellafiore & Briggs, 2010). Já em interação incompatível, como no caso de *M. incognita* e plantas de pimentão 'AF 8253', dois picos de EROs ocorreram após a detecção do nematoide pela planta, ativando a resposta de hipersensibilidade com consequente morte célula e bloqueio do parasitismo.

Os resultados diferiram quando a enzima POD apresentou diferença estatística a partir de 14 DAI em plantas suscetíveis a *M. enterolobii*, quando comparado aos demais tratamentos. Isso ocorre com objetivo de manter o equilíbrio entre a produção e dismutação de EROs (Sharma et al., 2012). No presente estudo, POD apresentou atividade no momento do estabelecimento e formação do local de alimentação no cilindro vascular por indivíduos de *M. enterolobii* no estádio J2 e J3/J3. Em estudo realizado por Ashry & Mohamed (2012), plantas infectadas com oídio, também apresentaram aumento significativo nas atividades de POD e CAT nas folhas após a infecção.

A atividade da catalase nas folhas teve início aos dois DAI em plantas suscetíveis à *M. enterolobii*, diferenciando dos demais tratamentos em todos os momentos avaliados. Entre as enzimas com papel antioxidativo, a CAT foi a primeira

a ser descoberta e caracterizada, com função de catalisar a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio (Sharma et al., 2012). Nesse sentido, quando as plantas em nível celular detectam o estresse e imediatamente produzem H_2O_2 , esta enzima atua degradando de maneira eficiente tais radicais. Portanto, há o aumento ou o esgotamento da atividade da CAT, embora dependa da intensidade, duração e tipo de estresse (Moussa & Abdel-Aziz, 2008). Justificando a produção desta enzima apenas aos sete DAI com posterior queda aos 14 DAI em plantas resistentes à *M. incognita*.

A análise da atividade temporal indicou aumento constante da atividade da SOD em ambos os tratamentos a partir de dois DAI, exceto na ausência do nematoide. Plantas infectadas com *M. enterolobii*, apresentaram atividade superior. Esta enzima pertence ao grupo das metaloenzimas e catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 , desempenhando desta forma, papel central na defesa contra o estresse oxidativo. De acordo com Sharma et al., (2012) o aumento da atividade da SOD é correlacionado com o aumento da tolerância da planta contra estresses abiótico e biótico, atuando como umas das primeiras linhas de defesa enzimática (Dorneles et al., 2017).

No início da infestação dos nematoides, verificou-se aumento da atividade POD em ambos os tratamentos. Possivelmente, resultado da produção imediata de EROs quando detectada a presença do parasita, com posterior sinalização para produção desta enzima. Em conformidade com Melillo et al., (2006), embora um nematoide que infecta a raiz cause poucos danos à medida que migra entre as células, isso é no estágio J2, a superprodução de EROs pode ser detectada, o que torna dinâmica a expressão de enzimas antioxidativas. As plantas resistentes à *M. incognita* aos 28 DAI apresentaram aumento da atividade da POD. Esses resultados corroboram com estudo de Sharma et al., (2012) que verificaram o aumento pronunciado da POD em plantas tolerantes quando comparado às suscetíveis.

A enzima catalase só apresentou aumento de atividade em plantas suscetíveis a *M. enterolobii*, indicando que esta enzima possivelmente possui importante papel no controle de EROs gerados nas interações compatíveis. Catalase é uma das principais enzimas de dismutação do H_2O_2 , atuando principalmente nos peroxissomos, embora possa ser encontrada nos glioxissomos, citosol e mitocôndrias. É importante ressaltar que as plantas possuem várias isoformas de CAT, sendo mais efetiva em concentrações relativamente altas de

H₂O₂ nas células (Sharma et al., 2012), por isso são consideradas indispensáveis em condições de estresse severo, como no caso de plantas suscetíveis a *Meloidogyne* spp.

3.5 Conclusão

Meloidogyne incognita não completou o ciclo de vida, embora alguns indivíduos tenham penetrado o sistema radicular da cultivar avaliada, comprovando a resistência ao nematoide;

Quando as plantas foram submetidas a interações compatíveis e incompatíveis desenvolveram diferentes respostas enzimática antioxidativas, em função da infecção por *Meloidogyne* spp.

As respostas antioxidativas foram expressas com maior intensidade na interação compatível envolvendo *M. enterolobii*.

Quando infestada com *M. incognita* as plantas apresentaram menor atividade das enzimas, sendo mais evidente no início da interação, quando indivíduos de J2 penetravam o sistema radicular, na busca da formação do local de alimentação.

3.6 Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PELD), e a Universidade Estadual Paulista (UNESP) Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Departamento de Proteção Vegetal e ao Departamento de Química e Bioquímica, pelo financiamento e suporte.

Referências

Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.

Ashry, N. A., Mohamed, H. I. (2012). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, 11, p. 1073–1077.

Bellafiore, S., Briggs, S. P. Nematode effectors and plant responses to infection. *Plant Biology*, v. 13, p. 442–448, 2010.

Costa, M. G. S., Correia E. C. S. S., Garcia M. J. D. M., Wilcken S. R. S. (2017) Resistance to root-knot nematodes on passion fruit genotypes in Brazil. *Phytoparasitica* 45, 325-331.

Curto, G., Dallavalle, E., Lazzeri, L. (2005). Life cycle duration of *Meloidogyne incognita* and host status of Brassicaceae and Capparaceae selected for glucosinolate content. *Nematology*, 7, 203–212.

Da Silva, M.C.L., Santos, C.D.G. Da Silva, G.S. (2016). Species of *Meloidogyne* associated with vegetables in micro regions of the State of Ceará. *Revista Ciência Agronômica* 47, 710-719.

Daykin, M. E., & Hussey, R. S. (1988). Staining and histopathological techniques in nematology. In K. R. Barker, C. C. Carter, & J. N. Sasser (Eds.), *An advanced treatise on Meloidogyne* (pp. 39–48). Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biodani, 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.

Dorneles, K. R., Dallagnol, L. J., Pazdiora, P. C., Rodrigues, F. A., Deuner, S. (2017) Silicon potentiates biochemical defense responses of wheat against tan spot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 97, 69-78.

Dropkin, V. H. (1969). Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review Phytopathology* 7, 101-122.

Faske, T. R. (2013). Penetration, post-penetration development, and reproduction of *Meloidogyne incognita* on *Cucumis melo* var. *texanus*. *Journal of Nematology*, 45, 58–65.

Giannopolitis C. N., Reis, S. K., (1997). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiological* 59, 309-314.

Huang G, Dong R, Maier T, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS. (2004). Use of solid-phase subtractive hybridization for the identification of parasitism gene

candidates from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology* 5, 217–222.

Karssen, G., Moens, M. (2006). Root-knot nematodes. In R. N. Perry & M. Moens (Eds.), *Plant nematology* (pp. 59–90). Wallingford: CAB International.

Le Guerroué, J., Douillard, R., Cereda, M. P., Chiarello, M. D., (1996). As proteínas de folhas de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. *B. Ceppa* 14, 133–148.

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.

Molinari, S., Miagola C. (1997). Antioxidant Enzymes in Phytoparasitic Nematodes. *Journal of Nematology* 29, 153-159.

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.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.

Moussa, R., Abdel-Aziz, S. N. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crop Sciences* 1, 31–36.

Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'anna, R., Mosquim, P. R., Moreira, M.A., (1999). Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11, 137–143.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress ful conditions. *Journal of Botany* 1–26.

Triantaphyllou, A. C., Hirschmann, H. (1960). Post infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annales de L'Institut Phytopathologique Benaki* 3, 1-11.

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 gene. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 327 – 331.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No geral, os resultados sugerem que a produção e o acúmulo de EROs na interação compatível planta-nematóides, podem formar uma unidade de sinalização de defesa do hospedeiro, de acordo com o aumento populacional e tempo de exposição ao parasitismo. Entretanto, nenhum mecanismo único de defesa é comprovado, considerando o complexo sistema envolvido nas interações (compatíveis e incompatíveis), desde a reação de hipersensibilidade até a atividade de enzimas antioxidantes responsáveis por dismutar radicais livres.

O gênero *Meloidogyne* caracterizado pela capacidade de contornar resistência do hospedeiro, também devem ser detalhadamente analisados a nível bioquímico, a exemplo, o estudo da atividade de enzimas antioxidantes homólogas as do hospedeiro, atuando como linha de defesa contra EROS, dismutando $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Portanto, investigações adicionais abordando outras vias de sinalização, que contribuam com a regulação do acúmulo de EROs e modulam a expressão de genes relacionados à defesa vegetal, são necessárias para melhor compreensão da interação.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. et al. On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne ulmi* Palmisano & Ambrogioni, 2000 (Nematoda, Meloidogynidae). **Zoo Keys**, v. 362, p. 1–27, 2013.
- BELLAFFIORE, S.; BRIGGS, S. P. Nematode effectors and plant responses to infection. **Plant Biology**, v. 13, p. 442–448, 2010.
- CARNEIRO, R. M. D. G. et al. Primeiro registro de *Meloidogyne enterolobii* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à *Meloidoginose* no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 30 n.1, p. 81-86, 2006.
- COSTA, M. G. S. et al. Resistance to root-knot nematodes on passion fruit genotypes in Brazil. **Phytoparasitica** v. 45, p. 325-331, 2017.
- DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatões and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, v. 59, p. 1632-1637, 1969.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemistry** v. 48, p. 909–930, 2010.
- HEYNO, E. et al. Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. **Planta** v. 234, p. 35-45, 2011.
- LEVINE, A. et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** v. 79, p. 583–593, 1994.
- LIEBTHAL M. et al. Peroxiredoxins and redox signaling in plants. **Antioxidants Redox Signaling** v. 7, p. 609-624, 2018.
- MELILLO, M. T. et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. **New Phytologist** v. 170, p. 501–512, 2006.
- MILLIGAN, S. B. et al. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1307–1319, 1998.
- MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**. v. 20, p. 1-9, 2016.

MITTLER, R. et al. ROS signaling: the new wave?. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 300–309, 2011.

MITTLER, R., et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science** v. 9, p. 490–498, 2004.

PINHEIRO J. B. et al. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em *Capsicum* spp. **Nematologia Brasileira**, v. 37, p. 1-2, 2013.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p. 995 – 1014, 2005.

SHAH, K. et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, v. 161, n. 6, p. 1135–1144, 2001.

SHARMA P.; DUBEY, R. S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. **Plant Cell Reports**, v. 26, n^o. 11, p. 2027–2038, 2007.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress ful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SIDDIQUE S. et al. Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. **Science Signaling**, v. 7, p. 320 ra33, 2014

VOS, P. et al. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**. v. 16, p. 1365–1369, 1998.

WILLIAMSON V. M.; GLEASON C. A. Plant–nematode interactions. **Plant Biology**, v. 6, p. 327–333, 2003.

WILLIAMSON, V. M. Plant nematode resistance gene. **Current Opinion in Plant Biology** v. 2, p. 327 – 331, 1999.

ZACHEO G.; BLEVE-ZACHEO T. Involvement of superoxide dismutases and superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to

Meloidogyne incognita attack. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 32, p. 313–322, 1988.

ROZE E. et al. Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. **Molecular Plant Pathology** v.1 p. 1–10, 2008.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: North Carolina State University. 1978.

SIDDIQUI, L. A. Histopathogenesis of galls induced by *Meloidogyne naasi* in oat roots, **Nematologica** v. 17, p. 237-242, 1971.