

**PATRÍCIA MEIRIELE MARINI**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AVEIA BRANCA E *Meloidogyne incognita*:  
PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL**

**Botucatu**

**2018**





**PATRÍCIA MEIRIELE MARINI**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AVEIA BRANCA E *Meloidogyne incognita*:  
PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL**

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

Orientadora: Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken

Co-orientadora: Dra. Andressa Cristina Zamboni Machado

**Botucatu**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M339e Marini, Patrícia Meiriele, 1991-  
Estudo da interação entre aveia branca e *Meloidogyne incognita*: patogenicidade e expressão gênica diferencial / Patrícia Meiriele Marini. - Botucatu: [s.n.], 2018  
95 p.: il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018  
Orientador: Silvia Renata Siciliano Wilcken  
Coorientador: Andressa Cristina Zamboni Machado  
Inclui bibliografia

1. *Avena sativa*. 2. *Meloidogyne incognita*. 3. Nematoda em plantas - Controle. 4. Pragas agrícolas. I. Wilcken, Silvia Renata Siciliano. II. Machado, Andressa Cristina Zamboni. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Ficha elaborada por : Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE AVEIA BRANCA E *Meloidogyne incognita*:  
PATOGENICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

**AUTORA: PATRÍCIA MEIRIELE MARINI**

**ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN**

**COORIENTADORA: ANDRESSA CRISTINA ZAMBONI MACHADO**

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

Profa. Dra. ANDRESSA CRISTINA ZAMBONI MACHADO  
Nematologia / Instituto Agronômico do Paraná

Profa. Dra. NEUSIMARA RODRIGUES RIBEIRO  
Proteção de Plantas / GDM Seeds

Prof. Dr. KLEVER MARCIO ANTUNES ARRUDA  
Melhoramento Genético / IAPAR Londrina

Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA  
Depto de Proteção Vegetal / FCA/UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE  
Depto de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 02 de maio de 2018



## ***Dedico***

*À minha mãe, Maria José Ferreira Marini, pelo exemplo de coragem e, sobretudo, por sempre acreditar nos meus objetivos e me incentivar a seguir em frente.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder forças e sabedoria para finalizar mais esta etapa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP/ FCA e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pela oportunidade concedida para a realização do Curso de Doutorado.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela oportunidade de realizar este trabalho e disponibilizar a bolsa de estudo.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Proteção de Plantas, pelas importantes contribuições para minha formação profissional.

À toda equipe do laboratório de Nematologia, Biotecnologia e Bacteriologia do Departamento de Proteção Vegetal da UNESP- FCA e do IAPAR - Londrina, pela disponibilização de equipamentos, reagentes e por toda ajuda prestada. Em especial ao Dr. Juarez Pires Tomaz, pela atenção e suporte essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e ao Santino Aleandro da Silva pelo apoio experimental e análises estatísticas.

Aos meus amigos com quem pude conviver neste período, por toda contribuição, ensinamentos, convivência, risadas e incentivos, fazendo diferença no meu dia a dia, tornando-o muito mais agradável. Eu não teria conseguido sem vocês ao meu lado, vocês foram, em muitos momentos, minha segunda família!

À Profa. Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken, pela orientação, confiança, ensinamentos e carinhos transmitidos, fundamentais tanto para a realização desse trabalho como para o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, Andressa Cristina Zamboni Machado, pela amizade, confiança, apoio e tempo dedicado em todas as atividades desenvolvidas. Por todos conselhos e experiências imprescindíveis para formação da minha vida profissional, ao longo de todo período em que trabalhamos juntas. Muito obrigada por tudo!

Ao meu companheiro, Rodrigo Cabral do Amaral, por estar sempre ao meu lado, pelo incentivo desde o começo desta caminhada, apoio, força e paciência. Enfim, por ser meu porto seguro sempre. Te amo!

O meu maior agradecimento à minha família pela dedicação, amor e apoio incondicional nessa empreitada. Muito obrigada pelas orações, por terem acreditado e me incentivado, que a educação é um componente fundamental para a formação das pessoas. Vocês sempre foram minha força motriz e, por isto, esta vitória é de vocês pai, mãe, Dalto, Elle e minhas princesinhas - Sofia e Olivia.

Enfim, a cada um de que de alguma forma contribuiu direta ou indiretamente para que pudesse chegar até aqui e crescer como pessoa e profissional, **MUITO OBRIGADA!**



## RESUMO

*Meloidogyne incognita* é considerado um dos nematoides de maior importância econômica em termos mundiais. Para seu adequado manejo, uma das estratégias mais eficientes é o uso de cultivares resistentes. Portanto, estratégias para otimizar os programas de melhoramento genético são necessárias. A análise de expressão gênica tem ampliado a compreensão dos mecanismos de interação planta-nematoide e acelerado o desenvolvimento de genótipos resistentes. A cultivar de aveia branca IPR Afrodite, resistente a *M. incognita*, e cultivares suscetíveis foram avaliadas em relação à sua tolerância a este nematoide, além de ter sido estudado o comportamento de genes candidatos que regulam sua resistência, desafiados com densidades populacionais iniciais crescentes de *M. incognita*, durante o seu estabelecimento e manutenção do parasitismo. Para a avaliação da tolerância, plantas cultivadas em vasos de 3.600 cm<sup>3</sup> foram inoculadas com 0,0625 (187,5); 0,125 (375); 0,25 (750); 0,5 (1500); 1 (3000); 2 (6000); 4 (12000); 8 (24000); 16 (48000) e 32 (96000) exemplares por cm<sup>3</sup> de solo e avaliadas aos 67 dias após a inoculação (DAI), através da mensuração do desenvolvimento das plantas, além da multiplicação do nematoide. Os resultados mostraram que, em densidades menores, IPR Afrodite apresentou fator de reprodução próximo a 1,0, sugerindo menor expressão da resistência. Em função desses resultados, experimento semelhante foi conduzido para análise da expressão gênica dessa cultivar ao nematoide, com avaliações aos 0 (imediatamente antes da inoculação), 2 e 9 DAI. A partir de reações de RT-qPCR, verificou-se que dois genes (*Lrk 14* e *LOX*) apresentaram regulação em resposta ao nematoide e padrões de regulação diferenciados entre as cultivares. IPR Afrodite apresentou estratégias moleculares contrastantes às observadas em URS Torena, sugerindo-se que há regulação tardia e negativa em URS Torena, enquanto que, em IPR Afrodite, *Lrk14* atuou como amplificador de respostas de defesa inicial, prolongando o sinal de ameaça após a detecção inicial do patógeno. O gene que codifica *LOX* foi desencadeado, como resposta induzida por efetores, o que geralmente resulta em reação de hipersensibilidade, como já observado em trabalhos anteriores envolvendo tal interação.

**Palavras-chave:** *Avena sativa*. Resistência. Tolerância. Nematoide de galhas. Controle genético.



## ABSTRACT

*Meloidogyne incognita* is considered one of the main economic important nematodes worldwide. For its management, the use of resistant cultivars is amongst the more efficient strategy. Therefore, strategies to optimize the genetic breeding programs are necessary. The gene expression analysis has amplified the comprehension about the mechanisms involved in the plant-nematode interaction and accelerated the development of resistant genotypes. The oat cultivar IPR Afrodite, resistant to *M. incognita*, and cultivars suscetibles was evaluated in relation to its tolerance to this nematode and, besides, the behavior of candidate genes regulating the resistance reaction was studied, challenged with crescent initial population densities of *M. incognita*, during its establishment and parasitism maintenance. To tolerance evaluation, plants cropped in 3,600 cm<sup>3</sup>-pots were inoculated with 0,0625 (187,5); 0,125 (375); 0,25 (750); 0,5 (1500); 1 (3000); 2 (6000); 4 (12000); 8 (24000); 16 (48000) e 32 (96000) exemplars.cm<sup>-3</sup> of soil and evaluated at 67 days after inoculation (DAI), through the mensuration of the plant development and nematode multiplication. Results showed that, in lower densities, IPR Afrodite showed reproduction factor values closed to 1.0, suggesting a lower resistance expression. In face of these results, a similar experiment was conducted to gene expression analysis of this cultivar to nematode, with evaluations at 0 (immediately before inoculation), 2 and 9 DAI. From RT-qPCR reactions, we could verify that two genes (*Lrk* and *LOX*) were regulated in response to nematode and that different regulatory patterns were observed between cultivars. IPR Afrodite showed molecular strategies contrasting to those observed in URS Torena, suggesting a late and negative regulation in URS Torena, while to IPR Afrodite, *Lrk14* acted as an amplifier of initial defense responses, prolonging the threat signal after the initial detection of the pathogen. The gene that codifies to *LOX* was unleashed, as a response induced by effectors, which usually results in a hypersensitive reaction, as observed previously.

**Keywords:** *Avena sativa*. Resistance. Tolerance. Root-knot nematode. Genetic control.



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Fator de reprodução (FR) (a) e número de nematzoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) (b) de *Meloidogyne incognita* nas cultivares de aveia branca IPR Afrodite, URSFAPA Slava e URS Torena, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1 ..... 31
- Figura 2** – Comportamento do fator de reprodução (FR) e do número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) em aveia branca IPR Afrodite em função do logaritmo das densidades populacionais iniciais crescentes de *Meloidogyne incognita* aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 2..... 35
- Figura 3** – Efeito de densidades populacionais iniciais crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca de raízes (MFR) de aveia branca, cultivares IPR Afrodite, URSFAPA Slava e URS Torena, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1 ..... 36

### CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Coloração *in situ* de juvenis de *Meloidogyne incognita* no interior das raízes de aveia branca. a) juvenis pré-parasitas na cultivar IPR Afrodite; b) juvenis pré-parasitas na cultivar URS Torena; c) juvenis pré-parasitas e parasitas na cultivar IPR Afrodite; d) juvenil J3 na cultivar URS Torena..... 58
- Figura 2** – Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* presentes no interior de raízes de aveia branca resistente (IPR Afrodite) e suscetível (URS Torena), sob diferentes densidades populacionais do nematoide, aos 2 (a) e 9 (b) c após a inoculação..... 58
- Figura 3** – Gel de agarose 1,5% representando o perfil de bandas do RNA total de aveia branca cv. IPR Afrodite submetido a densidades populacionais crescentes de *Meloidogyne incognita* e em *time-course* de 2 dias após a inoculação. 1) testemunha, sem nematoide; 2) 31 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 3) 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 4) 25 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 5) 250 nematoides.

parcela<sup>-1</sup>; 6) 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>.Cada tratamento foi composto por um *pool* de RNA contendo todas as repetições..... 60

**Figura 4** – PCR semi-quantitativa de genes candidatos associados à regulação de defesa de aveia branca em resposta a *Meloidogyne incognita* aos 0, 2 e 9 DAI. a) *18S*; b) *12S Globulin*; c) *Phy 3*; d) *LOX*; e) *Lrk 9* e f) *Lrk 14*. Os tratamentos estão representados por: B) branco (Água Milli-Q); 1) IPR Afrodite, sem nematoide, 0 DAI; 2) IPR Afrodite, sem nematoide, 2DAI; 3) IPR Afrodite, com nematoide, aos 2 DAI; 4) IPR Afrodite, sem nematoide, aos 9 DAI; 5) IPR Afrodite, com nematoide, aos 9 DAI; 6) URS Torena, sem nematoide, 0 DAI; 7) URS Torena, sem nematoide, aos 2 DAI; 8) URS Torena, com nematoide, aos 2 DAI; 9) URS Torena, sem nematoide, aos 9DAI e 10) URS Torena, com nematoide, aos 9 DAI. \*Cada tratamento foi composto por um *pool* de cDNA contendo todas as repetições ..... 61

**Figura 5** – Perfil transcricional do gene que codifica para *LOX* aos 2 e 9 dias após a inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando-se o gene *18S* como controle endógeno; a expressão relativa foi normalizada utilizando-se os níveis de expressão das plântulas controle, em cada período de coleta. As barras representam os níveis médios de expressão e os valores correspondem à média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela..... 65

**Figura 6** – Perfil transcricional do gene que codifica para *Lrk14* aos 2 e 9 dias após a inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando-se o gene *18S* como controle endógeno; a expressão relativa foi normalizada utilizando-se os níveis de expressão das plântulas controle, em cada período de coleta. As barras representam os níveis médios de expressão e os valores correspondem à média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela..... 67

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Efeito de densidades iniciais ( $P_i$ ) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cv. IPR Afrodite, população final ( $P_f$ ), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1..... 32
- Tabela 2** – Efeito de densidades iniciais ( $P_i$ ) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cvs. URS FAPA Slava e URS Torena, população final ( $P_f$ ), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1.....33
- Tabela 3** – Efeito de densidades iniciais ( $P_i$ ) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cv. IPR Afrodite, população final ( $P_f$ ), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 2.....34

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – *Primers* dos genes utilizados para os estudos de expressão de defesa em aveia branca e suas respectivas eficiências em RT-qPCR..... 61
- Tabela 2** – Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais ( $P_i$ ) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 62
- Tabela 3** – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne*

*incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....63

**Tabela 4** – Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 64

**Tabela 5** – Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 66

**Tabela 6** – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 67

**Tabela 7** – Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 68

**Tabela 8** – Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 69

**Tabela 9** – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 69

**Tabela 10** – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela..... 70

<b>Tabela 11</b> – Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torenna em relação ao gene que codifica <i>Phy 3</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> , nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	70
<b>Tabela 12</b> – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica <i>Phy 3</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	71
<b>Tabela 13</b> – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica <i>Lrk 9</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	71
<b>Tabela 14</b> – Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torenna em relação ao gene que codifica <i>12S Globulin</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> , nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	72
<b>Tabela 15</b> – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica <i>12S Globulin</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	72
<b>Tabela 16</b> – Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica <i>12S Globulin</i> aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com <i>Meloidogyne incognita</i> nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.....	73



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1 - PATOGENICIDADE DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM AVEIA BRANCA</b> .....	24
1.1 RESUMO.....	25
1.2 ABSTRACT.....	25
1.3 INTRODUÇÃO.....	26
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1.5 RESULTADOS.....	30
1.6 DISCUSSÃO.....	37
1.7 LITERATURA CITADA.....	41
<b>CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE AVEIA BRANCA A <i>Meloidogyne incognita</i> POR MEIO DE ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA</b> .....	48
2.1 RESUMO.....	49
2.2 ABSTRACT.....	50
2.3 INTRODUÇÃO.....	51
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.5 RESULTADOS.....	58
2.6 DISCUSSÃO.....	73
2.7 REFERÊNCIAS.....	80
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	93
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94





## INTRODUÇÃO GERAL

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é integrante de sistemas de produção agrícolas no Brasil e destaca-se entre as demais espécies do gênero devido ao grande aproveitamento industrial e à versatilidade. Isso porque além da produção de grãos destinados a alimentação humana ou animal, a espécie é uma alternativa em programas de rotação de culturas, onde pode ser utilizada como pastagem de inverno, produção de feno e ensilado, adubo verde e cobertura em sistema de plantio direto (COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 2014).

Por essas razões, o Brasil situa-se entre os dez maiores produtores desse grão e o seu cultivo vem expandindo ano após ano. Na safra 2018, a expectativa é de que haja um incremento na área plantada, atingindo 340,3 mil hectares, totalizando uma produção de 752 mil toneladas (CONAB, 2018). Apesar do referido incremento, a aveia não atinge o seu máximo potencial produtivo em decorrência de problemas fitossanitários, que são, entre outros fatores, limitantes do seu rendimento (TENG; SHANE; MACKENZIE, 1984; ABREU; SCHUCH; MAIA, 2005).

A presença de nematoides em áreas de cultivo pode tanto afetar a produtividade da aveia para consumo do grão como, nos casos de seu uso como forrageira, aumentar a população do parasita no solo, causando problemas à cultura subsequente. Dentre as principais espécies de nematoides para a agricultura brasileira incluem-se os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.).

As principais práticas para o controle de nematóides são: o controle químico, o uso de variedades resistentes, a rotação de culturas, o tratamento de sementes com produtos nematicidas e o controle biológico. O uso de cultivares resistentes aos nematoides é um dos métodos mais eficientes e econômicos de evitar perdas ocasionadas por nematoides, principalmente para os endoparasitas sedentários, como os do gênero *Meloidogyne*, que apresentam uma interação especializada com seus hospedeiros (ROBERTS, 2009).

E é considerado um método ideal de manejo por ser eficiente na redução populacional do nematoide, sem o aumento de custo de produção, já que a própria semente é a ferramenta de manejo, não tendo a necessidade de adaptação de maquinários agrícolas. Entretanto, para diversas culturas de importância econômica, dentre elas a aveia, são poucas as opções disponíveis no mercado, com níveis elevados de resistência e produtividade. Dessa maneira, torna-se crucial a busca e o

estudo de novas fontes para incorporar em novos genótipos resistentes, otimizando as áreas com problemas a esses organismos, reduzindo os custos de produção e os riscos ambientais.

Assim, os programas de melhoramento têm desenvolvido estudos genéticos ao longo dos anos a respeito da resistência aos problemas fitossanitários existentes (SINGH; SCHWARTZ, 2010, 2011; SCHWARTZ; SINGH, 2013). No entanto, como o desenvolvimento de uma cultivar com elevados níveis de resistência demanda um grande período de tempo, estratégias para otimizar os programas de melhoramento genético da cultura, principalmente utilizando-se ferramentas moleculares, são sempre necessárias.

Com o advento de técnicas moleculares, como a análise de expressão gênica durante a infecção do nematoide na planta, tem-se acelerado, consideravelmente, a compreensão dos mecanismos envolvidos e o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da resistência das plantas (XIAO et al., 2013; NGUYỄN ET AL., 2014). Como a maioria dos patossistemas são dinâmicos, experimentos de *time course* são ideais para o entendimento de todo processo da interação, o que requer adequado planejamento para serem gerados dados relevantes e informativos. Para observar a resposta de plantas a estresses bióticos, deve-se primar por períodos iniciais de infecção e parasitismo para avaliação, pois, neste período, há uma regulação transcricional frequente desencadeada pela percepção da planta à invasão do patógeno (BAR-JOSEPH; GITTER; SIMON, 2012).

Mas, quando a incidência do parasitismo está abaixo do limiar detectável pelo hospedeiro, ou seja, em baixas densidades, os mecanismos de resistência não são desencadeados (ROBERTS, 2009). Em alguns casos, genótipos resistentes, na tentativa de conter o parasitismo dos nematoides em alta incidência, desencadeiam mecanismos hipersensíveis, limitando drasticamente seu próprio crescimento e produção (SIKKENS et al., 2011).

Até o momento, a maioria das informações a respeito da interação molecular planta – nematoide foram geradas a partir de dicotiledôneas. E estudos que auxiliem na compreensão da interação monocotiledôneas-nematoides contribuem para a definição de melhores estratégias de manejo a estes fitoparasitas.

Diante desse cenário, os objetivos desse trabalho foram avaliar o comportamento de três cultivares de aveia branca, resistente e suscetível, sob densidades populacionais crescentes de *Meloidogyne incognita* e analisar o

comportamento de genes candidatos que regulam a resistência e/ou suscetibilidade em tecidos radiculares de aveia branca nessas condições, durante o estabelecimento do patógeno e manutenção do parasitismo.

## **CAPÍTULO I**

### **PATOGENICIDADE DE *Meloidogyne incognita* EM AVEIA BRANCA**

(artigo redigido conforme normas da revista Journal of Nematology)

## 1.1 RESUMO

A aveia faz parte de sistemas de produção no Brasil, é importante tanto a caracterização da reação de cultivares a nematoides, como a obtenção de informações acerca dos níveis de danos de nematoides na cultura. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância de *Meloidogyne incognita* nas cultivares de aveia branca IPR Afrodite (Resistente), URS Torena (Suscetível) e FAPA Slava (Suscetível). Para tal, mudas foram transplantadas para vasos de 3.600 cm<sup>-3</sup>e inoculadas com densidades populacionais crescentes do nematoide: 0,0625 (187,5); 0,125 (375); 0,25 (750); 0,5 (1500); 1 (3000); 2 (6000); 4 (12000); 8 (24000); 16 (48000) e 32 (96000) nematoides por cm<sup>3</sup> de solo. A avaliação foi realizada aos 67 dias após a inoculação, através do cálculo do fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raízes (Nema.g<sup>-1</sup>), além da mensuração do desenvolvimento das plantas. Os resultados permitiram concluir que a aveia IPR Afrodite é pouco afetada em seu desenvolvimento pelas diferentes densidades populacionais do nematoide. O número de nematoides extraídos ao final do experimento mostrou que, como esperado, houve uma correlação inversa entre as densidades populacionais iniciais e o FR, enquanto que para nema.g<sup>-1</sup>, os valores aumentaram com o acréscimo nas densidades populacionais iniciais, em função da menor quantidade de raízes apresentada pelas plantas. Além disso, foi possível observar que, em subpopulações (População inicial = 187,5), a cv. IPR Afrodite, altamente resistente ao nematoide, apresentou FR próximo a 1,0, sugerindo menor expressão da resistência em baixas densidades populacionais do nematoide.

**Palavras-chave:** *Avena sativa*, tolerância, nematoide das galhas, densidade populacional.

## 1.2 ABSTRACT

As oat is an integrant of production systems in Brazil, it is important the characterization of cultivars to nematodes, besides the information about the damage levels caused by nematodes in the crop. By this way, the objective of the present work was to evaluate the tolerance of *Meloidogyne incognita* in oat cultivars IPR Afrodite (resistant), URS Torena (susceptible) and FAPA Slava (susceptible). For this,

seedlings were transplanted to 3,600 cm<sup>3</sup>-pots and inoculated with 0.0625 (187.5); 0.125 (375); 0.25 (750); 0.5 (1,500); 1 (3,000); 2 (6,000); 4 (12,000); 8 (24,000); 16 (48,000) and 32 (96,000) nematodes.cm<sup>-3</sup> of soil. Evaluation was done at 67 days after inoculation (DAI), through the mensuration of plant development and nematode multiplication. Results showed that IPR Afrodite is little affected in its development by the different nematode population densities. The number of nematodes extracted in the final of the experimental period showed that, as expected, there was an inverse correlation between the initial population densities and the reproduction factor, while to number of nematodes per gram of roots, values increased with the increment of the initial population densities, as a result of the lower amount of roots showed by plants. Besides, it was possible to observe that, in lower densities (187.5), IPR Afrodite, considered as highly resistant to this nematode, showed RF values closed to 1.0, suggesting a lower resistance expression.

**Keywords:** *Avena sativa*, tolerance, root-knot nematode, population densities.

### 1.3 INTRODUÇÃO

Os fitonematoides estão entre as principais pragas de risco fitossanitário para o agronegócio brasileiro (MAPA, 2015). Mundialmente, estima-se que os prejuízos ocasionados por esses parasitas ultrapassam US\$ 157 bilhões anualmente (Abad et al., 2008). Os nematoides de galhas – *Meloidogynespp.* – são, particularmente, os mais prejudiciais para as culturas de importância econômica (Blok et al., 2008), com destaque para *M. incognita*, considerado como o “fitopatógeno mais danoso do mundo” (Trudgill e Blok, 2001; Huang et al, 2006a; Huang et al, 2006b).

Essa singularidade notória provém da habilidade desses parasitas em manter uma relação íntima com a planta hospedeira (Caillaud et al., 2008). Para estabelecerem o parasitismo, induzem uma série de modificações morfológicas, fisiológicas e moleculares, reguladas para suprir seu desenvolvimento e reprodução (Li et al., 2008; Davis et al., 2008; Proite et al., 2008; Nguyễn et al., 2014; Marini et al., 2016). São capazes de produzir até 1000 ovos/fêmea, no período de 3-6 semanas, aumentando o nível populacional desses patógenos na área de forma rápida e progressiva (Chitwood e Perry, 2010).

Dentre as medidas que podem contribuir para a redução da densidade populacional desses parasitas, o uso de cultivares resistentes tem sido a alternativa mais favorável para o agricultor, por aliar eficiência, economia e segurança ambiental (Lilley et al., 2011). No entanto, devido à alta diversidade genética da planta e do nematoide (Borges et al., 2010), as cultivares tendem a apresentar diferentes respostas de tolerância a esses parasitas, independente do grau de resistência ou suscetibilidade (Greco e Di Vito, 2009), visto que a tolerância refere-se ao crescimento e produção da planta hospedeira e não à reprodução do nematoide (Roberts, 2009; Sikora et al., 2005).

Vários fatores podem influenciar essa interação, inclusive em cultivares resistentes, já que os mecanismos para supressão desses parasitas estão diretamente associados com a constituição genética da planta hospedeira, condições edafoclimáticas, virulência e densidade populacional dos nematoides (Roberts, 2009; Wondafrash et al., 2013). Na interação entre *M. incognita* e algodoeiro resistente cv. NemX, Ogallo et al. (1999) observaram que houve reprodução do nematoide quando as plantas foram inoculadas com as menores densidades populacionais, mas, em altas densidades, a cultivar mostrou-se resistente e tolerante. Em outros casos, genótipos de algodoeiro resistentes, na tentativa de conter o parasitismo dos nematoides em altas densidades, mostraram reação de hipersensibilidade, o que resultou em limitação do crescimento e produção das plantas (Sikkens et al., 2011).

Assim, a caracterização da reação de cultivares a nematoides, bem como a obtenção de informações acerca dos níveis de danos ocasionados por esses parasitas é de suma importância (Barker e Olthof; 1976; Seinhorst, 1965). Isso porque existe uma correlação direta entre densidade de nematoides e o crescimento e produtividade das culturas anuais (Sasanelli, 1994).

No entanto, há escassez de informações com relação à patogenicidade ocasionada pelos nematoides de galhas em monocotiledôneas. Em aveia branca, a cultivar IPR Afrodite, caracterizada pelo alto nível de resistência a *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis* e *M. enterolobii* (Machado et al., 2015), tem sido utilizada em programas de manejo desses nematoides, além de ser alvo de estudos a respeito de seus mecanismos de resistência para os mesmos (Marini et al., 2016). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a tolerância, medida pelo nível de dano sofrido, e o comportamento de cultivares de aveia branca, resistente e suscetível, quanto à multiplicação de *Meloidogyne incognita*, submetidas a

densidades populacionais crescentes do nematoide, em condições de casa de vegetação.

#### 1.4 MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares de aveia branca (*Avena sativa* L.) IPR Afrodite, resistente, URS FAPA Slava e URS Torena, suscetíveis, a *M. incognita*, foram utilizadas como objetos de estudo em experimentos conduzidos no Instituto Agronômico do Paraná, em Londrina, Paraná, Brasil (23°18'36''S, 51°09'46''W). Para tal, dois experimentos foram conduzidos, sendo o primeiro demarço a maio de 2016, com temperaturas mínima e máxima de 23 e 34°C. O segundo experimento foi conduzido de julho a setembro de 2017, com temperaturas mínima e máxima 21 e 35°C.

*Obtenção, purificação e manutenção da população do inóculo:* A população de *M. incognita* utilizada nos experimentos foi obtida no município de Altônia, Paraná, coletada a partir de raízes de café cv. Apoatã. A identificação da espécie foi realizada através de eletroforese de isoenzimas ( $\alpha$ -esterase) (Carneiro e Almeida, 2001) e padrões morfológicos (Hartman e Sasser, 1985). Em seguida, para purificação da população, uma única massa de ovos foi inoculada e mantida em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara, em casa de vegetação, visando-se a multiplicação do inóculo.

*Preparo das plantas:* As sementes foram previamente tratadas com fungicida Derosal Plus® (300 ml p.c/100kgsementes). Em seguida, uma única semente foi depositada em cada célula de bandeja de poliestireno expandido, preenchidas com substrato comercial Plantmax®, para garantir a uniformidade no *stand* das plantas. Sete dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas e transplantadas para vasos de 3.600 cm<sup>3</sup>, de forma individualizada, contendo 3.000 cm<sup>3</sup> de substrato (58% de areia, silte 8% e 34% de argila), esterilizado por calor a seco (160 °C por 5 horas), sendo acrescidos 5 g de Osmocote® por vaso (15% N, 9% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 12% de K<sub>2</sub>O, 1% de Mg, 2,3% S, 0,05% de Cu, 0,45% de Fe, 0,06% Mn, 0,02% de Mo).

*Inoculação e avaliação:* Cinco dias após o transplante, inoculou-se uma suspensão previamente calibrada para (Pi): 0 (testemunha – sem nematoide), : 0,0625 (187,5); 0,125 (375); 0,25 (750); 0,5 (1500); 1 (3000); 2 (6000); 4 (12000); 8 (24000); 16 (48000) e 32 (96000) nematoides por cm<sup>3</sup> de solo, em orifícios adjacentes ao mesocótilo. Como testemunha de suscetibilidade e para confirmação da viabilidade

do inóculo, em ambos os experimentos, seis plantas de tomate cv. Santa Clara foram inoculadas com 3.000 espécimes/ planta.

As avaliações foram realizadas aos 67 dias após a inoculação (DAI), mensurando-se as variáveis de desenvolvimento das cultivares e de multiplicação dos nematoides. Dessa forma, a parte aérea de cada planta foi cortada a 1 cm da superfície do solo, para mensuração da massa fresca da parte aérea (MFPA). Posteriormente, estas passaram por processo de secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 65 °C durante 72 horas. Após a secagem, procedeu-se a pesagem da massa seca da parte aérea (MSPA).

Quanto às raízes, estas foram cuidadosamente imersas em água, a fim de separá-las do solo, e secas em papel absorvente, para, então, determinar-se a massa fresca das raízes (MFR) e posterior extração dos nematoides. Para isso, as raízes foram cortadas em fragmentos de 1-2 cm e processadas, de acordo com a metodologia proposta por Boneti e Ferraz (1981). As suspensões obtidas no fim do processamento de cada parcela foram coletadas, homogeneizadas e analisadas sob microscópio de luz, para contagem dos espécimes, com auxílio de câmara de Peters. Posteriormente, estimou-se a população final (Pf). Com base nestes valores, o fator de reprodução ( $FR = Pf/Pi$ ) e o número de nematoides por grama de raiz ( $Nema.g^{-1}$ ) foram estimados para cada parcela.

*Delineamento experimental e análise estatística:* Foram realizados dois experimentos, o primeiro com delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial duplo com dez densidades de inóculo e três cultivares (10x2), URS Torena e URS FAPA Slava suscetíveis e IPR Afrodite, resistente a *M. incognita* (MACHADO et al., 2015). No segundo experimento, apenas a cultivar resistente foi submetida a onze densidades de inóculo, para comprovar o comportamento observado no primeiro experimento, bem como definir, por meio de análise de regressão, qual seria o tipo de resposta dessa cultivar quando submetida à densidades crescentes do nematoide. Ambos os experimentos continham seis repetições para cada tratamento, sendo cada unidade experimental representada por um vaso contendo uma planta.

Os dados referentes ao primeiro experimento foram submetidos à análise de variância para cada variável estudada, e, para ajuste do modelo, a variável resposta foi transformada conforme indicação BoxCox. Para as variáveis MFPA e MSPA, não houve a necessidade de transformação dos dados. Contudo, os valores de MFR foram transformados pela raiz quadrada, FR por  $\log(y+0,01)$  e  $Nema.g^{-1}$  por  $\log(y+0,05)$ .

Para as variáveis MFPA e MSPA, não houve interação entre os fatores, sendo analisados somente os efeitos principais; já para as variáveis MFR, FR e Nema.g<sup>-1</sup>, houve interação entre os fatores, sendo procedido o desdobramento de interações. Para o controle de erro do tipo I no teste múltiplo de hipóteses aplicado às variáveis respostas, foi utilizada a técnica de controle da FDR (*False Discovery Rates*) (Benjamini; Hochberg, 1995). Para efeito de diferença significativa entre as médias, considerou-se  $P$  valor  $\leq 0,05$ .

Os dados referentes ao segundo experimento, realizado apenas com a cultivar IPR Afrodite, foram submetidos à análise de variância para cada variável estudada, sendo que MFPA, MSPA e MFR não apresentaram diferença significativa a 5%; para os dados de FR e Nema.g<sup>-1</sup>, foi necessário transformar a variável preditora por  $\log_2(x)$ , utilizando-se em seguida o modelo linear generalizado (GLM), com distribuição *quasipoisson*, procedendo o ajuste da regressão após a seleção do modelo mais adequado, sendo que, em ambos os casos, o melhor modelo foi o cúbico completo.

Para todas as análises, utilizou-se o programa estatístico R Core Team (2015) e os pacotes Lattice (Deepayan, 2008), LatticeExtra (Deepayan e Felix, 2016), gridExtra (Auguie, 2017), nlme (Pinheiro et al., 2017), doBy (Højsgaard; Halekoh, 2016), multcomp (Hothorn; Bretz; Westfall, 2008), plyr (Wickham, 2011), reshape (Wickham, 2007), wzRfun(Zeviani, 2015). O script utilizado para as análises pode ser visualizado no link: [www.leg.ufpr.br/~walmes/analises/SASilva/](http://www.leg.ufpr.br/~walmes/analises/SASilva/).

## 1.5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos apresentam-se resumidos nas Tabelas 1 e 2. Os valores elevados de FR e Nema.g<sup>-1</sup> na testemunha (cv. Santa Clara), nos experimentos 1 e 2 (61,71 e 48,96, respectivamente), confirmam a viabilidade do inóculo e as condições adequadas para o desenvolvimento e multiplicação de *M. incognita*.

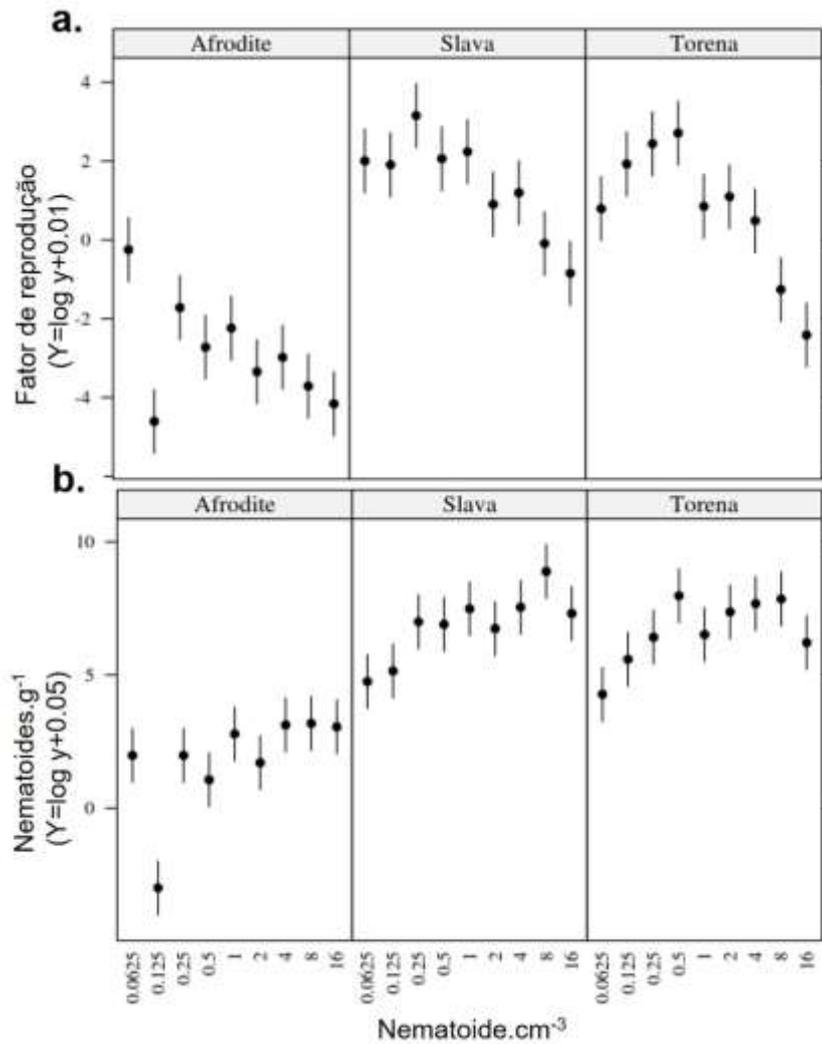


Figura 1. Fator de reprodução (FR) (a) e número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) (b) de *Meloidogyne incognita* nas cultivares de aveia branca IPR Afrodite, URS FAPA Slava e URS Torena, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1.

Para as cultivares de aveia, de maneira geral, o número de nematoides extraídos ao final do experimento mostrou que, como esperado, houve uma correlação inversa entre as densidades populacionais iniciais e FR, no experimento 1 (Figura 1a e Tabela 1 e 2). Em relação ao número de nematoides por grama de raízes (Nema.g<sup>-1</sup>), o comportamento foi inverso ao observado para FR, com incremento nos valores com o aumento da densidade populacional do nematoide (Figura 1b e Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Efeito de densidades iniciais (Pi) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cv IPR Afrodite, população final (Pf), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1.

IPR Afrodite					
Pi (Nema.cm <sup>-3</sup> de solo)	Nema.g <sup>-1</sup>	FR	MFR (g)	MFPA (g)	MSPA (g)
0	-	-	25,99 a	47,72 ac	5,83 bc
188 (0,0625)	8 ab	0,821	20,27 ab	30,42 de	4,18 d
375 (0,125)	0 c	0,000	16,66 ab	26,79 de	3,52 d
750 (0,250)	10 ab	0,223	16,50 ab	34,65 bcd	5,08 ac
1500 (0,5)	12 a	0,104	14,94 b	37,70 cd	4,09 cd
3000 (1,0)	17 ab	0,109	17,74 ab	39,90 ab	5,03 ab
6000 (2,0)	10 ab	0,042	22,23 ab	50,56 a	7,70 a
12000 (4,0)	30 b	0,051	19,64 ab	36,07 cd	5,84 ab
24000 (8,0)	31 b	0,012	14,38 b	18,93 f	2,90 e
48000 (16,0)	38 b	0,024	16,11 ab	33,05 e	4,68 d
Testemunha(1,0)	5421	61,712	36,00	-	-

\*\*\*Cada valor representa a média de seis repetições. Dados não transformados para o teste de médias; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Fisher.

Tabela 2. Efeito de densidades iniciais (Pi) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cvs. URS FAPA Slava e URS Torena, população final (Pf), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1.

<b>URS FAPA Slava</b>					
Pi (Nema.cm <sup>-3</sup> de solo)	Nema.g <sup>-1</sup>	FR	MFR (g)	MFPA (g)	MSPA (g)
0	-	-	14,72 ab	34,47 ac	4,50 bc
188 (0,0625)	229 c	14,960	12,26 b	29,61 de	3,95 d
375 (0,125)	186 cd	7,173	14,79 ab	27,53 de	3,75 d
750 (0,250)	1289 b	24,403	16,85 ab	37,69 bcd	5,61 ac
1500 (0,5)	2846 b	16,445	12,53 b	30,03 cd	4,18 cd
3000 (1,0)	2955 ab	1,051	15,90 ab	52,96 ab	6,01 ab
6000 (2,0)	960 bd	0,288	17,49 ab	43,52 a	5,24 a
12000 (4,0)	2317 ab	3,765	21,32 a	36,18 cd	5,55 ab
24000 (8,0)	7897 a	0,919	3,29 c	10,78 f	1,75 e
48000 (16,0)	2406 ab	0,710	13,57 ab	22,37 e	3,28 d
<b>URS Torena</b>					
0	-	-	13,05 ab	33,35 ac	4,75 bc
188 (0,0625)	87 c	2,433	6,20 cd	20,98 de	3,50 d
375 (0,125)	269 cd	6,894	9,66 bc	33,87de	3,38 d
750 (0,250)	804 bd	14,953	14,10 b	35,09 bcd	4,57 ac
1500 (0,5)	3526 b	17,622	7,92 bc	35,05 cd	4,10 cd
3000 (1,0)	978 bd	2,951	10,69 bc	38,96 ab	4,71 ab
6000 (2,0)	1767 ab	3,408	11,32 bc	42,51 a	5,21 a
12000 (4,0)	4456 ab	2,866	9,73 bc	26,55 cd	4,20 ab
24000 (8,0)	3007 ab	0,367	2,63 d	7,88 f	1,10 e
48000 (16,0)	623 ad	0,103	7,71 ac	14,41 e	2,27 d
Testemunha(1,0)	5421	61,712	36,00	-	-

\*\*\*Cada valor representa a média de seis repetições. Dados não transformados para o teste de médias; médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Fisher.

A cultivar IPR Afrodite mostrou que em baixas densidades populacionais, maiores valores de FR foram obtidos, chegando a valores próximos de 1,0 na densidade de 0,0625 Nema.cm<sup>-3</sup> (0,82 no experimento 1 e 1,30 no experimento 2). A partir da densidade de 0,125 Nema.cm<sup>-3</sup>, em ambos os experimentos, com o acréscimo da densidade populacional, os valores de FR decresceram, chegando próximos a zero. Em relação à variável Nema.g<sup>-1</sup>, em ambos os experimentos (Tabelas 1 e 3), os valores obtidos em IPR Afrodite foram baixos, o que corrobora com os menores FR observados nessa cultivar (Figura 3). Quanto à análise de regressão no experimento 2, os parâmetros de ajuste para a regressão do FR foram:  $x=-0,6058$ ,  $\beta_0=-2,1944$ , e para Nema.g<sup>-1</sup>:  $\beta_0=2,14323$ ,  $\beta_1=-0,03105$ ,  $\beta_2=-0,05219$ , configurando o comportamento observado na Figura 2.

Tabela 3. Efeito de densidades iniciais (Pi) crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca de raízes (MFR) e de parte aérea (MFPA) e massa seca de parte aérea (MSPA) de aveia branca cv. IPR Afrodite, população final (Pf), número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) e fator de reprodução (FR) do nematoide, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 2.

IPR Afrodite					
Pi (Nema.cm <sup>-3</sup> de solo)	Nema.g <sup>-1</sup>	FR	MFR (g)	MFPA (g)	MSPA (g)
0	-	-	52,24 <sup>ns</sup>	137,33 <sup>ns</sup>	30,15 <sup>ns</sup>
188 (0,0625)	6	1,301	48,48	115,33	23,61
375 (0,125)	5	0,616	50,48	123,75	24,42
750 (0,250)	5	0,325	52,09	127,50	26,35
1500 (0,5)	6	0,218	52,69	132,75	26,14
3000 (1,0)	12	0,179	44,23	129,17	26,52
6000 (2,0)	15	0,112	44,02	113,00	24,88
12000 (4,0)	1	0,005	50,61	121,00	23,65
24000 (8,0)	2	0,005	55,89	137,17	27,61
48000 (16,0)	3	0,004	48,77	130,33	26,67
96000 (32,0)	3	0,002	56,26	126,25	26,45
Testemunha (1,0)	2685	48,961	54,93	-	-

\*\*\*Cada valor representa a média de seis repetições. Dados não transformados para o teste de médias; diferenças estatísticas não significativas (<sup>ns</sup>) na mesma coluna.

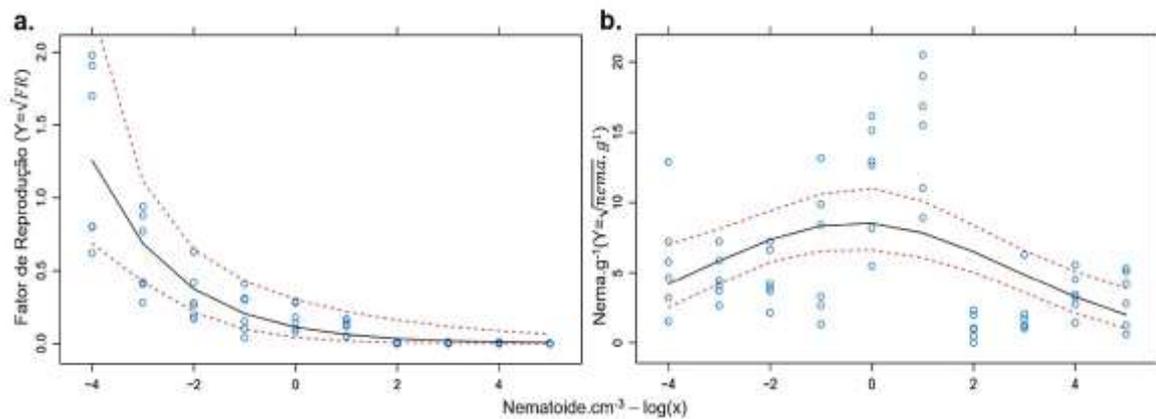


Figura 2. Comportamento do fator de reprodução (FR) e do número de nematoides por grama de raiz (Nema.g<sup>-1</sup>) em aveia branca IPR Afrodite em função do logaritmo das densidades populacionais iniciais crescentes de *Meloidogyne incognita* aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 2.

No experimento 1, para a cultivar URS Torena, houve um aumento progressivo nos valores de FR até o máximo (17,62) na densidade de 0,5 Nema.cm<sup>-3</sup> (Tabela 2). Após atingir este ponto, houve queda acentuada, conforme o aumento da densidade populacional, chegando a apresentar valores de FR menores que 1,0 em densidades  $\geq 8,0$  Nema.cm<sup>-3</sup> de solo. Para a variável Nema.g<sup>-1</sup>, os valores obtidos em URS Torena no experimento 1 (Tabela 2) foram aumentando gradativamente até o máximo (4456) na densidade de 4,0 Nema.cm<sup>-3</sup>, voltando a decrescer a partir desse ponto.

Já para a cultivar URS FAPA Slava, no experimento 1 (Tabela 2), o mesmo aumento progressivo nos valores de FR foi observado, mas com máximo (24,40) na densidade de 0,250 Nema.cm<sup>-3</sup> de solo, com queda a partir desse ponto, como observado para URS Torena. Para a variável Nema.g<sup>-1</sup>, o valor máximo encontrado em URS FAPA Slava foi de 7897 na densidade de 8,0 Nema.cm<sup>-3</sup> de solo.

Em relação ao desenvolvimento das plantas, a cultivar IPR Afrodite foi pouco afetada pela presença de *M. incognita*, mesmo nas maiores densidades populacionais, uma vez que os valores obtidos de MFR, MFPA e MSPA, em ambos os experimentos, foram elevados e, em comparação às cultivares URS FAPA Slava e URS Torena (experimento 1), foram numericamente superiores (Tabela 1 e 2; Figura 3).

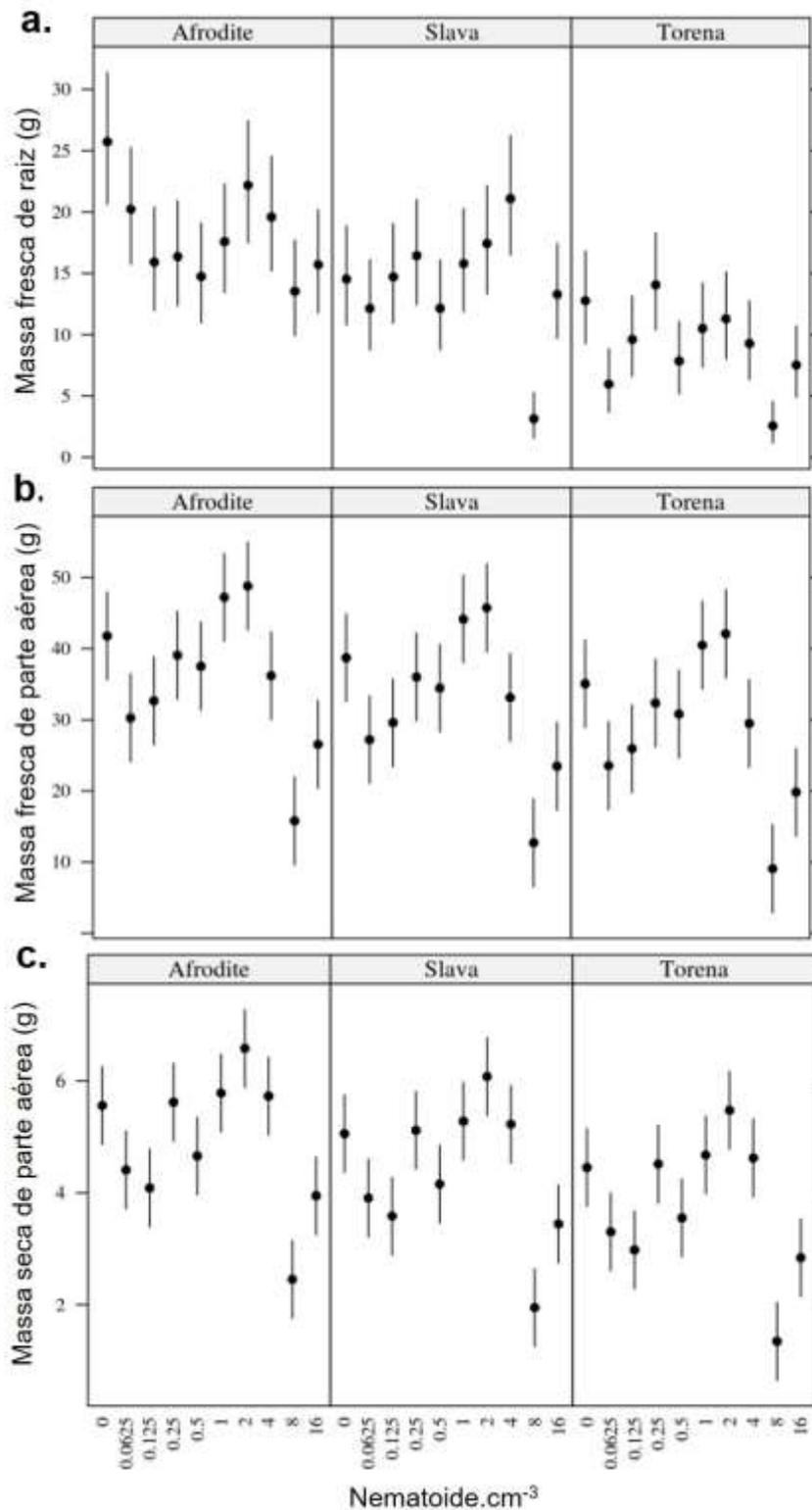


Figura 3. Efeito de densidades populacionais iniciais crescentes de *Meloidogyne incognita* sobre a massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa fresca de raízes (MFR) de aveia branca, cultivares IPR Afrodite, FAPA Slava e URS Torena, aos 67 dias após a inoculação (DAI) – Experimento 1.

Para a variável MFR (Figura 3c), observou-se que, independentemente da cultivar em análise, a presença de *M. incognita* prejudicou o desenvolvimento do sistema radicular, pois os valores obtidos em todas as densidades populacionais foram sempre menores que aqueles obtidos nas testemunhas, sem inoculação. No experimento 1, apesar de não haver uma correlação significativa entre as variáveis MFPA e MSPA (Figura 3 b,c) e as densidades populacionais do nematoide, verificou-se, a exemplo de MFR, que a presença de *M. incognita* prejudicou o desenvolvimento das plantas. Embora as cultivares tenham tido seu desenvolvimento prejudicado pelo nematoide, a Figura 3 mostra claramente que IPR Afrodite foi menos afetada que as cultivares suscetíveis.

Sintomas radiculares, caracterizados por leves engrossamentos, foram observados em todas as densidades populacionais do nematoide nas cultivares URS FAPA Slava e URS Torena. Entretanto, a parte aérea das plantas não apresentou sintomas visíveis, independente da densidade de inóculo utilizada.

## 1.6 DISCUSSÃO

Sabe-se que a densidade populacional e os custos da infecção parasitária dos nematoides de galhas podem afetar o potencial de desenvolvimento, sobrevivência e reprodução das plantas hospedeiras. Contudo, essas variáveis dependem da habilidade de reprodução intrínseca das espécies de nematoides, do desenvolvimento e tamanho do sistema radicular do hospedeiro, da capacidade da planta em tolerar e resistir ao ataque desses parasitas, bem como das condições ambientais (Roberts, 2009; Greco e Di Vito, 2009; Wondafrash et al., 2013).

Os resultados obtidos mostraram que, para as cultivares suscetíveis, com o aumento da Pi de *M. incognita*, observou-se aumento do FR correspondente, até a densidade de 1,0 Nema.cm<sup>-3</sup>. Em seguida, houve redução progressiva na multiplicação desse parasita, alcançando valores de FR abaixo de 1,0 em altas densidades populacionais. Provavelmente, essa redução é consequência da competição entre os espécimes pelo tecido do hospedeiro e por sítios de alimentação (Greco e Di Vito, 2009), uma vez que Nema.g<sup>-1</sup> foi proporcional ao aumento da Pi e inversamente proporcional à MFR, situação já comprovada em interações compatíveis entre nematoides de galhas e dicotiledôneas (Castillo et al. 2001; Di Vito et al. 1986,

2005; Charegani et al. 2012; Maleita et al. 2012; Machado et al. 2014). Tais interações mostram que há uma correlação inversa entre a densidade populacional inicial de nematoides e a reprodução desses em plantas hospedeiras.

Quanto às variáveis MFPA e MSPA, estas foram significativamente afetadas, mesmo nas menores densidades populacionais. Reduções de 76% e 23% da MFPA e MSPA, respectivamente, foram observadas na Pi de 8,0 Nema.cm<sup>-3</sup> em URS Torená. Isso ocorre porque a maior concentração desses fitoparasitas está diretamente correlacionada com o desenvolvimento das plantas (Crozzoli et al., 1997; Di Vito et al., 2005; Requena et al., 2011), haja visto que os nematoides de galhas diminuem o metabolismo das plantas e a síntese de fotoassimilados (Melakeberham e Ferris, 1988; Abawi et al., 2005).

Esses resultados sugerem que, a partir da densidade de 2,0 Nema.cm<sup>-3</sup>, os danos desencadeados por *M.incognita* ao desenvolvimento das cultivares suscetíveis de aveia branca são acentuados, ou seja, 2,0 Nema.cm<sup>-3</sup> poderia ser considerado como o limite de tolerância ao nematoide. Tal limite não foi determinado ainda para a cultura da aveia, mas Di Vito et al. (2004; 2007), ao observar reduções na MFPA, MFR e altura em cultivares italianas de feijão comum, observaram que, a partir de 2,0 Nema.cm<sup>-3</sup> de *M. incognita* e 4,0 Nema.cm<sup>-3</sup> de *M. javanica* tal limite foi atingido. Comportamento semelhante foi observado para a cultura da soja, onde danos resultantes da partição de carboidratos para as raízes foram atribuídos a *M. javanica*, funcionando como dreno de carboidratos ou fotoassimilados (Carneiro et al., 2009).

Já a cultivar IPR Afrodite teve sua reação de resistência a *M. incognita* confirmada pelos baixos valores de FR e Nema.g<sup>-1</sup> obtidos, mas permitiu a multiplicação de *M.incognita*, mesmo que em menor magnitude, quando submetida às menores densidades populacionais. De acordo com o critério de classificação de Oostenbrink (1966), essa cultivar seria, então, classificada como suscetível nessas condições, uma vez que o FR na densidade de 0,0625 Nema.cm<sup>-3</sup> foi maior que 1,0.

Sabe-se que os juvenis infectivos de *Meloidogyne* spp. conseguem penetrar as raízes de cultivares resistentes, ainda que em menor número, e, dependendo do nível de resistência, alguns indivíduos conseguem desenvolver-se até o estágio adulto e gerar novos indivíduos (Faske e Starr, 2009; Mota et al., 2013; Marini et al., 2016). Entretanto, a taxa de reprodução do nematoide em cultivares resistentes sempre será próxima de 1,0 (Greco e Di Vito, 2009).

Quando a incidência do parasitismo está abaixo do limiar detectável pelo hospedeiro, ou seja, em densidades populacionais muito baixas, os mecanismos de resistência não são desencadeados (Roberts, 2009), como observado em IPR Afrodite. A partir de 0,125 Nema.cm<sup>-3</sup>, menores FRs de *M.incognita* foram observados nessa cultivar, com valores próximos a zero em maiores densidades populacionais. Isso ocorre porque a resistência é dependente de dois pressupostos: é uma reação que aparece como consequência direta da quantidade de patógeno no tecido do hospedeiro e da capacidade bioquímica e molecular da planta em reconhecer a presença do patógeno e acionar o gatilho de defesa (Kover e Schaal, 2002).

Assim, para ocorrer a expressão da resistência da planta ao nematoide durante o processo de infecção, é necessário, primeiramente, a detecção desses parasitas por células do hospedeiro (Glazebrook, 1999; Smant e Jones, 2011). Para isso, os nematoides devem estar em quantidade suficiente para desencadear o reconhecimento das proteínas produzidas e secretadas pelas suas glândulas esofagianas, durante a tentativa do estabelecimento do parasitismo (Baum et al., 2007).

Na interação entre *M. incognita* e algodoeiro resistente, cultivar NemX, também foi relatado que o rendimento obtido por essa foi semelhante ao de uma cultivar suscetível, quando submetida à densidades populacionais mais baixas, já que houve a reprodução do nematoidennessas condições (Ogallo et al., 1999). Além disso, em outras interações envolvendo outros patógenos, como *Pseudomonas syringae* x *Arabidopsis thaliana*, observa-se que a eficácia da resistência ou tolerância do hospedeiro é maximizada em densidades maiores de infecção (Dunning, 2008; Gao et al., 2009).

Contudo, ainda são desconhecidos os mecanismos bioquímicos e genéticos que regulam o efeito da infecção dos patógenos no desenvolvimento e rendimento da cultura hospedeira (Glazebrook, 1999; Warren et al., 1999). Como a resistência e a tolerância parecem ser eventos independentes, é possível que sejam regulados por mecanismos não correlacionados (Kover e Schaal, 2002), como já verificado para os acessos 'Lonren-1' e 'Lonren-2' de algodão, que foram considerados altamente resistentes a *Rotylenchulus reniformis* em testes realizados em campo e em casa de vegetação (Bell et al., 2009; 2014; Weaver et al., 2011; 2013). Entretanto, esses dois acessos mostraram-se intolerantes e hipersensíveis quando cultivados em áreas com alta densidade populacional de *R. reniformis*, ocasionando nanismo significativo e

perdas de produtividade (Bell et al., 2009; 2014; Nichols et al., 2010; Weaver et al., 2011; 2013).

Dessa forma, é imprescindível o conhecimento do limite de tolerância da cultura para definição de estratégias de manejo mais eficientes, objetivando-se evitar perdas tão acentuadas de rendimento ocasionadas por estes patógenos (Di Vito et al., 2007). Além disso, o papel da tolerância nas interações planta-patógeno parece ser ainda pouco explorado (Strauss e Agrawal, 1999), principalmente em monocotiledôneas.

Sendo assim, nossos resultados sugerem que a cultivar IPR Afrodite é resistente e pode ser considerada tolerante a *M. incognita*, uma vez que as variáveis de desenvolvimento avaliadas não foram significativamente reduzidas e permaneceram estáveis, mesmo quando essa cultivar foi submetida à altas densidades populacionais. Um mecanismo observado nesse trabalho e que possivelmente possa estar relacionado com essa tolerância de IPR Afrodite ao nematoide foi o incremento na MFR, quando submetida à densidade populacional de 2,0 Nema.cm<sup>-3</sup> de solo. Isso porque as plantas que possuem maiores sistemas radiculares podem tolerar mais a presença dos nematoides, pela emissão de novas raízes saudáveis e com capacidade normal de absorção (Greco e Di Vito, 2009).

À luz dos fatos acima mencionados, observa-se que, além do benefício imediato da resistência, reduzindo a população dos nematoides a níveis abaixo do limiar econômico, soma-se a tolerância a *M. incognita* na cultivar IPR Afrodite, minimizando a supressão do desenvolvimento e, conseqüentemente, da produtividade da aveia. Portanto, esta cultivar de aveia branca torna-se uma excelente alternativa em programas de rotação e/ou sucessão com outras culturas que sejam suscetíveis a *M. incognita*. Quando integrado seu uso a outras ferramentas igualmente relevantes de manejo, os resultados são notavelmente melhores.

## 1.7 LITERATURA CITADA

Abad, P., et al. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26: 909 – 915.

Abawi, G. S., Mullin, B. A., Mai, W. F. 2005. Diseases caused by nematodes. Pp. 52 – 57 in Schwartz, H. F., Steabman, J. R., Hall, R., Forster, R. L., ed. *Compendium of bean diseases* 2 ed. Saint Paul: American Phytopathological Society.

Auguie, B. 2017. GridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics. R package version 2.3. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=gridExtra>.

Barker, K. R. e Olthof, T. H. A. 1976. Relationships between nematode population densities and crop responses. *Annual Review of Phytopathology* 14:327 – 353.

Baum, T. J., Hussey, R.S., e Davis, E.L. 2007. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. *Genetic Engineering* 28:17 – 43.

Bell, A. A., Starr, J. L., Jones, J. E., Lemon, R., Nichols, R. L., Overstreet, C., Stelly, D. M. 2009. Nematode resistant and agronomic performance of Lonren- and Nemstack lines. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences Memphis, TN: National Cotton Council of America* 1: 178 – 200.

Bell, A. A., Robinson, A. F., Quintana, J., Dighe, N. D., Menz, M. A., Stelly, D. M., Zheng, X., Jones, J. E., Overstreet, C., Burriss, E., Cantrell, R. G., e Nichols, R. L. 2014. Registration of Lonren-1 and Lonren-2 germplasm lines of upland cotton resistant to reniform nematode. *Journal of Plant Registrations* 8:187 – 190.

Benjamini, Y. e Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57: 289 – 300.

Blok, V., Jones, J., Phillips, M., e Trudgill, D. 2008. Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays* 30: 249 – 259.

Boneti, J. I. S., e Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:553 – 553.

Borges, D. C., Machado, A. C. Z., e Inomoto, M. M. 2010. Reação de aveias a *Pratylenchus brachyurus*. *Tropical Plant Pathology* 35: 178 – 181.

Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., De Almeida Engler, J., Abad, P., Rosso, M. N., e Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104 – 113.

Carneiro, R. G., Mazzafera, P., e Ferraz, L. C. C. B. 1999. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Journal of Nematology* 31:348 – 355.

Carneiro, R. M. D., e Almeida, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira* 25: 35 – 44.

Castillo, P., Di Vito, M., Vovlas, N., e Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Host-parasite relationships in root-knot disease of white mulberry. *Plant Disease* 85: 277 – 281.

Charegani, H., Majzoob, S., Hamzehzarghanil, H., e Karegar-Bide, A. 2012. Effect of various initial population densities of two species of *Meloidogyne* on growth of tomato and cucumber in greenhouse. *Nematologia Mediterranea* 40:129 – 134.

Chitwood, D. J., e Perry, R. N. 2009. Reproduction, physiology and biochemistry. Pp. 182 – 200 in Perry, R. N., Moens, M., e Starr, J. L., ed. *Root-knot nematodes*. Cambridge: CABI International.

Crozzoli, R., Greco, N., Suarez, A. C., e Rivas, D. 1997. Patogenicidad del nematodo agallador, *Meloidogyne incognita*, em cultivares de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata*. *Nematropica* 27: 61 – 67.

Davis, E. L., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., e Baum, T. J. 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 360 – 366.

Deepayan, S. 2008. Lattice: Multivariate Data Visualization with R. *Journal of Statistical Software* 25: 1 – 3.

Deepayan, S. e Felix, A. 2016. LatticeExtra: Extra Graphical Utilities Based on Lattice. R package version 0.6-28. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=latticeExtra>.

Di Vito, M., Greco N., e Carella, A. 1986. Effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on the yield of eggplant. *Journal of Nematology* 18: 487 – 490.

Di Vito, M., Parisi, B., e Catalano, F. 2004. Effect of population densities of *Meloidogyne incognita* in common bean. *Nematologia Mediterranea* 32: 81 – 85.

Di Vito, M., Parisi, B., Carboni, A., Ranalli, P., e Catalano, F. 2005. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to Italian populations of four species of *Meloidogyne*. *Nematologia Mediterranea* 33: 19 – 23.

Di Vito, M., Parisi, B., e Catalano, F. 2007. Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Nematropica* 37: 339 – 344.

Dunning, M. 2008. Host genotype and populations structure in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its natural bacterial pathogens. Ph.D. Thesis, University of Chicago.

Faske, T. R., e Starr, J. L. 2009. Reproduction of *Meloidogyne marylandi* and *M. incognita* on several *Poaceae*. *Journal of Nematology* 41: 2 – 4.

Gao, L., Roux, F., e Bergelson, J. 2009. Quantitative fitness effects of infection in a gene-for-gene system. *New Phytologist* 184: 485 – 494.

Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Biotic Interactions* 2: 280 – 286.

Greco, N., e Di Vito, M. 2009. Population Dynamics and Damage Levels. Pp. 246 – 274 in Perry, R. N., Moens, M., e Starr, J. L., ed. *Root-knot nematodes*. Cambridge: CABI International.

Hartman, K. M., e Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of different al host testand perineal-patternmorphology. Pp. 69 – 77 in Barker, K. R., Carter, C. C; Sasser, J. N., ed. *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Methodology*. Raleigh: North Carolina State University Graphics.

Hothorn, T., Bretz, F., e Westfall, P. 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50: 346 – 363.

Højsgaard, S., e Halekoh, U. 2016. doBy: Groupwise Statistics, LSmeans, Linear Contrasts, Utilities. R package version 4.5-15. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=doBy>.

Huang, G. Z., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., e Hussey, R. S. 2006a. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitismo gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 14302 – 14306.

Huang, G. Z., Dong, R. H., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., e Richard, S. H. 2006b. A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19: 463 – 470.

Kover, P. X., e Schaal, B. A. 2002. Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. PNAS 99: 11270 – 11274.

Li, S. M., Mao, Z. C., Li, L., Feng, D. X., Yang, Y. H., e Xie, B.Y.2008. Isolation of WRKY Genes in the Incompatible Interaction Between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. Acta Horticulturae Sinica 35: 1467 – 1472.

Lilley, C. J., Kyndt, T., e Gheysen, G. 2011. Nematode-resistant/tolerant GM crops in industrialised and developing countries. Pp. 517 – 541 in Jones, J., Gheysen, G., e Fenoll, C., ed. Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. Netherlands: Springer.

Machado, A. C. Z., Dadazio, T., Marini, P. M., e Silva, S. A. 2014. Patogenicidade comparativa de *M. incognita* e *M. javanica* em feijão in Anais do 11 Congresso Nacional De Pesquisa De Feijão- Tecnologias para a sustentabilidade da cultura do feijão. Londrina: Anais.

Machado, A. C. Z., Silva, S. A., Dorigo, O. F., Riede, C. R., e Garbuglio, D. D. 2015. Phenotypic Variability and Response of Brazilian Oat Genotypes to Different Species of Root Knot and Lesion Nematodes. European Journal of Plant Pathology 141: 111 – 117.

Maleita, C. M. N., Curtis, R. H. C., Powers, S. J, Abrantes, I. M. O. 2012. Inoculum levels of *Meloidogyne hispanica* and *M. javanica* affect nematode reproduction, and growth of tomato genotypes. Phytopathology Mediterranea 51: 566 – 576.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

Marini, P. M., Garbuglio, D. D., Dorigo, O. F., e Machado, A. C. Z. 2016. Histological characterization of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Avena sativa*. Tropical Plant Pathology 41: 203 – 209.

Melakeberhan, H., e Ferris, H. 1988. Growth and energy demand of *Meloidogyne incognita* on susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. Journal of Nematology 20: 545 – 554.

Motta, F. C., Alves. G. C. S., Giband, M., Gomes, A. C. M. M., Souza, F. R., Mattos, V. S., Barbosa, V. H. S., Barroso, P. A. V., Nicole, M., Peixoto, J. R., Rocha, M. R., e Carneiro, R. M. D. G. 2012. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. Plant Pathology 62:1173 – 1183.

Nguyễnet, P.V., Bellafiore, S., Petitot, A.-S., Haidar, R., Bak, A., Abed, A., Gantet, P., Mezzalira, I., Engler, J. A., e Fernandez, D. 2014. *Meloidogyne incognita* – Rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice* 7: 1 – 13.

Nichols, R. L., Bell, A., Stelly, D., Dighe, N., Robinson, F., Menz, M., Starr, J., Agudelo, P., Jones, J., Overstreet, C., Burriss, E., Cook, C., Lemon, R., e Fang, D. 2010. Phenotypic and genetic evaluation of Lonren- germplasm. Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences Memphis, TN: National Cotton Council of America 1:798 – 799.

Ogallo, J. L., Goodell, P. B., Eckert, J., e Roberts, P. A. 1999. Management of root-knot nematodes with resistant cotton cv. NemX. *Crop Science* 39: 418 – 421.

Oostenbrink, M. 1966. Major characterists of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouw hogeschool* 66: 3 – 46.

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. e R Core Team. 2017. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-131. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>.

Proite, K., Carneiro, R., Falcão, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimarães, P., e Bertioli, D. 2008. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology* 57: 974 – 980.

R Development Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Roberts, P. A. Concepts and consequences of resistance. 2009. Pp. 23 – 41 in Starr, J. L., Cook, R., e Bridge, J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford: CAB International.

Sasanelli, N. 1994. Tables of nematode-pathogenicity. *Nematologia Mediterranea* 22: 153 – 157.

Seinhorst, J. W. 1965. The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica* 11: 137 – 154.

Sikkens, R. B., Weaver, D. B., Lawrence, K. S., Moore, S. R., e Van Santen, E. 2011. Lonren upland cotton germplasm response to *Rotylenchulus reniformis* inoculum level. *Nematropica* 41: 68 – 74.

Sikora, R. A., Greco, N., e Silva, J. F. V. 2005. Nematode parasite of food legumes. Pp. 259 – 318 in Luc, M.; Sikora, R. A.; Bridge, J., ed. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford: CABI Publishing.

Smant G., e Jones J. 2011. Suppression of plant defences by nematodes. Pp. 273 – 286 in Jones J., Gheysen G., Fenoll C., ed. Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Berlin: Springer.

Strauss, S. Y., e Agrawal, A. A. 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Tree* 14: 179 – 185.

Trudgill, D. L., e Blok, V. C. 2001. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39: 53 – 77.

Warren, F. R., Merritt, P. M., Holub, E. e Innes, R. W. 1999. Identification of three putative signal transduction genes involved in R gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* 152: 401 – 412.

Weaver, D. B., Sikkens. R. B., Sharpe, R. R., Moore, S. R., e Lawrence, K. S. 2011. Lonren- x FM966 progeny evaluation in a field infested with reniform nematodes. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*. Memphis, TN: National Cotton Council of America 1: 737 – 741

Weaver, D. B., Sikkens, R. B., Lawrence, K. S., Sürmelioglu, Ç., van Santen, E., e Nichols, R. L. 2013. *REN<sup>lon</sup>* and its effects on agronomic and fiber quality traits in upland cotton. *Crop Science* 53: 913 – 920.

Wickham, H. 2007. Reshaping data with the reshape package. *Journal of Statistical Software*, 21: 1 – 25.

Wickham, H. 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 40: 1 – 29.

Wondafrash, M., Van Dam, N. M., e Tytgat, T. O. G. 2013. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. *Frontiers in Plant Science* 4: 1 – 15.

Zeviani, W. 2015. wzRfun: Walmes Zeviani functions. Rpackage version 0.61. Disponível em: <https://github.com/walmes/wzRfun>.



## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE AVEIA BRANCA A *Meloidogyne incognita* POR MEIO DE ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA**

(artigo redigido conforme normas da revista *Phytopathology*)

## 2.1 RESUMO

*Meloidogyne incognita* é considerado um dos nematoides de maior importância econômica em termos mundiais. Para seu adequado manejo, uma das estratégias mais eficientes é o uso de cultivares resistentes. Portanto, estratégias para otimizar os programas de melhoramento genético utilizando-se ferramentas moleculares são necessárias. A análise de expressão gênica tem ampliado a compreensão dos mecanismos de interação planta-nematoide e acelerado o desenvolvimento de genótipos resistentes. Em vista disso, foi estudado o comportamento de genes candidatos que regulam a resistência em aveia, desafiados com densidades populacionais iniciais crescentes de *M. incognita*, durante o seu estabelecimento e manutenção do parasitismo. Assim, plântulas de IPR Afrodite, resistente a *M. incognita*, e URS Torena, suscetível, foram transplantadas para vasos de 600 cm<sup>3</sup>, mantidas em sala de cultivo climatizada e inoculadas com 0; 31; 62; 125; 250 e 500 exemplares de *M. incognita*/ vaso. A avaliação foi realizada aos 0 (imediatamente antes da inoculação), 2 e 9 dias após a inoculação. O RNA total das raízes de cada parcela foi extraído, para análise dos genes candidatos, tendo os genes *As-Actin* e *18S* como controles endógenos. A partir de reações de RT-qPCR, verificou-se que dois genes (*Lrk 14* e *LOX*) apresentaram regulação em resposta ao nematoide e padrões de regulação diferenciados entre as cultivares. IPR Afrodite apresentou estratégias moleculares contrastantes às observadas em URS Torena, sugerindo-se que há regulação tardia e negativa em URS Torena, enquanto que, em IPR Afrodite, *Lrk14* atuou como amplificador de respostas de defesa inicial, prolongando o sinal de ameaça após a detecção inicial do patógeno. O gene que codifica *LOX* foi desencadeado, como resposta induzida por efetores, o que geralmente resulta em reação de hipersensibilidade, como já observado em trabalhos anteriores envolvendo tal interação. Tais resultados, inéditos para a Nematologia, serão bastante úteis para os programas de melhoramento genético da aveia com foco na resistência a nematoides, além de servirem como base para o estudo envolvendo a relação de outras espécies de plantas com os nematoides das galhas.

**Palavras-chave:** *Avena sativa*, resistência, expressão gênica.

## 2.2 ABSTRACT

*Meloidogyne incognita* is considered one of the main economically important nematodes worldwide. For its management, the use of resistant cultivars is amongst the more efficient strategies. Therefore, strategies to optimize genetic breeding programs using molecular tools are necessary. The gene expression analysis has amplified the comprehension about the mechanisms involved in the plant-nematode interaction and accelerated the development of resistant genotypes. In face of this, the behavior of candidate genes regulating the resistance reaction in oat was studied, challenged with crescent initial population densities of *M. incognita*, during its establishment and parasitism maintenance. For this, IPR Afrodite seedlings, resistant to *M. incognita*, and URS Torena, susceptible, were transplanted to 600 cm<sup>3</sup>-pots, maintained in a controlled growth chamber and inoculated with 0; 31; 62; 125; 250; and 500 exemplars of *M. incognita*/ pot. Evaluation was done at 0 (immediately before inoculation), 2 and 9 DAI. The total RNA from roots was extracted to the analysis of candidate genes related to defense mechanisms, with *As-Actin* and *18S* as endogenous controls. From RT-qPCR reactions, we could verify that two genes (*Lrk* and *LOX*) were regulated in response to nematode and that different regulatory patterns were observed between cultivars. IPR Afrodite showed molecular strategies contrasting to those observed in URS Torena, suggesting a late and negative regulation in URS Torena, while in IPR Afrodite, *Lrk14* acted as an amplifier of initial defense responses, prolonging the threat signal after the initial detection of the pathogen. The gene that codifies to *LOX* was unleashed, as a response induced by effectors, which usually results in a hypersensitive reaction, as observed previously. Present results, inherited to Nematology, will be very useful to oat breeding programs focusing nematode resistance, besides serving as a base to studies involving the relationships between other plants and root-knot nematodes.

**Keywords:** *Avena sativa*, resistance, gene expression.

### 2.3 INTRODUÇÃO

As perdas ocasionadas por nematoides parasitas de plantas chegam a mais de US\$ 157 bilhões anualmente (Abad et al. 2008). As espécies do gênero *Meloidogyne* constituem o grupo de maior importância econômica em nível mundial, com destaque para *M. incognita*. O sucesso desse patógeno deve-se à sua ampla distribuição geográfica e vasta gama de hospedeiros (Taylor e Sasser 1983; Agrios 2005), além de causar perda média anual de 5% nas culturas em todo mundo (Hussey e Janssen 2002).

O uso de cultivares resistentes é um dos métodos de manejo mais eficientes, visando-se evitar perdas ocasionadas por esses patógenos (Roberts 2009). Entretanto, como o desenvolvimento de uma cultivar com elevados níveis de resistência demanda grande período de tempo (Caromel e Gebhardt 2011), estratégias para agilizar ou melhor direcionar os programas de melhoramento genético, principalmente utilizando-se ferramentas moleculares, são sempre necessárias. Tais ferramentas, como a análise de expressão gênica durante a infecção do nematoide na planta, têm ampliado consideravelmente a compreensão dos mecanismos de interação planta-nematoide e acelerado o desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da resistência das plantas (Xiao et al. 2013; Nguyễn et al. 2014).

Sabe-se que, durante o processo de infecção, os nematoides induzem mudanças na expressão gênica tanto no local de infecção quanto nas outras partes da planta (Li et al. 2008). A expressão da resistência da planta ao nematoide após a penetração envolve, primeiramente, a detecção do nematoide por células da mesma, que reconhecem as proteínas produzidas e secretadas pelas glândulas esofagianas do patógeno e que interagem diretamente com as moléculas do hospedeiro (Baum et al. 2007), num modelo do tipo elicitor-receptor. Esse reconhecimento do nematoide pelo hospedeiro é uma etapa primordial e a primeira linha de defesa ativa das plantas.

A próxima fase inclui uma sucessão de eventos de regulação gênica e modificações bioquímicas que são iniciadas com o processo de sinalização, mediada por compostos como etileno (ET)/ ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS), que resultam na expressão de genes de defesa da planta e, eventualmente, conduzem à produção de moléculas associadas à resistência (Dixon e Paiva 1995; Smith 1996), prevenindo o desenvolvimento do nematoide. Tais eventos foram observados

nainteração entre *M. graminicola* e arroz, em que ficou demonstrado que a resistência é controlada pelas vias de sinalização de AS, AJ e ET, sendo levemente reprimida após a infecção por esse nematóide (Nahar et al. 2011). Além disso, a interação entre hospedeiros resistentes e *Meloidogyne* spp. frequentemente está associada, direta ou indiretamente, à reação de hipersensibilidade (*Hypersensitivity Response- HR*) (Moffett et al. 2002), que também resulta em alterações da expressão gênica (Davis et al. 2008).

Em vista disso, alguns autores sugerem que os mecanismos de resistência das plantas a *M. incognita* são conservados ao longo da patogenicidade, tanto em dicotiledôneas quanto em monocotiledôneas (Bellafiore e Briggs 2010; Rosso et al. 2012). Entretanto, outras interações evidenciaram diferenças no padrão de expressão de genes de resistência em diferentes espécies de plantas (Lu et al. 2006; Mei et al. 2006; Schweizer et al. 1997), como salientado no modelo proposto de interação *M. incognita* – arroz (Nguyễn et al. 2014). Contudo, as informações que se tem a respeito da interação entre nematoides e monocotiledôneas são escassas, bem como do efeito da densidade populacional de nematoides na regulação de genes relacionados à defesa de plantas.

Frente ao panorama exposto, sabe-se que a cultivar de aveia branca IPR Afrodite apresenta resistência aos principais nematoides de galhas (Machado et al. 2015). Além disso, estudos histopatológicos comprovaram diferenças durante o desenvolvimento e estabelecimento do parasitismo de *M. incognita* entre as interações compatíveis e incompatíveis, evidenciando o papel da HR como provável mecanismo de resistência de IPR Afrodite ao nematoide (Marini et al., 2016). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar o comportamento de genes candidatos que regulam a resistência e/ou suscetibilidade em tecidos radiculares de aveia branca desafiados com densidades populacionais iniciais crescentes de *M. incognita*, durante o seu estabelecimento e manutenção do parasitismo.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

*Multiplicação e manutenção de M. incognita:* População proveniente do município de Altônia, Paraná, coletada a partir de raízes de café cv. Apatã, foi identificada por meio de eletroforese de isoenzimas ( $\alpha$ -esterase) (Carneiro e Almeida 2001) e padrões

morfológicos da região perineal de fêmeas (Hartman e Sasser 1985). Em seguida, uma única massa de ovos foi inoculada e mantida para multiplicação em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara, planta em que a população tem sido mantida desde então, sob condições de casa de vegetação.

*Obtenção das plantas e inoculação:* Foram utilizadas cultivares de aveia branca (*Avena sativa* L.) previamente identificadas como resistente (IPR Afrodite) e suscetível (URS Torena) a *M. incognita* (Machado et al. 2015). Além disso, ambas as cultivares foram caracterizadas histopatologicamente por Marini et al. (2016), em relação a *M. incognita*. Assim, sementes das cultivares foram tratadas com fungicida Derosal Plus® (300 ml p.c./100kgsementes) e, em seguida, uma única semente foi depositada em cada célula de bandejas de poliestireno expandido, preenchidas com substrato comercial Plantmax®.

Cinco dias após a germinação, as plântulas com desenvolvimento uniforme foram selecionadas e transplantadas para vasos de 600 cm<sup>3</sup>, distribuindo-se três plântulas por vaso de maneira equidistante. Para isso, os vasos foram previamente preenchidos com 500 cm<sup>3</sup> de substrato (58% de areia, 8% de silte e 34% de argila), esterilizado por calor a seco (160 °C por 5 horas), com adição de 3 g de Osmocote® (15% N, 9% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 12% de K<sub>2</sub>O, 1% de Mg, 2,3% S, 0,05% de Cu, 0,45% de Fe, 0,06% Mn, 0,02% de Mo) por vaso.

As plantas foram mantidas em sala de cultivo climatizada, com temperatura de 24°C e fotoperíodo de 16h, por sete dias, para propiciar melhor desenvolvimento inicial das plantas. Em seguida, a temperatura foi ajustada para 25°C no momento da inoculação, sendo assim mantida durante todo o restante do período experimental. O inóculo utilizado foi extraído das raízes de tomate pelo método descrito por Boneti e Ferraz (1981). Após a extração, inoculou-se alíquota de 1 mL da suspensão de nematoides, contendo ovos + juvenis J2, que foi previamente calibrada para densidades populacionais crescentes de 31; 62; 125; 250 e 500 espécimes de *M. incognita* planta. A inoculação foi realizada pela pipetagem da suspensão contendo as densidades populacionais, em orifício feito no solo, distanciado 1 cm do colo das plantas, com aproximadamente 2 cm de profundidade, sendo, posteriormente, fechados. Plantas sem inoculação do nematoide foram utilizadas como testemunhas, depositando-se apenas 1 mL de água por planta, respeitando-se as mesmas condições.

As plantas foram avaliadas aos 0 dias (imediatamente antes da inoculação), 2 e 9 dias após inoculação (DAI), definidos com base em estudos preliminares e de acordo com Marini et al. (2016). Em cada data, avaliou-se, simultaneamente, as seis densidades de inóculo para cada cultivar em relação à eficiência de infecção dos juvenis de *M. incognitae* à expressão gênica diferencial.

*Eficiência de infecção de juvenis de M. incognita:* Aos 2 e 9 DAI, cinco parcelas de cada tratamento foram coletadas, eliminando-se todo solo. Assim, as raízes foram lavadas em água corrente e submetidas à coloração dos juvenis, a partir da metodologia proposta por Byrd et al. (1983). Para tal, primeiramente, as raízes passaram por um processo de clarificação por submersão em solução de NaOCl 2,5% + água (3:5, v:v), por 6 min. Posteriormente, foram lavadas em água corrente sobre peneira de malha de nylon (500 mesh de abertura), para retirada de quaisquer resíduos de NaOCl, evitando-se a perda de pedaços radiculares. Depois, foram embebidas em água por 15 minutos, sob constante agitação. Para a coloração, essas foram imersas em solução contendo 30 ml de água + 1 ml de fucsina acidificada e submetidas à fervura por 60 segundos em forno micro-ondas. Após esse processo, as raízes foram lavadas em água corrente, recobertas por glicerina acidificada e mantidas a 10°C.

Todo o sistema radicular de cada parcela foi separado e montado em lâminas de microscopia, para visualização em microscópio de luz, utilizando-se a objetiva de 10 X. Nesse processo, procedeu-se a contagem dos indivíduos dentro das raízes das plantas de aveia e a diferenciação dos estádios de desenvolvimento de *M. incognita*, para confirmação da infecção desse patógeno em cada tratamento.

*Extração de RNA total das raízes e síntese de cDNA:* Em cada data de avaliação, cinco parcelas de cada tratamento foram utilizadas para extração do RNA total. Para isso, cada vaso foi imerso em água, para remoção do solo, sem agressão às raízes, que foram, em seguida, cuidadosamente lavadas em água corrente, secas em papel absorvente e, imediatamente, seccionadas da parte aérea e colocadas em nitrogênio líquido, para posterior armazenagem em ultrafreezer, a -80°C, até o seu processamento.

As raízes de cada parcela foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de cadinho e pistilo de porcelana, previamente tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) visando à degradação de RNAses presentes. Imediatamente após, procedeu-se a extração do RNA total utilizando-se o reagente TRIzol® (Life Technologies™), de acordo com as

recomendações do fabricante. Por fim, os *pellets* obtidos das amostras foram ressuspensos com 3 U da enzima DNase I (Invitrogen®) + água DEPC 0,01% autoclavada.

A concentração e a qualidade das amostras de RNA total obtido foram estimadas por espectrofotometria, em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo), nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. Foram consideradas como amostras de boa qualidade apenas aquelas que apresentaram valores da razão de absorvância ( $A_{260}/A_{280}$ ) entre 1,8 e 2,1. Além disso, a integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,5%) contendo tampão TBE 1x (Figura 3). Para as amostras que não atenderam tais pressupostos, iniciou-se novamente os processos até satisfação dos critérios de qualidade.

A reação da transcriptase reversa foi sintetizada a partir de 2 µg/µL de RNA total, para obter-se um volume final de 20 µL, utilizando-se 1 µL de *Transcriptase reversa SuperScript III* (Life Technologies™) e Oligo dT 12- 18 (10 µM), de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi diluído em água Milli-Q estéril e livre de RNases, na proporção de 1:5, para as análises posteriores.

*Seleção e validação de primers:* Os genes candidatos utilizados em RT-qPCR foram selecionados com base em estudos da interação *Meloidogyne* spp. e arroz (Nguyễn et al. 2014; Kumari et al. 2016). De maneira geral, 43 pares de *primers* específicos foram selecionados por atuarem nos mecanismos de defesa das plantas a esses patógenos. Tais genes mostram-se envolvidos nas etapas de imunidade inata, sinalização de AS, resposta de AJ, biossíntese de ET, fatores de transcrição, genes marcadores de SAR (*Systemic Acquired Resistance*) e de defesa estrutural. Visando-se obter maior robustez na análise, além dos genes associados à resposta de defesa, foram também selecionados alguns para a normalização dos dados de RT-qPCR.

A especificidade e homologia com o genoma de *Avena sativa* L. foram verificadas por meio do algoritmo *BLAST*, verificando se o pareamento total ocorria apenas com o gene de interesse, optando-se por aqueles que apresentaram os menores *E-value*. Assim, os genes foram desenhados com aproximadamente 20 nucleotídeos,  $T_M$  de 60°C e tamanho do amplicon entre 90 a 150pb. Além disso, quando possível, utilizou-se como molde a junção éxon-éxon, para evitar contaminação com DNA genômico. Os *primers* para os genes desenhados foram sintetizados pela empresa INDUSLAB LTDA, utilizando-se nucleotídeos da marca Invitrogen®.

Todos os *primers* foram validados por meio de PCR convencional, considerando-se a amplificação correta e tamanho do amplicon esperado. Aferiu-se as melhores condições para sua especificidade, ajustando concentrações de *primers*, temperaturas de anelamento, número de ciclos e tempo de extensão ideal para cada um. Assim, os *primers* que não obtiveram especificidade na reação de amplificação foram descartados.

As reações foram preparadas com tampão 10X de reação, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix, 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen®), 0,4 µM dos *primers forward* e *reverse* e água Milli-Q para obtenção do volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, seguidos de 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A visualização dos produtos amplificados foi feita em gel de agarose 1,5%, formulado com TAE 1X e brometo de etídio, sob luz UV. Todas as reações incluíram amostra branco (reação sem cDNA), em duplicata, como controle para verificação de amplificações inespecíficas e contaminações.

Após os ajustes feitos por meio da validação em PCR convencional, realizou-se seleção dos genes que apresentaram diferenças de regulação entre os tratamentos por PCR semi – quantitativa (RT- PCR). Para isso, as amplificações foram realizadas respeitando-se as mesmas condições de concentração de reagentes e reação determinadas anteriormente.

*Avaliação dos genes normalizadores:* Para normalização dos dados de RT-qPCR, foi realizada avaliação de diferentes genes utilizados como normalizadores. Porém, não foram encontrados na literatura genes de referência que fossem comprovadamente estáveis na interação entre plantas de aveia e nematoides de galhas. Dessa forma, os genes candidatos utilizados neste estudo foram *AsActin* (F5' – CCTGATGGGCAGGTGATCAC – 3'; R5' – CAGCAGCTTCCATACCAATGAA – 3'); *18SrRNA* (F5' – AAACGGCTACCACATCCAAG – 3'; R5'- GCGCCCGGTATTGTTAT TTA – 3'); *GAPDH* (F5' – TGTCCATGCCATGACTGCAA – 3'; R5' – CCAGTG CTGCTTGAATGATG – 3'); *TUBB* (F5' – CAAGGAGGTGGACGAGCAGATTG – 3'; R5' – GACTTGACGTTGTTGGGGATCCA – 3') e *TUBA* (F5' – TTCGCCCGTGGTC ATTACA – 3'; R5' – GCATTGAAGACAAGGAAGCCC – 3'). Todos esses genes foram previamente identificados como estáveis em trabalhos envolvendo a interação entre outras monocotiledôneas e *M. incognita*, *M. graminicola* e vírus *BYDV* (*Barley Yellow Dwarf Virus*) (Jarosová e Kundu 2010; Nguyễn et al. 2014; Kumari et al. 2016).

*Análise diferencial de expressão de genes candidatos por RT-qPCR:* As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas de 96 poços no sistema de detecção de sequências do *ViiA™ 7* (Applied Biosystem®), utilizando-se *SYBR Green* como detector. As reações foram realizadas utilizando-se 7,5µl de *Master Mix SYBR Green* (Life Technologies™), *primers* específicos na concentração de 200nM e 1µl de cDNA, totalizando 15µl de reação. Foram realizadas duas repetições técnicas para cada parcela, incluindo o branco, para cada gene e reação preparada.

As condições de ciclagem foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos e 72°C por 15 segundos. A especificidade da amplificação foi determinada por um programa de curva de dissociação adicional em cada reação, através do aquecimento de 60°C para 95°C, subindo 1°C por minuto. Esse procedimento foi utilizado para verificar a ausência de contaminação ou da formação de possíveis *primers-dimers* nas reações.

Para isso, fez-se necessária a determinação prévia da concentração ideal dos *primers* que foram selecionados para RT-qPCR. Em seguida, estimou-se a eficiência de amplificação para cada par de *primers*, determinada por meio de reações preparadas com um *pool* de cDNA diluído em série (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32). Assim, ao final de cada reação, a curva de eficiência para cada gene gerou um valor de inclinação (*slope*) dos pontos. Com base nesse valor, a eficiência foi calculada pela fórmula  $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$ . Por conseguinte, selecionou-se apenas aqueles que obtiveram valores entre 90 a 110% (Tabela 1) (Applied Biosystems1997).

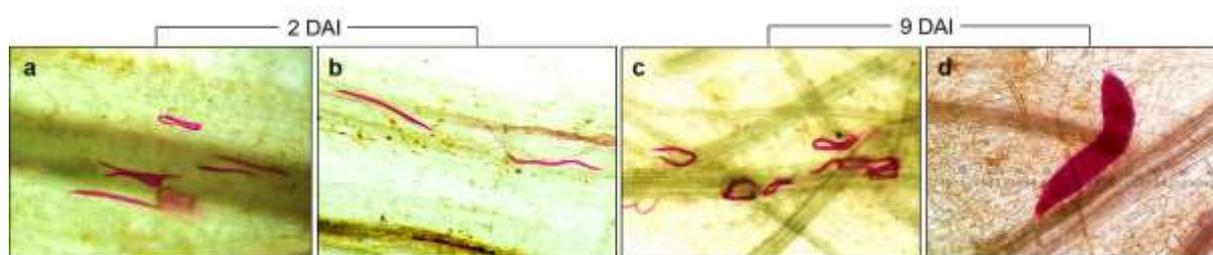
Para a determinação dos valores da expressão gênica relativa de cada tratamento, os valores médios de Ct obtidos foram analisados e comparados quanto ao seu comportamento entre os tratamentos. Os níveis de expressão foram calculados utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(end\ ógeno)}$  e  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(inoculada)} - \Delta Ct_{(controle)}$ . As plantas não inoculadas foram utilizadas como controle. A partir desses resultados, realizou-se a análise estatística para verificação do comportamento dos genes estudados quando submetidos à interação desses fatores.

*Delineamento experimental e Análise estatística:* O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial triplo, com três datas de avaliação, duas cultivares e seis concentrações de inóculo (3x2x6). Cada unidade experimental foi representada por um vaso contendo um *bulk* de três plantas. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos (*Shapiro-Wilk*) e homogeneidade de variâncias (*Bartlett*). Para ajuste do modelo, a variável resposta foi transformada

conforme indicação BoxCox. Quando houve diferença mínima significativa, procedeu-se o desdobramento dos fatores e as médias foram comparadas por Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## 2.5 RESULTADOS

O parasitismo de *M. incognita* nas cultivares IPR Afrodite e URS Torenna foi confirmado, em todas as densidades populacionais, tanto aos 2 quanto aos 9 DAI, uma vez que juvenis foram observados em seus tecidos radiculares (Figura 1). De maneira geral, quando comparada à IPR Afrodite, a cultivar URS Torenna apresentou menor número de juvenis penetrados aos 2 DAI. Aos 9 DAI, o número de juvenis presentes no sistema radicular da cultivar resistente manteve-se estável, em relação ao número observado aos 2 DAI, enquanto que, na cultivar suscetível, aumentou significativamente (Figura 2).



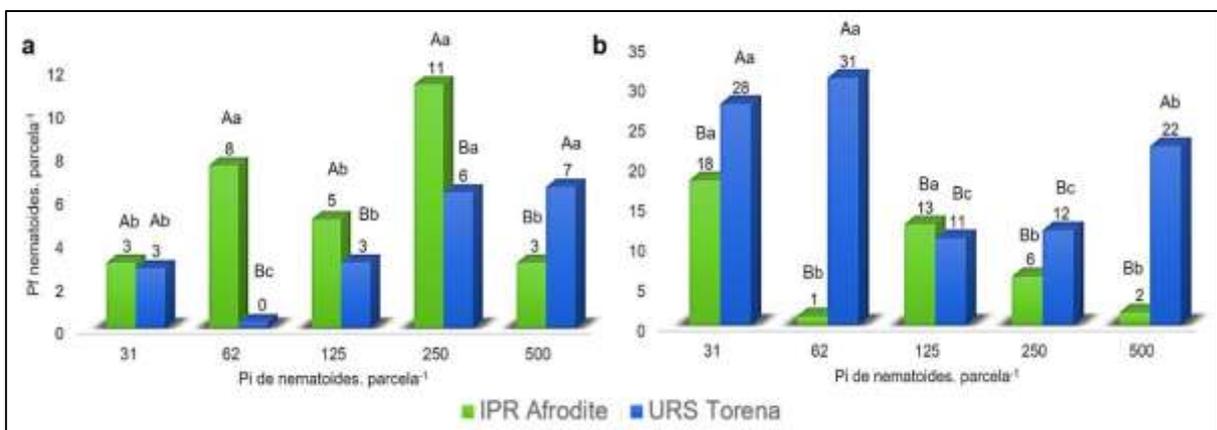
**Figura 1.** Coloração *in situ* de juvenis de *Meloidogyne incognita* no interior das raízes de aveia branca. a) juvenis pré-parasitas na cultivar IPR Afrodite; b) juvenis pré-parasitas na cultivar URS Torenna; c) juvenis pré-parasitas e parasitas na cultivar IPR Afrodite; d) juvenil J3 na cultivar URS Torenna.

Aos 2 DAI, apenas juvenis pré-parasitas (Figura 1 a, b) foram observados no interior das raízes de aveia, independente da cultivar. Já na avaliação realizada aos 9 DAI, na cultivar resistente, apenas juvenis pré-parasitas e parasitas foram encontrados (Figura 1 c), enquanto que, na suscetível, já havia a presença de J3 (Figura 1 d).

Ainda aos 2 DAI, na cultivar IPR Afrodite, a maior média de infecção foi de 11 juvenis pré-parasitas na densidade de 250 nematoides. parcela<sup>-1</sup>, enquanto que, na cultivar suscetível, a maior média (7 juvenis) foi encontrada na densidade de 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup> (Figura 2a). Foi observada queda acentuada no número de

nematoides presentes no interior das raízes de URS Torena na densidade de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, diferentemente da cultivar resistente.

Na avaliação realizada aos 9 DAI (Figura 2b), a maior média de infecção observada foi na densidade de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup> (31 juvenis parasitas e J3), em URS Torena, enquanto que, para IPR Afrodite, na densidade de 31 nematoides.planta<sup>-1</sup>(18 juvenis parasitas). Queda acentuada no número de nematoides presentes no interior das raízes de IPR Afrodite foi observada nas densidades de 62 e 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* presentes no interior de raízes de aveia branca resistente (IPR Afrodite) e suscetível (URS Torena), sob diferentes densidades populacionais do nematoide, aos 2 (a) e 9 (b) dias após a inoculação. \*\*\*Cada valor representa a média de cinco repetições. Dados não transformados para o teste de médias; médias seguidas pela mesma letra entre as colunas não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Tukey.

Após a confirmação da infecção e estabelecimento do parasitismo de *M. incognita* em ambas as cultivares, procederam-se as análises em RT-qPCR, considerando-se apenas as amostras que continham entre 125 a 1000 ng.µl<sup>-1</sup> de RNA total e que satisfizeram os critérios de qualidade pré-determinados, totalizando, dessa forma, 78 amostras, ou seja, três parcelas por tratamento. Essas foram compostas por RNA íntegro, com o perfil de bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 16S e 28S, bem como ausência de DNA genômico, como observado na Figura 3.



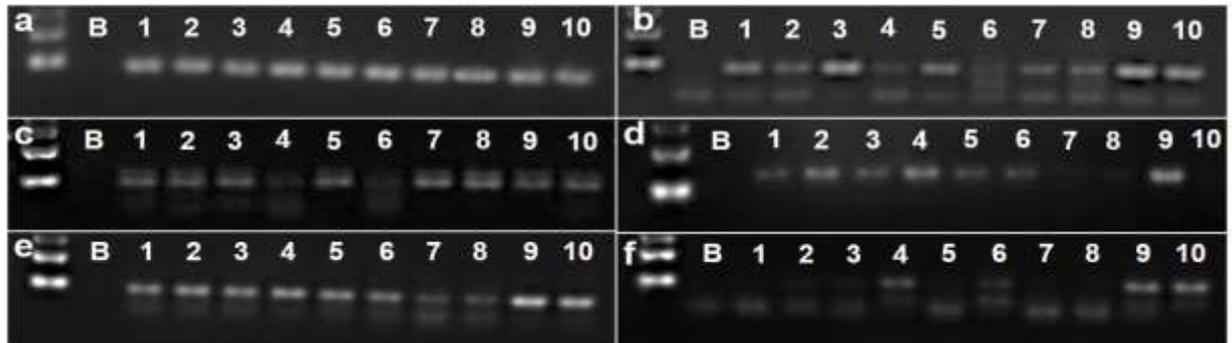
**Figura 3.** Gel de agarose 1,5% representando o perfil de bandas do RNA total de aveia branca cv. IPR Afrodite submetida a densidades populacionais crescentes de *Meloidogyne incognita* e em *time-course* de 2 dias após a inoculação. 1) testemunha, sem nematoide; 2) 31 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 3) 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 4) 25 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 5) 250 nematoides.parcela<sup>-1</sup>; 6) 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. Cada tratamento foi composto por um *pool* de RNA contendo todas as repetições.

A validação dos 43 *primers* dos genes candidatos relacionados à defesa a *M. incognita*, analisados em PCR convencional, permitiu selecionar 21 *primers* que mostraram especificidade de amplificação em aveia branca. Embora ajustes tenham sido feitos nas reações para todos os *primers*, não foi possível detectar bandas específicas para os demais genes (dados não apresentados).

Após a validação, para os estudos de expressão gênica em RT-qPCR, fez-se necessária a análise prévia dos *primers* por meio de PCR semi – quantitativa (Figura 4), para verificar se houve diferença de regulação na presença ou ausência do nematoide, nos diferentes períodos de avaliação. De posse desses resultados, 12 genes foram selecionados por apresentarem alguma resposta de expressão gênica diferencial frente aos tratamentos analisados. Somaram-se a estes os genes *AsActin* e *18S* como normalizadores, pois apresentaram-se estáveis, com o mesmo perfil e intensidade de bandas em todos os tratamentos analisados (Figura 4).

Determinou-se a eficiência de amplificação e a concentração ideal dos 14 *primers* para os genes selecionados para RT-qPCR. No entanto, para o controle endógeno *AsActin*, quatro pares de *primers* e suas respectivas combinações foram analisadas, não sendo possível encontrar uma combinação com eficiência para ser utilizada nesse estudo (dados não apresentados). Dessa forma, apenas os *primers* que codificam para os genes *18S*, *12S Globulin*, *Phy 3*, *Lipoxygenase*, *Lrk 9* e *Lrk14* apresentaram eficiência satisfatória entre 90-110% (Tabela 1). Os resultados de amplificação desses genes em qPCR estão apresentados na Figura 4. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada, utilizando-se o gene

18S como controle endógeno para determinação da expressão relativa dos demais genes candidatos.



**Figura 4.** PCR semi-quantitativa de genes candidatos associados à regulação de defesa de aveia branca em resposta a *Meloidogyne incognita* aos 0, 2 e 9 dias após a inoculação (DAI). a) 18S; b) 12S Globulin; c) Phy 3; d) LOX; e) Lrk 9 e f) Lrk 14. Os tratamentos estão representados por B) branco (Água Milli-Q); 1) IPR Afrodite, sem nematoide, 0 DAI; 2) IPR Afrodite, sem nematoide, 2DAI; 3) IPR Afrodite, com nematoide, aos 2 DAI; 4) IPR Afrodite, sem nematoide, aos 9 DAI; 5) IPR Afrodite, com nematoide, aos 9 DAI; 6) URS Torena, sem nematoide, 0 DAI; 7) URS Torena, sem nematoide, aos 2 DAI; 8) URS Torena, com nematoide, aos 2 DAI; 9) URS Torena, sem nematoide, aos 9DAI e 10) URS Torena, com nematoide, aos 9 DAI. \*Cada tratamento foi composto por um pool de cDNA contendo todas as repetições.

**Tabela 1.** Primers dos genes utilizados para os estudos de expressão de defesa em aveia branca e suas respectivas eficiências em RT-qPCR.

Gene	Acesso GenBank	Primers (5'-3')	Eficiência
18S	AH001576.2	F – AAACGGCTACCACATCCAAG R – GCGCCCGGTATTGTTATTTA	92%
12S Globulin	X76738.1	F – CAAGCGGGTGTCACTGAGTA R – GCCTTGAGGCTCGATAACAC	95%
Phy 3	M18822.1	F – TTGTCATGGCTGTTGTGGTT R - GGAGGCCCCATAGTTTCTTC	99,3%
LOX	JN390967.1	F - GAGGACTGACGAGGAGTTCCG R - CCGTACTTGCTAGGGTCGAG	99,1%
Lrk 9	AY083680.1	F – TGACATCAAGCCACACAACA R - ATACTTCGATCCCTGGCACA	91%
Lrk 14	AY083681.1	F – TTGTCATAGCCATCCTGCTG R - TGATGGTGGGCAGTATTTGA	108%

Reunindo os resultados obtidos pela quantificação da expressão gênica, podemos verificar diferentes perfis de expressão entre IPR Afrodite e URS Torena, o que sugere a existência de diferentes respostas de regulação nas interações compatível e incompatível, ao longo do tempo e frente às densidades populacionais

do nematoide. Tais diferenças foram detectadas em 2 (*LOX* e *Lrk14*) dos 5 genes candidatos utilizados nesse estudo (Figuras 5 e 6). Para os demais genes, *Lrk 9*, *Phy 3* e *12S Globulin*, não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si (dados não apresentados).

Quando comparada a expressão do gene que codifica para Lipoxygenase (*LOX*) com os controles utilizados em RT-qPCR, notou-se regulação contrastante para ambas as cultivares (Tabela 2), ao longo do tempo (Tabela 3), e em função das densidades populacionais iniciais de *M. incognita* (Tabela 4). Assim, para a cultivar IPR Afrodite os níveis transcricionais são independentes do tempo e independentes da densidade do inóculo inicial. Porém, observou-se tendência à indução, proporcional ao aumento da densidade, até os níveis intermediários. Isso porque, aos 2 DAI, quando submetidos à densidade de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, esse gene foi levemente induzido (Tabela 2). Logo após, ao aumentar a densidade populacional, a expressão desse gene retornou aos níveis basais. O mesmo comportamento foi observado aos 9 DAI. Entretanto, para este último, o maior nível de transcrição foi verificado na concentração de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>(Tabela 2), retornando aos níveis basais na sequência e sendo levemente reprimido nas densidades mais elevadas (Figura 5).

**Tabela 2.** Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

Pi	<i>LOX</i>					
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
	2 DAI			9 DAI		
0	1,209 Aa	-3,072 Bb	-0,931	1,486 Aa	0,184 Aa	0,835
31	-0,376 Aa	-1,169 Aa	-0,772	1,623 Aa	-0,983 Aa	0,320
62	0,857 Aa	-0,771 Aa	0,043	2,046 Aa	-3,655 Ba	-0,804
125	2,370 Aa	1,327 Aa	1,848	1,820 Aa	-5,380 Ba	-1,780
250	1,896 Aa	-0,029 Aa	0,933	-0,820 Aa	-0,498 Aa	-0,659
500	1,507 Aa	-5,933 Bb	-2,213	0,023 Aa	-1,465 Aa	-0,721
<b>Média</b>	1,243	-1,608		1,030	-1,966	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

Já a cultivar URS Torena apresentou regulação negativa de *LOX* no primeiro período avaliado (2 DAI), na ausência do nematoide. Em seguida, de maneira

proporcional ao aumento da densidade populacional, notou-se aumento nos níveis transcricionais até 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. Posteriormente, houve repressão significativa de *LOX* na maior densidade populacional (500). Aos 9 DAI, houve regulação positiva para as amostras controle, sem nematoide. Assim, verificamos que a presença do nematoide foi capaz de causar a repressão de *LOX* nas raízes da cultivar suscetível, independente da densidade populacional inicial de *M. incognita*. Quando comparadas as regulações ao longo do tempo, dentro da mesma densidade, observou-se diferença significativa apenas para a densidade do inóculo inicial de 125nematoides.parcela<sup>-1</sup>, o que sugere que a regulação, além de ser tardia, também é dependente da densidade de *M. incognita* na planta.

**Tabela 3.** Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>LOX</i>						
Pi	Afrodite			Torena		
	2 DAI	9 DAI	Média	2 DAI	9 DAI	Média
0	1,209 Aa	1,486 Aa	1,347	-3,072 Bb	0,184 Aa	-1,444
31	-0,376 Aa	1,623 Aa	0,623	-1,169 Aa	-0,983 Aa	-1,076
62	0,857 Aa	2,046 Aa	1,451	-0,771 Aa	-3,655 Ba	-2,213
125	2,370 Aa	1,820 Aa	2,095	1,327 Aa	-5,380 Ba	-2,026
250	1,896 Aa	-0,820 Aa	0,538	-0,029 Aa	-0,498 Aa	-0,263
500	1,507 Aa	0,023 Aa	0,765	-5,933 Bb	-1,465 Aa	-3,699
<b>Média</b>	1,243	1,030		-1,608	-1,966	

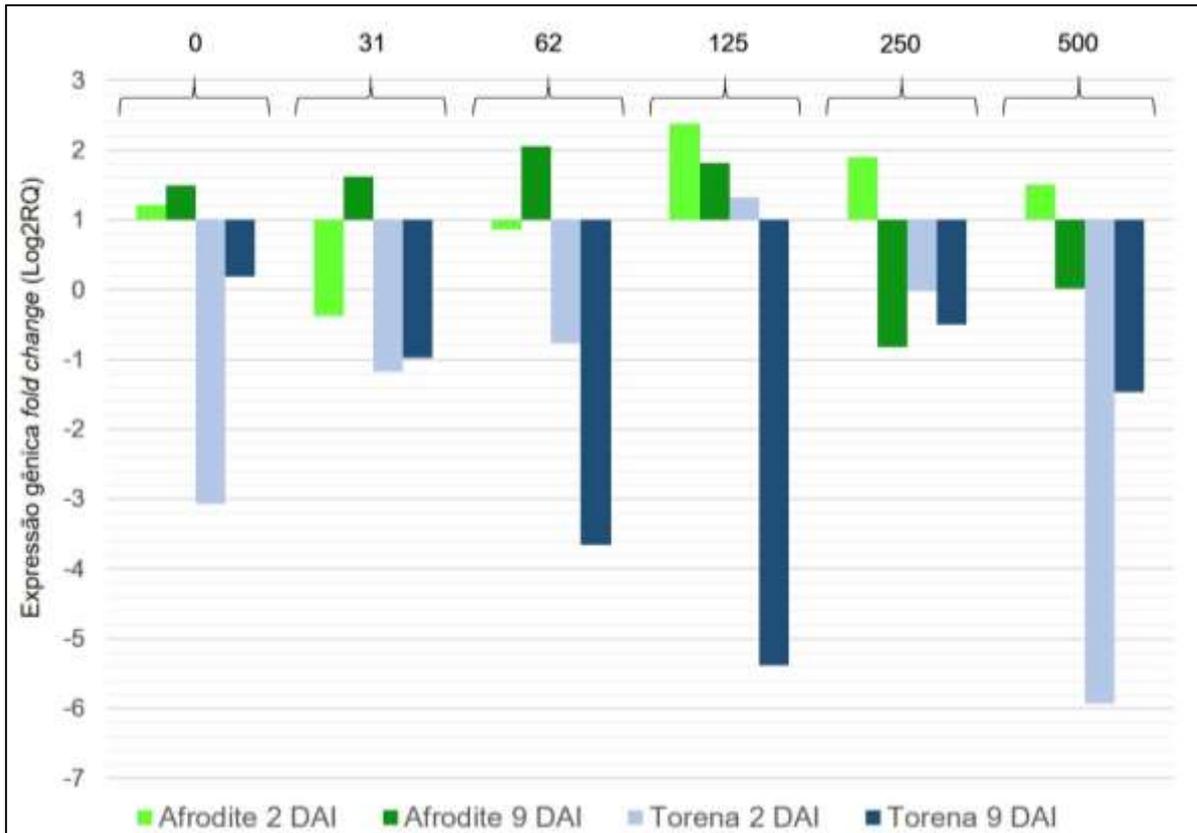
\*\*\*Cada valor representa a média detrés repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 4.** Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *LOX* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>LOX</i>									
DAI	0			31			62		
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
2	1,209Aa	-3,072Ba	-0,931	-0,37Aa	-1,169Aa	-0,769	0,857Aa	-0,771Aa	0,043
9	1,486Aa	0,184 Aa	0,835	1,623Aa	-0,983Aa	0,320	2,046Aa	-3,655Ba	-0,804
Média	1,347	-1,444		0,626	-1,076		1,451	-2,213	
DAI	125			250			500		
2	2,370Aa	1,327Aa	1,848	1,896Aa	-0,029Aa	0,933	1,507Aa	-5,933Ba	-2,213
9	1,820Aa	-5,38Bb	-1,780	-0,820Aa	-0,498Aa	-0,659	0,023Aa	-1,465Ab	-0,721
Média	2,095	-2,026		0,538	-0,263		0,765	-3,699	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si ( $P>0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

De maneira geral, observou-se regulação positiva para o gene que codifica *LOX* em IPR Afrodite e regulação negativa em URS Torena, nas densidades populacionais e nos períodos avaliados (Tabelas 3 e 4). Esse gene se manteve estável em IPR Afrodite, independente da densidade de inóculo à qual foi exposta, caracterizando sua resistência. Para a cultivar suscetível, aos 2 DAI, em densidades populacionais mais baixas, sugere-se que houve uma tentativa de reação da planta à presença do nematoide, induzindo levemente o gene que codifica *LOX*. Porém, seguiu-se repressão significativa em densidades populacionais maiores ou intermediárias, aos 9 DAI.



**Figura 5.** Perfil transcricional do gene que codifica para *LOX* aos 2 e 9 dias após a inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando-se o gene *18S* como controle endógeno; a expressão relativa foi normalizada utilizando-se os níveis de expressão das plantas controle, em cada período de coleta. As barras representam os níveis médios de expressão e os valores correspondem à média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela.

Dentre os genes da classe *Lrk* que foram avaliados na interação de aveia branca e *M. incognita*, apenas o gene que codifica *Lrk14* apresentou expressão diferencial significativa entre IPR Afrodite e URS Torena, porém sem interação entre os fatores avaliados (Tabela 5). Isso porque a cultivar resistente regulou positivamente esse gene e os níveis transcricionais mantiveram-se sempre positivos, independente da densidade populacional e da data de avaliação. Ao contrário, para a cultivar suscetível, foi regulado negativamente na presença do nematoide, fato evidenciado principalmente aos 9 DAI (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

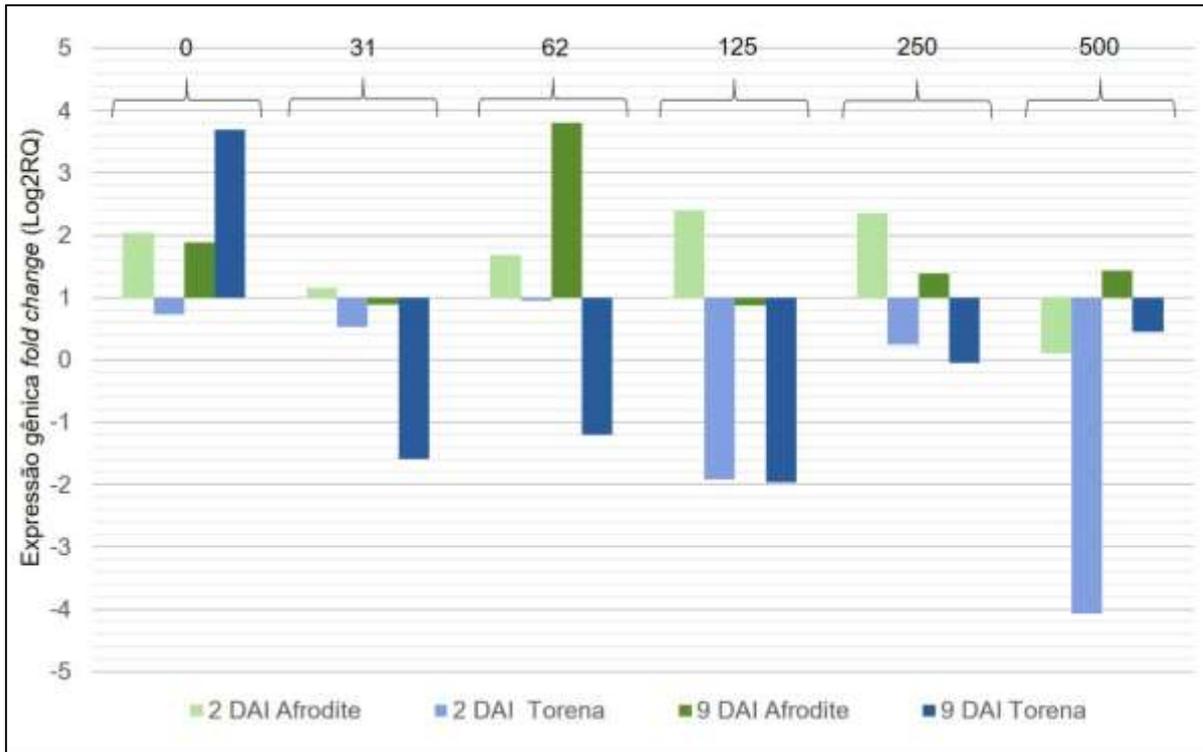
<i>Lrk 14</i>						
Pi	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
	2 DAI			9 DAI		
0	2,036	0,731	1,383	1,891	3,686	2,788
31	1,146	0,534	0,840	0,886	-1,598	-0,356
62	1,681	0,944	1,312	3,797	-1,204	1,296
125	2,393	-1,911	0,241	0,876	-1,958	-0,541
250	2,359	0,243	1,301	1,390	-0,048	0,671
500	0,105	-4,070	-1,982	1,426	0,444	0,935
<b>Média</b>	1,620 A	-0,588 B		1,711 A	-0,113 B	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

Para IPR Afrodite, aos 2 DAI, *Lrk14* manteve os níveis basais de expressão. Contudo, notou-se tendência de aumento dos níveis transcricionais proporcional ao aumento da densidade populacional do nematoide, sendo levemente reprimido apenas quando submetido à maior densidade (500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>) (Figura 6). Para URS Torena, no mesmo período de avaliação, esse gene apresentou a tendência de ser reprimido quando desafiado com densidades a partir de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup> (Figura 6).

Aos 9 DAI, para a cultivar resistente, sem a presença do nematoide, *Lrk14* manteve os níveis basais de regulação, como observado aos 2 DAI. Porém, na presença do nematoide, na menor densidade populacional, houve leve supressão desse gene, seguido por indução significativa na densidade de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. Posteriormente, em maiores densidades populacionais, os níveis de expressão retornaram aos níveis basais.

Já para a cultivar suscetível, nota-se que aos 2 DAI os níveis de expressão só são alterados a partir de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. Ao contrário do que foi observado aos 2 DAI, aos 9 DAI, sem nematoide, o gene *Lrk14* foi regulado positivamente, contudo, com a presença do nematoide, independente da densidade de *M. incognita*, foi desencadeada a supressão desse gene, como observado na Figura 6.



**Figura 6.** Perfil transcricional do gene que codifica para *Lrk14* aos 2 e 9 dias após a inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. A abundância relativa dos transcritos de cada gene foi normalizada utilizando-se o gene *18S* como controle endógeno; a expressão relativa foi normalizada utilizando-se os níveis de expressão das plantas controle, em cada período de coleta. As barras representam os níveis médios de expressão e os valores correspondem à média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela.

**Tabela 6.** Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Lrk 14</i>						
Pi	Afrodite			Torena		
	2 DAI	9 DAI	Média	2 DAI	9 DAI	Média
0	2,036	1,891	1,963	0,731	3,686	2,208
31	1,146	0,886	1,016	0,534	-1,598	-0,532
62	1,681	3,797	2,739	0,944	-1,204	-0,130
125	2,393	0,876	1,634	-1,911	-1,958	-1,934
250	2,359	1,390	1,874	0,243	-0,048	0,097
500	0,105	1,426	0,765	-4,070	0,444	-1,813
<b>Média</b>	1,620	1,711		-0,588	-0,113	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 7.** Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 14* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Lrk 14</i>									
DAI	0			31			62		
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
2	2,036	0,731	1,383	1,146	0,534	0,840	1,681	0,944	1,312
9	1,891	3,686	2,788	0,886	-1,598	-0,356	3,797	-1,204	1,296
Média	1,963	2,208		1,016	-0,532		2,739	-0,130	
DAI	125			250			500		
2	2,393	-1,911	0,241	2,359	1,390	1,390	0,105	1,426	0,765
9	0,876	-1,958	-0,541	0,243	-0,048	-0,048	1,426	0,444	0,935
Média	1,634	-1,934		1,301	0,671		0,765	0,935	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

Ao analisarmos em conjunto os dois genes que codificam *LOX* e *Lrk14*, podemos verificar que ambos apresentaram respostas de regulação semelhantes para cada cultivar. Ambos mantiveram os níveis basais de regulação para IPR Afrodite, nos tratamentos analisados, com tendência à indução observada apenas nas densidades de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 2 DAI, e de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 9 DAI. Para URS Torena, apesar de algumas diferenças no perfil de expressão, notou-se que ambos os genes apresentaram repressão significativa ao serem submetidos à densidade de 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 2 DAI. A semelhança no perfil de expressão entre esses ficou mais evidente aos 9 DAI, na densidade de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, com repressão de ambos os genes, em todas as densidades seguintes.

Os resultados obtidos para os demais genes candidatos analisados, que não apresentaram resposta diferencial em relação aos tratamentos analisados, encontram-se resumidos nas Tabelas 8 (*Lrk9*), 9 (*Lrk9*), 10 (*Lrk9*), 11 (*Phy3*), 12 (*Phy3*), 13 (*Phy3*), 14 (*12S Globulin*), 15 (*12S Globulin*) e 16 (*12S Globulin*).

**Tabela 8.** Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

Pi	<i>Lrk 9</i>					
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
	2 DAI			9 DAI		
0	-0,432	-1,142	-0,787	-0,253	1,792	0,769
31	-1,606	-1,329	-1,467	-0,194	-0,384	-0,289
62	1,261	-0,152	0,554	0,325	-1,063	-0,369
125	-0,687	-0,307	-0,497	-1,872	-1,320	-1,596
250	-0,279	0,205	-0,037	-1,841	0,038	-0,901
500	-2,239	-4,331	-3,285	-2,216	-0,213	-1,214
<b>Média</b>	-0,663	-1,176		-1,008	-0,191	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 9.** Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

Pi	<i>Lrk 9</i>					
	Afrodite			Torena		
	2 DAI	9 DAI	Média	2 DAI	9 DAI	Média
0	-0,432	-0,253	-0,342	-1,142	1,792	0,325
31	-1,606	-0,194	-0,900	-1,329	-0,384	-0,856
62	1,261	0,325	0,793	-0,152	-1,063	-0,607
125	-0,687	-1,872	-1,279	-0,307	-1,320	-0,813
250	-0,279	-1,841	-1,060	0,205	0,038	0,121
500	-2,239	-2,216	-0,557	-4,331	-0,213	-0,366
<b>Média</b>	-0,347	-0,767		-0,545	-0,187	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 10.** Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *Lrk 9* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Lrk 9</i>									
DAI	0			31			62		
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
2	-0,432	-1,142	-0,787	-1,606	-1,329	-1,467	1,261	-0,152	0,554
9	-0,253	1,792	0,769	-0,194	-0,384	-0,289	0,325	-1,063	-0,369
Média	-0,342	0,325		-0,900	-0,856		0,793	-0,607	
DAI	125			250			500		
2	-0,687	-0,307	-0,497	-0,279	0,205	0,205	-2,239	-4,331	-3,285
9	-1,872	-1,320	-1,596	-1,841	0,038	0,038	-2,216	-0,213	-1,214
Média	-1,279	-0,813		-1,060	0,121		-2,227	-2,272	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P>0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 11.** Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *Phy 3* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Phy 3</i>						
Pi	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
	2 DAI			9 DAI		
0	-1,226	-1,370	-1,298	-0,778	2,841	1,031
31	-1,741	-2,090	-1,915	-0,391	-1,642	-1,016
62	0,968	-2,572	-0,802	1,871	-4,331	-1,230
125	-1,030	-2,337	-1,683	-1,351	-1,654	-1,502
250	-0,859	-0,674	-0,766	-2,836	-0,841	-1,838
500	-1,372	-2,984	-2,178	-0,502	-1,782	-1,142
Média	-0,876	-2,004		-0,664	-1,234	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P>0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 12.** Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *Phy 3* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Phy 3</i>						
Pi	Afrodite			Torena		
	2 DAI	9 DAI	Média	2 DAI	9 DAI	Média
0	-1,226	-0,778	-1,002	-1,370	2,841	0,735
31	-1,741	-0,391	-1,066	-2,090	-1,642	-1,866
62	0,968	1,871	1,419	-2,572	-4,331	-3,451
125	-1,030	-1,351	-1,190	-2,337	-1,654	-1,995
250	-0,859	-2,836	-1,847	-0,674	-0,841	-0,757
500	-1,372	-0,502	-0,937	-2,984	-1,782	-2,383
<b>Média</b>	-0,876	-0,664		-2,004	-1,234	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 13.** Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *Phy 3* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>Phy 3</i>									
DAI	0			31			62		
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
2	-1,226	-1,370	-1,298	-1,741	-2,090	-1,915	0,968	-2,572	-,802
9	-0,778	2,841	1,031	-0,391	-1,642	-1,016	1,871	-4,331	-1,230
Média	-1,002	0,735		-1,066	-1,866		1,419	-3,451	
DAI	125			250			500		
2	-1,030	-2,337	-1,683	-0,859	-0,674	-0,766	-1,372	-2,984	-2,178
9	-1,351	-1,654	-1,502	-2,836	-0,841	-1,838	-0,502	-1,782	-1,142
Média	-1,190	-1,995		-1,847	-0,757		-0,937	-2,383	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 14.** Comparação dos níveis transcricionais entre as cvs. IPR Afrodite e URS Torena em relação ao gene que codifica *12S Globulin* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita*, nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>12S Globulin</i>						
Pi	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
	2 DAI			9 DAI		
0	-0,013	-1,706	-0,859	1,061	0,545	0,803
31	-0,266	-1,164	-0,715	-0,436	-0,109	-0,272
62	1,614	-1,301	0,156	2,094	-1,757	0,168
125	-0,309	-0,701	-0,505	-2,094	-0,641	-1,367
250	0,558	0,443	0,500	-1,567	-1,330	-1,448
500	-1,837	-4,372	-3,104	-2,570	0,753	-0,908
<b>Média</b>	-0,042	-1,466		-0,585	-0,423	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 15.** Comparação ao longo do tempo dos níveis transcricionais do gene que codifica *12S Globulin* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* nas densidades populacionais iniciais (Pi) de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>12S Globulin</i>						
Pi	Afrodite			Torena		
	2 DAI	9 DAI	Média	2 DAI	9 DAI	Média
0	-0,013	1,061	0,524	-1,706	0,545	-0,580
31	-0,266	-0,436	-0,351	-1,164	-0,109	-0,636
62	1,614	2,094	1,854	-1,301	-1,757	-1,529
125	-0,309	-2,094	-1,201	-0,701	-0,641	-0,671
250	0,558	-1,567	-0,504	0,443	-1,330	-0,443
500	-1,837	-2,570	-2,203	-4,372	0,753	-1,809
<b>Média</b>	-0,042	-0,585		-1,466	-0,423	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

**Tabela 16.** Comparação dos níveis transcricionais do gene que codifica *12S Globulin* aos 2 e 9 dias após inoculação (DAI) com *Meloidogyne incognita* com o aumento das densidades populacionais iniciais de 0, 31, 62, 125, 250 e 500 nematoides por parcela.

<i>12S Globulin</i>									
DAI	0			31			62		
	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média	Afrodite	Torena	Média
2	-0,013	-1,706	-0,859	-0,266	-1,164	-0,715	1,614	-1,301	0,156
9	1,061	0,545	0,803	-0,436	-0,109	-0,272	2,094	-1,757	0,168
Média	0,524	-0,580		-0,351	-0,636		1,854	-1,529	
DAI	125			250			500		
2	-0,309	-0,701	-0,505	0,558	0,443	0,500	-1,837	-4,372	-3,104
9	-2,094	-0,641	-1,367	-1,567	-1,330	-1,448	-2,570	0,753	-0,908
Média	-1,201	-0,671		-0,504	-0,443		-2,203	-1,809	

\*\*\*Cada valor representa a média de três repetições biológicas e três técnicas, contendo um *bulk* de três plantas por parcela. Não houve interação entre os fatores e as médias gerais não diferiram significativamente entre si ( $P > 0,05$ ), de acordo com o teste de Scott-Knott.

## 2.6 DISCUSSÃO

As cultivares IPR Afrodite e URS Torena são contrastantes para resistência e suscetibilidade a *M. incognita*, respectivamente (Machado et al. 2015). Contudo, os mecanismos que regulam a interação incompatível são ainda desconhecidos, principalmente em monocotiledôneas. Para contribuir na elucidação desse patossistema, estudos que utilizam ferramentas moleculares, tais como a análise de expressão gênica durante a infecção do nematoide na planta, têm sido essenciais (Xiao et al. 2013; Nguyễn et al. 2014).

Como a maioria dos patossistemas são dinâmicos, experimentos de *time course* são ideais para o entendimento de todo o processo da interação. Em vista disso, a fim de observar a resposta de plantas a estresses bióticos, deve-se primar por períodos iniciais de infecção e parasitismo para avaliação, pois, neste período, há uma regulação transcricional frequente desencadeada pela percepção da planta à invasão do patógeno (Bar-Joseph et al. 2012).

Nesse contexto, ao compararmos primeiramente a infecção de *M. incognita* nas cultivares de aveia branca, aos 2 DAI, notou-se que o número de nematoides infestantes presentes em ambas as cultivares foi relativamente baixo. Isso porque, neste estudo, a inoculação foi realizada com suspensão contendo ovos+juvenis de *M. incognita*. Portanto, maior período de tempo seria necessário para que houvesse maior sucesso na eclosão e posterior penetração dos J2 nas raízes (Cabasan et al. 2013), como já observado por Dias-Arieira et al. (2002), aos 3 DAI, quando inocularam suspensão de ovos de *M. incognita* em gramíneas forrageiras.

Contudo, aos 9 DAI, o número de juvenis manteve-se baixo na cultivar resistente e todos os indivíduos encontrados apresentavam-se em atraso de desenvolvimento, enquanto que o contrário foi observado na cultivar suscetível, uma vez que número significativamente maior de juvenis em estágio J3 foram encontrados nesta. Esses menores níveis de infecção e atraso no desenvolvimento dos espécimes em materiais resistentes são fato relativamente comuns nesse tipo de interação e em outras espécies de plantas (Anthony et al. 2005; Albuquerque et al. 2010; Marini et al. 2016; Saucet et al. 2016). Em função de ter havido penetração de *M. incognita* no sistema radicular de IPR Afrodite, resistente, inclusive com a formação de alguns indivíduos em estádios de desenvolvimento mais avançados, sugere-se que o tipo de resistência envolvida seja a quantitativa, em que o patógeno consegue se estabelecer e colonizar a planta, porém em menor grau (Camargo 2011).

Quanto à influência das densidades populacionais iniciais de *M. incognita* nos valores de número de nematoides presentes no interior das raízes obtidos, notou-se que, independente da densidade, na cultivar IPR Afrodite tais valores mantiveram-se baixos nos dois períodos avaliados. Exceção feita aos 9 DAI, na menor densidade populacional, quando IPR Afrodite permitiu a maior taxa de infecção observada, seguindo-se um decréscimo acentuado. Isso pode ter ocorrido porque, quando a densidade populacional está abaixo do limiar detectável pelo hospedeiro, os mecanismos de resistência não são desencadeados (Roberts 2009), o que, nesse caso, pode ter levado a essa maior quantidade de nematoides nesse período. É sabido que a capacidade de reconhecimento do hospedeiro depende diretamente da quantidade de patógeno a qual está sendo submetida (Kover e Schaal 2002; Baum et al. 2007). Assim, para comprovar que a ativação da defesa do hospedeiro é diretamente responsável pela menor taxa de penetração de juvenis ou, ainda, que é dependente da densidade populacional, buscou-se, no presente estudo, a resposta em nível molecular.

Já para a cultivar suscetível, aos 2 DAI, o número de nematoides presentes no interior das raízes foi proporcional ao aumento da densidade populacional. Aos 9 DAI, maior número de indivíduos conseguiu penetrar as raízes, principalmente nas densidades iniciais, seguindo-se leve decréscimo e aumento posterior na maior densidade de infestação. Resultados semelhantes foram observados em estudos de patogenicidade com nematoides de galhas, onde em materiais suscetíveis o número de *Nema.g*<sup>-1</sup> nos tecidos radiculares é proporcional ao aumento da densidade

populacional (Castillo et al. 2001; Di Vito et al. 1986; 2005; Charegani et al. 2012; Maleita et al. 2012; Machado et al. 2014).

Sabe-se que o primeiro passo na defesa ativa das plantas é promovido após o reconhecimento das proteínas, que são produzidas e secretadas pelos nematoides, durante a tentativa do estabelecimento do parasitismo (Baum et al. 2007; Smart e Jones 2011). Essas proteínas, também denominadas de eliciadores (PAMPs ou MAMPs), vão se ligar a proteínas transmembrana do hospedeiro, que atuam como receptores de reconhecimento de padrões (*pattern reconized* – PRRs). Os PRRs mais conhecidos já identificados são receptores kinases (RLKs) (Cavalcante et al. 2013), envolvidos em uma série de respostas das plantas, incluindo desenvolvimento, crescimento, percepção hormonal e resposta a patógenos (Goffe e Rammonel 2007). Eventualmente, estes permitem a restrição da colonização de patógenos, sendo esse tipo de imunidade denominada *PAMP-triggered immunity* (PTI) ou resistência basal.

Dessa forma, foram investigadas as alterações na regulação da sinalização de defesa *Lrk 9* e *Lrk 14*, que codifica receptores kinases. Destes, apenas o gene *Lrk 14* apresentou diferenças significativas nos níveis transcricionais entre as cultivares de aveia após a infecção de *M. incognita*. Observou-se regulação positiva para IPR Afrodite, mantendo os níveis basais frente aos tratamentos analisados, e negativa para URS Torená, em ambos os períodos de avaliação, ou seja, houve diferentes respostas de expressão entre os genótipos e nas interações compatível e incompatível a *M. incognita*.

À luz dos fatos ora observados, sugere-se que o gene que codifica *Lrk14* em IPR Afrodite mostra-se constantemente regulado, independente da presença de *M. incognita* em seus tecidos radiculares ou do *time-course* analisado. Contudo, o reconhecimento dos nematoides pela cultivar resistente, já na primeira densidade populacional (31 nematoides.parcela<sup>-1</sup>), levou à pequena redução nos níveis de expressão desse gene, aos 2 DAI. Em seguida, o mesmo foi induzido proporcionalmente ao aumento da densidade populacional. Aos 9 DAI, esse gene foi significativamente induzido, quando submetido à densidade populacional de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, o que pode ter contribuído para a redução no número de nematoides observados no interior do sistema radicular nos testes de eficiência de infecção de *M. incognita*.

A informação existente sugere que os nematoides induzem respostas à PTI em genótipos resistentes (Lambert et al. 1999; Alkharouf et al. 2006; Melillo et al. 2006; Bhattarai et al. 2008; Ali et al. 2014; Siddique et al. 2014; Kammerhofer et al. 2015). Contudo, as complexas respostas da ativação da PTI contra os fitonematoides ainda são pouco caracterizadas. Assim, o presente estudo mostrou que as respostas da PTI são ativadas e mantidas após a infecção de *M. incognita* em IPR Afrodite e há sinalização de defesa dependente de *Lrk 14* contra esse patógeno.

Em outras interações, a expressão de PRRs heterólogos demonstrou conferir resistência à bactérias em banana, uva, tomate, arroz e trigo (Lacombe et al. 2010; Tripathi et al. 2014; Schoonbeek et al. 2015; Schwessinger et al. 2015; Shi et al. 2016). Da mesma forma, a expressão de PRR em tomateiro conferiu resistência a fungos em *Arabidopsis* (Fradin et al. 2011). Isso ocorre porque os PRRs reconhecem moléculas microbianas conservadas, expressando-as em hospedeiros heterólogos, podendo ser eficazes na luta contra uma variedade de agentes patogênicos relacionados.

Kumari et al. (2016) também detectaram discrepâncias no padrão de expressão de genes nas vias de defesa das interações compatíveis e incompatíveis de arroz a *M. graminicola*. Além disso, Nguyễn et al. (2014) observaram que os nematoides de galhas são capazes de reprimir a transcrição de reguladores de defesa-chaves, por meio da expressão do gene *Mi-CRT*, considerado como supressor de defesa basal nas fases iniciais de infecção.

Como diferentes espécies ou cultivares expressam diferentes graus de resistência, suscetibilidade e tolerância (Greco e Di Vito 2009), neste estudo, a defesa basal da cultivar suscetível também foi vencida por *M. incognita*. A supressão de *Lrk 14* resultou na resposta de suscetibilidade de URS Torena, fato bem evidenciado aos 2 DAI, na maior densidade populacional estudada, bem como para todas as demais densidades aos 9 DAI, obtendo-se o maior nível de repressão com 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>.

Tais resultados, de maneira geral, reforçam a ideia de que, para ocorrer a expressão da resistência da planta ao nematoide durante o processo de infecção, é necessária, primeiramente, a detecção destes parasitas por células do hospedeiro (Glazebrook 1999; Smart e Jones 2011). Para isso, entretanto, os nematoides devem estar em quantidade suficiente para desencadear o reconhecimento. No caso da suscetibilidade, estes podem suplantam o reconhecimento por PRRs da planta e promover o parasitismo e a virulência (Bent e Mackay 2007; Dangl et al. 2013). Essa

supressão de PTI por efetores patogênicos leva à suscetibilidade desencadeada por efetor (ETS), como foi observado neste trabalho, após a supressão do gene que codifica *Lrk 14* em URS Torena.

Em resposta ao ETS, as plantas evoluíram as proteínas R a fim de reconhecer esses efetores ou proteínas de avirulência (*Avr*) (Nimchuk et al. 2003). Assim, as plantas hospedeiras desencadeiam proteínas R para interagir direta ou indiretamente com os patógenos e induzir uma resposta de defesa eficiente, referida como *effector-triggered immunity* (ETI). Esse reconhecimento da *Avr* por proteínas R é seguido por sinalização de defesa que, frequentemente, está associada à reação de hipersensibilidade (HR) (Moffett et al. 2002).

Tais reações estão diretamente relacionadas ao gene que codifica *LOX*. Isso porque, nas plantas, a via do metabolismo de *LOX* é iniciado pela adição da molécula de oxigênio na posição do C9 ou C13 de ácido linoleico, produzindo os correspondentes 9 e 13-hidroperóxidos (Wasternack 2007). Posteriormente, estes podem ser metabolizados em compostos tais como JA e jasmonato de metila (Creelman e Mullet 1997; Nemchenko et al. 2006; Yoon et al. 2009).

Sabe-se que JA contribui para indução da resistência inespecífica às doenças e desempenha importante papel na ativação da SAR contra o ataque de patógenos (Isayenkov et al. 2005). Isso resulta na produção de metabólitos secundários, assim como flavonoides e uma série de proteínas de defesa nas raízes, que são tóxicas para os nematoides *in vitro* (Soriano et al. 2004), desencadeando a HR (Levine et al. 1994; Morel e Dangl 1997; Bruinsma et al. 2009).

Alguns autores demonstraram que as enzimas *LOX*, responsáveis pela biossíntese dos precursores do JA, foram altamente induzidas nas interações incompatíveis tomate-soja - *M. javanica* (Bhattarai et al. 2008; Klink e Matthews 2009), sendo que uma linhagem mutante para esse gene, *ZOOLX3*, foi mais suscetível a *Meloidogyne* spp. (Gao et al. 2008). Essas observações demonstram que *LOX* e JA são sinais-chaves envolvidos na defesa da planta contra *Meloidogyne* spp. e, possivelmente, a outros nematoides sedentários.

Assim, verificamos no presente trabalho que, na cultivar resistente, os níveis basais de *LOX* foram mantidos independente dos tratamentos analisados. Porém, assim como observado para o gene *Lrk 14*, houve tendência à indução na densidade de 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 2 DAI, bem como de 62 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 9 DAI, o que reforça o papel de *LOX* na resposta de defesa a *M. incognita*. Tais

informações são corroboradas por Gobel et al. (2003), pois a atividade de 9-LOX e a expressão de mRNA são induzidas por infecção patogênica em batata, apoiando o papel de 9-LOXs na defesa de plantas contra infecções fúngicas.

Para URS Torena, ao contrário, LOX apresentou perfil de expressão com repressão significativa, principalmente na densidade de 500 nematoides.parcela<sup>-1</sup>, aos 2 DAI. Já aos 9 DAI, o efeito do parasitismo do nematoide ficou mais evidente, visto que LOX mostrou repressão significativa em todas as densidades populacionais, mas principalmente em 125 nematoides.parcela<sup>-1</sup>. Do mesmo modo, plantas de *Nicotiana attenuata* deficientes em LOX são mais vulneráveis ao ataque de *Manduca sexta*, que também atrai outros herbívoros, tais como *Empoasca* spp. e, quando em comparação com plantas resistentes, a defesa mediada por LOX reduziu o crescimento larval e a herbivoria (Voelckel et al. 2004).

Perfil de expressão semelhante para LOX tem sido relatado em outras interações. Nas interações compatível e incompatível de pepino a bacterioses, a expressão na cultivar resistente é sempre maior nas primeiras horas de infecção (Farahani e Taghavi 2016). A expressão de LOX também aumenta em tomateiros resistentes inoculados com *Pseudomonas putida* (Mariutto et al. 2011), assim como na interação incompatível de feijão comum - *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Croft et al. 1993).

Alguns estudos já identificaram genes que respondem à infecção por nematoides, em ambas as interações, compatíveis e incompatíveis, cuja regulação varia devido, entre outros fatores, ao tempo decorrido desde a percepção dos patógenos (Guimarães et al. 2010; 2015; Tirumalaraju et al. 2011; Portillo et al. 2013). Em genótipos resistentes, a grande maioria dos genes são reprimidos em resposta à infecção, seguindo-se uma indução, o que corrobora os estudos com outras interações planta - nematoides de galhas (James et al. 2005; Portillo et al. 2013) e soja - nematoide do cisto (Klink et al. 2007).

De acordo com Jalloul et al. (2002), a expressão de LOX de forma mais precoce é crucial para reprimir o patógeno na interação incompatível entre *Xanthomonas*-algodão, em relação à interação compatível. Isso porque os produtos do metabolismo de LOX são essenciais para induzir resposta hipersensível no local da infecção ou parasitismo, uma vez que a oxidação lipídica mediada por LOX pode causar danos à membrana durante a HR (Rusterucci et al. 1999).

Estes danos já foram comprovados na interação incompatível aveia branca - *M. incognita*, aos 15 DAI, pela observação de alterações histopatológicas, onde as células ao redor do cilindro vascular mostravam-se desorganizadas e lignificadas, indicando a típica HR (Marini et al., 2016). Respostas semelhantes à RH, em função da infecção por nematoides, comumente ocorrem em outras espécies de plantas, incluindo cafeeiro (Anthony et al. 2005; Albuquerque et al. 2010), videira (Anwar e Mckenry 2002) e ameixeiras (Saucet et al. 2016). Nessas espécies resistentes, a HR é geralmente eficiente na interrupção do desenvolvimento dos nematoides (Albuquerque et al. 2010; Khallouk et al. 2011) e/ou na degeneração dos sítios de alimentação (Anthony et al. 2005; Fourie et al. 2013).

Assim, acredita-se que há regulação tardia e negativa em URS Torenna quando inoculada com *M. incognita*. *Lrk14* parece atuar apenas como amplificador de respostas de defesa inicial em IPR Afrodite, prolongando o sinal de ameaça iminente após a detecção inicial do patógeno. Dessa forma, *LOX* é desencadeado, uma vez que a resposta induzida por efetores parece ser mais forte e mais prolongada do que a resposta induzida por MAMPs ou DAMPs (Tao et al. 2003; Wise et al. 2007). Além disso, a resposta para os efetores geralmente resulta em HR, enquanto MAMPs ou DAMPs, normalmente, não causam morte celular (Boller e Felix 2009; Yamaguchi et al. 2011).

Genes relacionados ao desenvolvimento das plantas de aveia também foram analisados neste estudo, tal como o gene que codifica *12S*. Seu papel em aveia é atuar, durante o desenvolvimento das plantas, no acúmulo de grandes quantidades de proteínas de armazenamento, que servem como fontes de nitrogênio, enxofre e compostos de carbono (Shotwell e Larkins 1989). Porém, não foram observadas diferenças significativas na expressão desse gene entre os tratamentos ora analisados. Isso sugere que o acúmulo da proteína globulina não é afetado pela infecção de *M. incognita* e não há diferença entre as cultivares analisadas nos períodos avaliados. O contrário pode ser observado em outras interações, tais como o conjunto de 32 genes de proteínas de armazenamento em arroz, como a prolamina, a glutelina e globulina, que é altamente induzido contra a infecção por *Ustilaginoidea virens* (Fan et al. 2015).

Com relação ao gene que codifica *Phy 3*, sabe-se que este participa da modulação do crescimento vegetativo para o crescimento reprodutivo, do estabelecimento da plântula e da mudança do relógio circadiano (Rao et al. 2010).

Contudo, as vias específicas de sinalização induzidas pela luz que interagem com caminhos de defesa são ainda pouco estudadas. Genoud et al. (2002) demonstraram respostas cruzadas entre sinalização de fitocromo e percepção de SA e desenvolvimento de HR em *Arabidopsis* após inoculação com *Pseudomonas syringae* avirulento. No entanto, a HR responsável pela resistência a *Turnip Crinkle Virus*, por outro lado, provou ser independente do fitocromo (Chandra-Shekara et al. 2006), assim como demonstrado neste estudo, pois não houve diferença entre os tratamentos analisados para a expressão desse gene.

Os presentes resultados a respeito do patossistema *M. incognita* – aveiabranca contribuem para o entendimento da complexa interação molecular entre monocotiledôneas e nematoides de galhas, ainda pouco estudada. Tais informações poderão ser utilizadas para a redução da suscetibilidade a nematoides e possivelmente, também para outras pragas, uma vez que o piramidamento de genes de resistência alternada contra *Meloidogynespp.* já provou ser eficaz em outras culturas (Djian-Caporalino et al. 2014). Além disso, poderão ser utilizados como estratégias para garantir maior durabilidade da resistência e melhorar o controle de nematoides fitoparasitas a longo prazo.

## 2.7 REFERÊNCIAS

- Abad, P., et al. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat Biotechnol*, 26: 909-915.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant pathol.* 5. Ed. New York, Academic Press.
- Albuquerque, E. V. S., Carneiro, R. M. D. G., Costa, P. M., Gomes, A. C. M. M., Santos, M., Pereira, A. A., Nicole, M., Fernandez, D. e Grossi-De-Sá, M. F. 2010. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *Eur J Plant Pathol*, 127: 335 – 373.
- Ali, M. A., Abbas, A., Kreil, D. P. e Bohlmann, H. 2013. Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and

enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. BMC Plant Biol, 13:13 – 47.

Alkharouf, N. W., Klink, V. P., Chouikha, I. B., Beard, H. S., MacDonald, M. H., Meyer, S., Knap, H.T., Khan, R., e Matthews, B. F. 2006. Timecourse microarray analyses reveals global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). Planta, 224: 838 – 852.

Anwar, S. A. e McKenry, M. V. 2002. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resistant *Vitis* spp. Nematropica, 30: 9 –17.

Applied Biosystems: 1997. Relative Quantitation of Gene Expression: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: User Bulletin.

Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M. e Nicole M. 2005. Hypersensitive-like reaction conferred by de *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. Plant Pathol, 54: 476 – 482.

Baum, T. J., Hussey, R. S., e Davis, E. L. 2007. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. Genetic Eng, 28:17–43.

Bar-Joseph, Z., Gitter, A. e Simon, I. 2012. Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. Nat Rev Genet, 13: 552–564.

Bent, A. F. e Mackey, D. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. Annu Rev Phytopathol, 45:399 – 436.

Bhattarai, K. K., Xie, Q. G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A. e Kaloshian, I. 2008. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. Mol Plant Microbe Interac, 21:1205–1214.

- Bellafiore, S. e Briggs, S. P. 2010. Nematode effectors and plant responses to infection. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 442 – 448.
- Bhattarai, K. K., Xie, Q. G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A. e Kaloshian, I. 2008. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol Plant Microbe Interact*, 21: 1205–1214.
- Bigeard, J., Colcombet, J., e Hirt, H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecul Plant*. 8: 521 – 39.
- Boller, T. e Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbeassociated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 379 – 406.
- Boneti, J. I. S. e Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatol Brasileira*, 6:553.
- Bruinsma, M., Pang, B., Mumm, R., Van Loon, J. J. A. e Dicke, M. 2009. Comparing induction at an early and late step in signal transduction mediating indirect defence in *Brassica oleracea*. *J Exp Botany*, 60: 2589 – 2599.
- Byrd, D. W., Kirpatrick, T. e Barker, K. R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *J Nematol*, 15: 142 – 143.
- Cabasan, M. T. N., Kumar, A., Bellafiore, S. e De Waele, D. 2013. Histopathology of the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 0:1 – 9.
- Camargo, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. Pages: 119-132 in: L. Amorim, J. A. M. Rezende, and A. Bergamin Filho. eds. *Manual de Fitopatologia*, vol. I Princípios e Conceitos. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo.
- Carneiro, R. M. D., e Almeida, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematol Brasileira*, 25: 35-44.

- Caromel, B. e Gebhardt, C. 2011. Breeding for nematode resistance: use of genomic information. Pages: 465 – 492 in: J. Jones, G. Gheysen, e C. Fenoll. eds. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer-Verlag, Berlin.
- Castillo, P., Di Vito, M., Vovlas, N., e Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Host-parasite relationships in root-knot disease of white mulberry. *Plant Dis*, 85: 277 – 281.
- Cavalcante, F. M. L., Almeida, I. V., Melo, K. A., Panizzon, C. P. N. B., Rhoden, S. A., Pamphile, J. A. 2013. Interação patógeno planta: respostas frente ao ataque. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*, 8: 90 – 97.
- Chandra-Shekara, A. C., Gupte, M., Navarre, D., Raina, S., Raina, R., Klessig, D. e Kachroo, P. 2006. Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against *Turnip Crinkle Virus* in *Arabidopsis*. *Plant J*, 45: 320 – 334.
- Charegani, H., Majzoob, S., Hamzehzarghanil, H., e Karegar-Bide, A. 2012. Effect of various initial population densities of two species of *Meloidogyne* on growth of tomato and cucumber in greenhouse. *Nematol Mediter*, 40:129 – 134.
- Creelman, R. A. e Mullet, J. E. 1997. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 48: 355 – 381.
- Croft, K. P. C., Juttner, F. e Slusarenko, A. J. 1993. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol*, 101:13 – 24.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M. e Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341: 746 – 751.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., e Baum, T. J. 2008. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 360 – 366.
- Dias-Arieira, C. R., Ferraz, S., Freitas, L.G. e Mizobuts, H. 2002. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. *Nematol Brasileira*, 26: 35 – 41.

- Di Vito, M., Greco N., e Carella, A. 1986. Effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on the yield of eggplant. *J Nematol*, 18:487 – 490.
- Di Vito, M., Parisi, B., Carboni, A., Ranalli, P., e Catalano, F. 2005. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to Italian populations of four species of *Meloidogyne*. *Nematol Mediter*, 33: 19 – 23.
- Dixon, R. A. e Paiva, N. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7:1085 – 1097.
- Djian-Caporalino C., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Barbary A., Abad P., Sage-Palloix, A. M., Mateille, T., Risso, S., Lanza, R., Taussig, C., Castagnone-Sereno, P. 2014. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biol*, 14:53.
- Fan, J., Guo, X., Li, L., Huang, F., Sun, W., Li, Y., Huang, Y., Xu, Y., Shi, J., Lei, Y., Zheng, A., e Wang, W. 2015. Infection of *Ustilaginoidea virens* intercepts rice seed formation but activates grain-fillinf-related genes. *J Integ Plant Biol*, 57: 577 – 590.
- Farahani, A. S., e Taghavi, S. M. 2016. Profiling expression of lipoxygenase in cucumber during compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Physiol Mol Biol Plants*, 22:175 – 177.
- Fourie, H. e Mc Donald, A. H., De Waele, D. 2013. Host and yield responses of soybean genotypes resistant or susceptible to. *Int J Pest Manag*, 59:111 – 121.
- Fradin, E. F., Abd-El-Haliem, A., Masini, L., Van Den Berg, G. C., Joosten, M. H. eThomma, B. P. 2011. Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 156:2255 – 2265.
- Gao, X., Starr, J., Gobel, C., Engelberth, J., Feussner, I., Tumlinson, J. e Kolomiets, M. 2008. Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, rootspecific

expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. *Mol Plant Microbe Interact*, 21: 98 –109.

Genoud, T., Buchala, A. J., Chua, N. H., Métraux, J. P. 2002. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J*, 31: 87– 95.

Glazebrook, J. 1999. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Biotic Interact*, 2: 280 – 286.

Guimarães, P., Brasileiro, A., Proite, K., de Araújo, A., Leal-Bertioli, S., Pic-Taylor, A. 2010. A Study of Gene Expression in the Nematode Resistant Wild Peanut Relative, *Arachis stenosperma*, in Response to Challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Trop Plant Biol*, 3:183 – 192.

Guimarães, P., Guimarães, L. A., Morgante, C. V., Silva, O. B., Araujo, A. C. G., Martins, A. C. Q., Saraiva, M. A. P., Oliveira, T. N., Togawa, R. C., Leal-Bertioli, S. C. M., Bertioli, D. J., e Brasileiro, C. M. 2015. Root Transcriptome Analysis of Wild Peanut Reveals Candidate Genes for Nematode Resistance. *PLoS ONE*, 10: e0140937.

Göbel, C., Feussner, I., e Rosahl, S. 2003. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9- lipoxygenases. *J Biol Chem*, 278:52834 – 52840.

Goff, K. E. e Ramonell, K. M. 2007. The Role and Regulation of Receptor-Like Kinases in Plant Defense. *Gene RegulSyst Biol*, 1: 167 – 175.

Greco, N. e Di Vito, M. 2009. Population Dynamics and Damage Levels. Pages 246 – 274 in R. N. Perry, M. Moens, e J. L. Starr, eds. *Root-knot nematodes*. Cambridge: CABI International.

Hartman, K. M. e Sasser, J. N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of different al host testand perineal-patternmorphology. Pages 69 – 77 in K. R. Barker, C. C. Carter, e J. N. Sasser, eds. *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Methodology*. Raleigh: North Carolina State University Graphics.

- Henry, G., Thonart, P. e Ongena, M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others; an update on the diversity of plant immune elicitors. *Biotechnol Agron Soc Env*, 16: 257 – 268.
- Hussey, R. S. e Janssen, G. J. W. 2002. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. Pages: 43 - 70 in: J. L. Starr, R. Cook, J. Bridge, eds. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford: CAB International.
- Isayenkoy, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D., e Hause, B. 2005. Suppression of Allene Oxide Cyclase in Hairy Roots of *Medicago truncatula* Reduces Jasmonate Levels and the Degree of Mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol*, 139: 1401 – 1410.
- Jalloul, A., Montillet, J. L., Assigbetse, K., Agnel, J. P., Delannoy, E., Triantaphylides, C., Daniel, J. F., Marmey, P., Geiger, J. P. e Nicole, L. 2002. Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J*, 32:1 – 12.
- Jammes, F., Lecomte, P., Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P. e Favery, B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant J*, 44: 447 – 458.
- Jarošová, J. e Kundu, J. K. 2010. Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biol*, 10: 146.
- Jones, J. D. G. e Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323–329.
- Kammerhofer, N., Radakovic, Z., Regis, M. A. J., Dobrev, P., Vankova, R., Grundler, F. M. W., Siddique, S., Hofmann, J. e Wieczorek, K. 2015. Role of stress-related hormones in plant defense during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 207: 778 – 789.
- Khallouk, S., Voisin, R., Van Ghelder, C., Engler, G., Amiri, S. e Esmenjaud, D. 2011. Histological mechanisms of the resistance conferred by the *Ma* gene against *Meloidogyne incognita* in *Prunus* spp. *Phytopathology*, 101: 945 – 951.

- Klink, V. P. e Matthews, B. F. 2009. Emerging Approaches to Broaden Resistance of Soybean to Soybean Cyst Nematode as Supported by Gene Expression Studies. *Plant Physiol*, 151:1017 – 1022.
- Kover, P. X. e Schaal, B. A. 2002. Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *PNAS*, 99: 11270 – 11274.
- Kumari, C., Dutta, T. K., Banakar, P. e Rao, U. Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Sci Rep*, 6:22846.
- Lambert, K. N., Ferrie, B. J., Nombela, G., Brenner, E. D. e Williamson, V. M. 1999. Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. *Physiol Mol Plant Pathol*, 55: 341 – 348.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H. P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B. P., Staskawicz, B., Jones, J. D. e Zipfel, C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat Biotechnol*, 28: 365 – 369.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. e Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79: 583 – 593.
- Li, S. M., Mao, Z. C., Li, L., Feng, D. X., Yang, Y. H. e Xie, B.Y.2008. Isolation of WRKY Genes in the Incompatible Interaction Between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Horti S*, 35: 1467 – 1472.
- Lu, Y. J., Wang, X., Lou, Y. G. e Cheng, J. A. 2006. Role of ethylene signaling in the production of rice volatiles induced by the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Chi Sci Bull*, 51: 2457 – 2465.
- Machado, A. C. Z., Dadazio, T., Marini, P. M., e Silva, S. A. 2014. Patogenicidade comparativa de *M. incognita* e *M. javanica* em feijão in Anais do 11 Congresso Nacional De Pesquisa De Feijão- Tecnologias para a sustentabilidade da cultura do feijão. Londrina: Anais.

- Machado, A. C. Z., Silva, S. A., Dorigo, O. F., Riede, C. R., Garbuglio, D. D. 2015. Phenotypic Variability and Response of Brazilian Oat Genotypes to Different Species of Root Knot and Lesion Nematodes. *Eur J Plant Pathol*, 141:111 –117.
- Marini, P. M., Garbuglio, D. D., Dorigo, O. F., Machado, A. C. Z. 2016. Histological characterization of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Avena sativa*. *Trop Plant Pathol*, 41: 203 – 209.
- Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, C., Fauconnier, M. L., Ongena, M., Thonart, P., Dommès, J. 2011. The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biol*, 11:29.
- Mei, C., Qi, M., Sheng, G., Yang, Y. 2006. Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, Pr gene expression, and host resistance to fungal infection. *Molecul Plant Microbe Interact*, 19: 1127 – 1137.
- Melillo, M. T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., Bleve-Zacheo, T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato-root knot nematode interactions. *New Phytol*, 170: 501 – 512.
- Moffett, P. G.; Franham, G.; Peart, J. e Baucombe, D. C. 2002. Interaction between domains of plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J*, 21: 4511 – 4519.
- Monaghan, J.e Zipfel, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol*, 15: 349 – 57.
- Morel, J. B. e Dangl, J. L. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ*. 4: 671 – 683.
- Nahar, K., Kyndt, T., De Vleeschauwer, D., Höfte, M. e Gheysen, G. 2011. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiol*,157:305 – 316.

- Nguyễn, P.V.; Bellafiore, S.; Petitot, A.-S.; Haidar, R.; Bak, A.; Abed, A.; Gantet, P.; Mezzalana, I.; Engler, J. A.; Fernandez, D. 2014. *Meloidogyne incognita* – Rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice*, 7: 1 –13.
- Nemchenko, A., Kunze, S., Feussner, I., Kolomiets, M. 2006. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Botany*, 56: 3767 – 3779.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F. e Dangl, J. L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev of Gen*, 37: 579 – 609.
- Portillo M., Cabrera J., Lindsey K., Topping J., Andrés M. F., Ememiliozzi M., Oliveros, J. C., García-Casado, G., Solano, R., Koltai, H., Resnick, N., Fenoll, C. e Escobar, C. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. *New Phytol*, 197: 1276 –1290.
- Rao, K. P., Richa, T., Kumar, K., Raghuram, B. e Sinha, A. K. 2010. In silico analysis reveals 75 members of mitogen activated protein kinase kinase kinase gene family in rice. *DNA Res*, 17:139 – 53.
- Roberts, P. A. Concepts and consequences of resistance. 2009. Pages 23 – 41 in J. L. Starr, R. Cook, J. Bridge, eds. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford: CAB International.
- Rosso, M. N. e Hussey, R. 2012. Nematode Effectors Protein: Targets and Functions in Plant Parasitism. Pages: 327–354 in: F. Martin F, S. Kamoun, eds. *Effectors in Plant-Microbe Interactions*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Rusterucci, C., Montillet, J. L., Agnel, J. P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J. J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J. P. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein of tobacco leaves. *The J of Biological Chem*, 274:36446 – 36455.

- Saucet, S. B e Shirasu, K. 2016. Molecular Parasitic Plant–Host Interactions. *PLOS Pathogens*, 12: e1005978.
- Shi, Q., Febres, V. J., Jones, J. B. e Moore, G. A. 2016. A survey of FLS2 genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Horticul Res*, 11:16022.
- Schoonbeek, H. J., Wang, H. H., Stefanato, F. L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., Zipfel, C. e Ridout, C. J. 2015. *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytol*, 206:606 – 613.
- Shotwell, M. A. e Larkins, B. A. 1989. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. Pages 297 –345 in: A. Marcus eds. *The biochemistry of plants: A comprehensive treatise*. vol. 15. Orlando: Academic.
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seskar, M., Raskin, I. e Mettraux, J. P. 1997. Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. *Plant Physiol*, 114: 79 – 88.
- Schwessinger, B. e Ronald, P. C. 2012. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annu Rev Plant Biol*, 63:451 – 482.
- Schwessinger, B., Bahar, O., Thomas, N., Holton, N., Nekrasov, V., Ruan, D., Canlas, P., Daudi, A., Petzold, C. J., Singan, V. R., Kuo, R., Chovatia, M., Daum, C., Heazlewood, J. L., Zipfel, C. e Ronald, P. C. 2015. Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. *PLoS Pathogens*, 11: e1004809.
- Siddique, S., Matera, C., Radakovic, Z. S., Hasan, M. S., Gutbrod, P., Rozanska, E., Sobczak, M., Torres, M. A. e Grundler, F. M. W. 2014. Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science Sig*, 7: ra33.
- Smant G., e Jones J. 2011. Suppression of plant defences by nematodes. Pages 273 – 286 in J. Jones, G. Gheysen, C. Fenoll, eds. *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Berlin: Springer.

- Smith, C. J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol*, 132:1 – 45.
- Soriano, I. R., Asenstorfer, E., Schmidt, O., e Riley, T. 2004. Incible flavone in Oats (*Avena sativa*) is novel defense against plant-parasitic nematodes. *Nematology*, 94: 1207 – 1214.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. e Katagiri, F. 2003. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 15: 317 – 330.
- Taylor, A. L. e Sasser, J. N. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz. Proyecto internacional de *Meloidogyne*. Raleigh, North Carolina State University, 1983. 109 p.
- Tirumalaraju, S. V., Jain, M. e Gallo, M. 2011. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and -susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *J Plant Physiol*, 168:481 – 492.
- Tripathi, L., Tripathi, J. N., Kiggundu, A., Korie, S., Shotkoski, F. e Tushemereirwe, W. K. 2014. Field trial of *Xanthomonas* wilt disease-resistant bananas in East Africa. *Nat Biotechnol*, 32: 868 – 870.
- Voelckel, C., Weisser, W. W., e Baldwin, I. T. 2004. An analysis of plant–aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Mol Ecology*, 13: 3187 – 3195.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann of Botany*, 100: 681 – 97.
- Wise, R. P., Moscou, M. J., Bogdanove, A. J. e Whitham, S. A. 2007. Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 45: 329 – 369.

- Wu, J. e Baldwin, I. T. 2012. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu Rev Gen*, 44: 1 – 24.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A. C., Tax, F. E. e Ryan, C. A. 2010. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22: 508 – 22.
- Yoon, J., Chung, W. I., e Choi, D. 2009. NbHB1, *Nicotiana benthamiana* homeobox 1, is a jasmonic acid-dependent positive regulator of pathogen-induced plant cell death. *New Phytol*, 184:71 – 84.
- Xiao, J., Jin, X., Jia, X., Wang, H., Cao, A., Zhao, W., Pei, H., Xue, Z., He, L., Chen, Q., e Wang, X. 2013. Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. *BMC Genomics*, 14: 197.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tolerância contra *M.incognita*, aliada à elevada resistência, foi, portanto, identificada na cultivar IPR Afrodite, que foi capaz de suprimir o desenvolvimento desse parasita e também não apresentou decréscimo significativo em seu desenvolvimento, em função do ataque do mesmo. Essas características fazem de IPR Afrodite uma importante opção de manejo de *M. incognita*, já que poderá induzir à redução populacional dos nematoides presentes no solo, melhorando as condições fitossanitárias para a cultura subsequente, bem como não terá sua produtividade alterada, garantindo lucratividade ao produtor. Além disso, no presente trabalho, analisou-se a expressão gênica diferencial em IPR Afrodite, em comparação à cultivar suscetível, sugerindo-se genes candidatos que desencadeariam mudanças no perfil de expressão e que, possivelmente, estariam envolvidos na imunidade desencadeada por PAMP (PTI) ou *Effector-Triggered Imunity* (ETI), que suscitaria em reação de hipersensibilidade. Tal informação é de suma importância para os programas de melhoramento genético não somente de aveia, mas de também de outras culturas que são afetadas por *M. incognita*. Isso porque tal conhecimento permite que genes de resistência individuais ou combinados sejam implantados, através de seleção assistida por marcadores, ou mesmo inseridos, através de transformação genética, em cultivares comerciais, o que traria vários benefícios para o controle desse nematoide em sistemas integrados de manejo. Aliado a isso, os riscos para o meio ambiente e para a saúde humana seriam reduzidos, uma vez que menos nematicidas químicos seriam utilizados, além da possibilidade de alcançar uma resistência duradoura a esse patógeno.

Estudos posteriores serão, ainda, necessários, para o esclarecimento acerca de outros genes candidatos que poderiam estar envolvidos no mecanismo de resistência a esse e outros fitonematoides, bem como a respeito da viabilidade técnica da transferência desses genes para outras culturas, uma vez que IPR Afrodite apresenta elevada resistência a *M. incognita* e essa característica é bastante desejável na agricultura mundial.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, G.T.; SCHUCH, L.O.B.; MAIA, M. S. Produção de biomassa em consórcio de aveia branca (*Avena sativa* L.) e leguminosas forrageiras. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 19 – 24, 2005.
- ALMEIDA, J. L. Produção e utilização recente de aveia no Brasil. In: Reunião anual da comissão brasileira de pesquisa de aveia, Londrina, 1998. **Palestras**. Londrina, IAPAR, 1998. p.5 – 15.
- BAR-JOSEPH, Z.; GITTER, A.; SIMON, I. Studying and modelling dynamic biological processes using time-series gene expression data. **Nature Review Genetics**, London, v.13, p.552 – 564, 2012.
- BARKER, K. R.; OLTHOF, T. H. A. Relationship between nematode population densities and crop responses. **Annual Review Phytopathology**, California, v. 4, p. 327 – 353, 1976.
- COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA. **Recomendações tecnológicas para o cultivo de aveia**. Ed. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1995. 50p.
- CALEGARI, A.; ASSMANN, A.L.; SANGUININI, J.N. Influência do sistema de cultivo e da adubação verde de inverno na agregação do solo. In: Congresso brasileiro de plantio direto para uma agricultura sustentável, Ponta Grossa, 18/22. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1996, p.95 – 97.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro de 2018**. Brasília, Conab, 2018.
- MACHADO, A. C. Z.; SILVA, S. A.; DORIGO, O. F.; RIEDE, C. R.; GARBUGLIO, D. D. Phenotypic variability and response of brazilian oat genotypes to different species of root-knot and lesion nematodes. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 141, n.1, p. 111 – 117, 2015.
- NGUYÊN, P.V.; BELLAFFIORE, S.; PETITOT, A.-S.; HAIDAR, R.; BAK, A.; ABED, A.; GANTET, P.; MEZZALIRA, I.; ENGLER, J. A.; FERNANDEZ, D. *Meloidogyne incognita* – Rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. **Rice**, Tokio, v. 7, p. 1 – 13, 2014.
- ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. CAB International, Wallingford, p. 23 – 41, 2009.
- SCHAWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to White mold: a review. **Crop Science**, Madison, v. 53, n.5, p. 1832, 2013.

SEINHORST, J. W. Nematodes and growth of plants: formulation of the nematode-plant system. In: Lambert F., Taylor C. E. (eds) **Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species): Systematics, Biology and Control**. London, Academic Press, p 231 – 256, 1979.

SIKKENS, R. B.; WEAVER, D. B.; LAWRENCE, K. S.; MOORE, S. R.; VAN SANTEN, E. Lonren upland cotton germplasm response to *Rotylenchulus reniformis* inoculum level. **Nematropica**, Florida, v.41, n. 1, p. 68 – 74, 2011.

SING, S. P.; SCHAWARTZ, H. F. Review: breeding common bean for resistance to insect pest and nematodes. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.91, n.2, p.239 – 250, 2011.

SING, S. P.; SCHAWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n.6, p.2199 – 2223, 2010.

TENG, P. S.; SHANE, W. W.; MACKENZIE, D. R. Crop losses due to plant pathogens. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Florida, v. 2, p. 21 – 47, 1984.

XIAO, J.; JIN, X.; JIA, X.; WANG, H.; CAO, A.; ZHAO, W.; PEI, H.; XUE, Z.; HE, L.; CHEN, Q.; WANG, X. Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. **BMC Genomics**, Carbondale, v.14, p.197, 2013.