

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
04/11/2020.

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 Agrônomicas, 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.

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 ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxílico ($\text{OH}\cdot$) 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.

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.

das células contra o estresse oxidativo, pela degradação direta do H₂O₂ (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.

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.