



PAULA SOARES ALVES

**CHARACTERISATION OF THE RESISTANCE DERIVED
FROM WILD GERMPLASM AMPHILLO OF *Coffea arabica*
TO *Meloidogyne paranaensis* AND STUDY OF THE
ENZYMATIC TARGET OF FLUOPYRAM IN *Meloidogyne* spp.**

**LAVRAS-MG
2020**

PAULA SOARES ALVES

**CHARACTERISATION OF THE RESISTANCE DERIVED FROM
WILD GERMPLASM AMPHILLO OF *Coffea arabica* TO
Meloidogyne paranaensis AND STUDY OF THE ENZYMATIC TARGET OF
FLUOPYRAM IN *Meloidogyne* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de Doutora.

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Paula Soares.

Characterisation of the resistance derived from wild germplasm
Amphillo of *Coffea arabica* to *Meloidogyne paranaensis* and study
of the enzymatic target of fluopyram in *Meloidogyne* spp. / Paula
Soares Alves. - 2020.

117 p. : il.

Orientador(a): Jorge Teodoro de Souza.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. histopathology. 2. metabolomic. 3. docking. I. de Souza,
Jorge Teodoro. II. Título.

PAULA SOARES ALVES

**CHARACTERISATION OF THE RESISTANCE DERIVED FROM
WILD GERMPLASM AMPHILLO OF *Coffea arabica* TO
Meloidogyne paranaensis AND STUDY OF THE ENZYMATIC TARGET OF
FLUOPYRAM IN *Meloidogyne* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 02 de Março de 2020.

Dr. Vicente Paulo Campos	UFLA
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	EPAMIG
Dr. Willian César Terra	UFLA
Dr. Guilherme Silva de Podestá	UFPB
Dra. Bárbara Joana dos Reis Fatobene	Consórcio Brasileiro de Pesquisas em Café

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

Aos meus pais Elena e Paulo.

Aos meus irmãos Daniel, Marco Túlio e Leidyane.

Ao meu noivo Francisco,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o curso e ao Consórcio Brasileiro de Pesquisas em Café, INCT-Café, CAPES e FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. Jorge Teodoro de Souza, pela orientação, confiança e ensinamentos durante esses anos.

Agradeço à Dra. Sônia Maria de Lima Salgado, Dr. Vicente Paulo Campos, Dra. Regina M. D. G. Carneiro, Dr. Denilson Ferreira de Oliveira e Dr. Alan Teixeira Machado pelos ensinamentos e suporte para realização dos trabalhos. Ainda no âmbito acadêmico, agradeço aos professores do Departamento de Fitopatologia pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço a Dra. Bárbara Joana dos Reis Fatobene pelos ensinamentos e suporte em todos os trabalhos. Obrigada por toda a ajuda e pela sua amizade!

Aos laboratórios de Nematologia da UFLA e EPAMIG e ao laboratório multiusuário de microscopia eletrônica da UFLA. Agradeço também aos funcionários do departamento de Fitopatologia.

À equipe do laboratório de Nematologia da EMBRAPA- Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial à Raycenne, Ana Cristina e Daniela.

Aos colegas dos laboratórios de Nematologia, Fitopatologia Molecular e produtos naturais da UFLA.

As minhas amigas de longa data Rosana, Raiane e Willyane por todo apoio e amizade.

Aos amigos de Lavras, em especial a Bárbara, Flaminia, Aline, Larissa e Kize.

Aos meus pais Elena e Paulo, por tudo!

Aos meus irmãos Daniel, Marco Túlio e Leidyane pela amizade e apoio.

Ao meu noivo Francisco (Teté), pelo carinho, apoio e por entender a minha ausência.

A minha família, demais amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Meloidogyne paranaensis é uma das principais espécies de nematoide que parasitam o cafeeiro, sendo o controle genético utilizado como a principal forma de manejo. O objetivo do trabalho foi caracterizar a resistência do genótipo 16-6-1, derivado do germoplasma silvestre Amphillo de *Coffea arabica*, à *M. paranaensis*. A penetração, estabelecimento do sítio de alimentação, desenvolvimento e reprodução de *M. paranaensis* no genótipo resistente foi comparado com a cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144. Houve penetração de juvenis de segundo estágio (J2) em ambas as raízes, porém nas raízes de 16-6-1 isso aconteceu de forma mais lenta e em menor número. A forte fluorescência azul observada no genótipo resistente, mas não no suscetível, sugere que as respostas de resistência ocorreram aos 2 dias após a inoculação (DAI). As respostas de defesa tardias envolveram a degradação da célula gigante aos 14 DAI no genótipo resistente, enquanto o desenvolvimento de nematoides e células gigantes progrediu normalmente na cultivar suscetível. Estes resultados sugerem que a resistência do genótipo 16-6-1 está relacionada a respostas de defesa iniciais e tardias. A caracterização metabólica do genótipo 16-6-1 também foi realizada através da técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). A principal diferença observada foi a maior concentração de sacarose aos 8 e 14 DAI no genótipo 16-6-1, o que sugere que a sacarose está envolvida na resistência desse genótipo a *M. paranaensis*. Dentre as estratégias de manejo disponíveis para fitonematóides, o controle químico destaca-se como ferramenta importante devido a sua boa eficiência. O fluopyram é um fungicida desenvolvido pela Bayer Crop Science e atua contra fungos fitopatogênicos inibindo a enzima succinato desidrogenase. Essa molécula também possui ação nematicida. Acredita-se que o mecanismo de ação desta substância contra nematoides fitoparasitas seja o mesmo, porém há poucas evidências que suportam esta informação. Neste estudo, o objetivo foi identificar *in silico* o alvo enzimático do fluopyram em *Meloidogyne* spp. As estruturas do fluopyram foram desenhadas utilizando o programa ChemSketch. Depois estas estruturas foram submetidas a buscas conformacionais com o software Open3Dalign, e as conformações mais estáveis foram otimizadas utilizando o Mopac. As conformações de menores energias foram submetidas a buscas farmacofóricas com o *software* Lisica, utilizando o banco de dados do Ligand Expo, para selecionar ligantes de proteínas depositadas no RCSB Protein Data Bank. A enzima 4L93 (proteína do choque térmico 90 – HSP90) foi selecionada como possível alvo do fluopyram em *Meloidogyne* spp. Em seguida, utilizando o programa Autodock Vina, foi realizado um estudo da interação entre o fluopyram e as estruturas tridimensionais selecionadas da enzima HSP90: 2JJC, 2QG0, 2VCI, 4FCP, 4L93. Foi observado que as afinidades do fluopyram pelas enzimas eram similares às afinidades dos inibidores desta enzima. Logo, os resultados indicam que o alvo enzimático do fluopyram em *Meloidogyne* spp. é a enzima HSP90.

Palavras-chave: histopatologia, café, célula gigante, metabólica, docking, afinidade.

ABSTRACT

Meloidogyne paranaensis is one of the main nematode species that parasitize coffee and genetic control can be used as the main management strategy. Our aim with this study was to characterise the resistance of genotype 16-6-1, derived from germplasm Amphillo of *Coffea arabica* to *M. paranaensis*. Second stage juveniles (J2) penetrated the roots of genotype 16-6-1 in lower numbers and at a slower pace as compared to the susceptible cultivar Catuai Vermelho IAC 144. The strong blue fluorescence observed in the resistant, but not in the susceptible genotype, suggested that resistance responses occurred as early as 2 days after inoculation (DAI). Late responses involved the degradation of the giant cell at 14 DAI onwards in the resistant genotype, whereas nematode and giant cell development progressed normally in the susceptible cultivar. These results suggest that the resistance of the 16-6-1 genotype is related to early and late defense responses. The metabolic characterisation of the 16-6-1 genotype was also performed using the hydrogen nuclear magnetic resonance (¹H NMR) technique. The main difference observed was the higher concentration of sucrose at 8 and 14 DAI in the 16-6-1 genotype, which suggests that sucrose is involved in the resistance of this genotype to *M. paranaensis*. Among the management strategies available for plant parasitic nematodes, chemical control stands out as an important tool due to its good efficiency. Fluopyram is a fungicide developed by Bayer Crop Science and acts against phytopathogenic fungi by inhibiting the enzyme succinate dehydrogenase. This molecule also has nematicidal action. The mechanism of action of this substance against plant parasitic nematodes is believed to be the same, but there is little evidence to support this information. In this study, the objective was to identify *in silico* the enzymatic target of fluopyram in *Meloidogyne* spp. The structures of fluopyram were designed using the ACD ChemSketch program. Later, these structures were submitted to conformational searches with the Open3Dalign software, and the more stable conformations were optimized using Mopac. Conformations with lower energies were submitted to pharmacophoric searches with the Lisica software, using the Ligand Expo database, to select protein ligands deposited in the RCSB Protein Data Bank. The enzyme 4L93 (heat shock protein 90 - HSP90) was selected as a possible target for fluopyram in *Meloidogyne* spp. Then, using the Autodock Vina program, a study of the interaction between fluopyram and the selected three-dimensional structures of the HSP90 enzyme was performed: 2JJC, 2QG0, 2VCI, 4FCP, 4L93. It was observed that the affinities of fluopyram for the enzymes were similar to the affinities of the inhibitors of this enzyme. Therefore, the results indicate that the enzymatic target of fluopyram in *Meloidogyne* spp. is the HSP90 enzyme.

Keywords: histopathology, coffee, giant cell, metabolomic, docking, affinity.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO..... 10
1.1	Resistência genética de cafeeiro a nematoides..... 10
1.2	Controle químico de fitonematóides..... 14
	REFERÊNCIAS..... 16
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS..... 21	
	ARTIGO 1 - Early and late responses characterise the resistance derived from Ethiopian wild germplasm Amphillo to <i>Meloidogyne paranaensis</i> 21
	ARTIGO 2 - Metabolômica na caracterização da resistência de <i>Coffea arabica</i> Amphillo a <i>Meloidogyne paranaensis</i> 53
	ARTIGO 3 - Proteína do choque térmico 90 é o provável alvo enzimático do fluopyram em <i>Meloidogyne</i> spp..... 78

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência genética de cafeeiros a nematoides

O filo Nematoda constitui um dos mais numerosos e diversos filios de animais. Os nematoides podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas e habitats do planeta (PERRY; MOENS, 2011). Neste filo estão contidas espécies de vida livre, parasitas de animais e de plantas. Até o momento já foram descritas mais de 27000 espécies, sendo a maioria delas espécies de vida livre (QUIST; SMANT, 2015).

Os fitonematóides são um dos principais patógenos de plantas. Eles possuem uma ampla gama de hospedeiras, dentre elas, várias plantas de interesse agrônômico. São responsáveis por grandes perdas na agricultura global, pois reduzem a produtividade e qualidade dos produtos, inviabilizam áreas de plantio, e aumentam os custos da produção (SIKORA & FERNANDES, 2005). Estima-se que o ataque destes patógenos às plantas causa um prejuízo anual de mais de 80 bilhões de dólares (NICOL et al., 2011). No entanto, esse prejuízo pode ser uma subestimativa das perdas reais, já que os sintomas do ataque podem não ser percebidos pelos produtores devido ao fato de serem confundidos com deficiência nutricional ou sintomas causados por outros fitopatógenos (JONES et al., 2013).

Todos os fitonematóides são parasitas obrigatórios de plantas e alimentam-se exclusivamente de citoplasma de células vegetais vivas. Em relação à estratégia alimentar, eles podem ser classificados em ectoparasitas ou endoparasitas (JASMER; GOVERSE; SMANT, 2003). Os ectoparasitas migratórios não entram na raiz, mas se alimentam através da inserção do seu estilete nas células epidérmicas. Os endoparasitas migratórios penetram e migram pelos tecidos das plantas hospedeiras causando extensa necrose nos tecidos vegetais. Os semi-endoparasitas possuem um estágio migratório e outro sedentário, em que o nematoide penetra parcialmente a planta para se alimentar. Já os endoparasitas sedentários, como *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp., se alimentam e se reproduzem dentro da planta, tendo uma forma mais avançada de parasitismo (JASMER; GOVERSE; SMANT, 2003). Eles induzem a formação de sítios de alimentação nas raízes das plantas hospedeiras responsáveis por fornecer nutrientes para seu crescimento e reprodução (WILLIAMSON; GLEASON,

2003).

Meloidogyne Goeldi, 1892, também conhecido como nematoide das galhas, destaca-se como um dos mais importantes fitonematóides em todo o mundo. Esse parasita obrigatório de plantas está amplamente distribuído pelo mundo e possui grande diversidade de hospedeiras, infectando mais de 3000 espécies de plantas e causando sérios danos às culturas (MOENS; PERRY; STAR, 2009).

O gênero *Meloidogyne* possui mais de 90 espécies e dentre elas *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla* são as de maior importância econômica devido à predominância no mundo inteiro e intensidade dos danos. Outras espécies como *M. enterolobii*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *Meloidogyne fallax* têm ganhado destaque devido à ameaça a culturas de interesse em determinados locais (MOENS; PERRY; STAR, 2009; ELLING, 2013).

Os nematoides das galhas possuem uma relação especializada com suas hospedeiras. O sucesso da interação é devido a processos de sinalização molecular, que envolvem modificações enzimáticas do funcionamento das células da planta no tecido vascular, formando o sítio de alimentação, chamado de células gigantes (DAVIS; MITCHUM, 2005). *Meloidogyne* spp. sintetizam proteínas secretórias (efetoras) em suas glândulas esofagianas dorsal e subventral, e estas são liberadas através do estilete durante a migração de juvenis de segundo estágio (J2) nas raízes das plantas hospedeiras (DAVIS; HUSSEY; BAUM, 2004). Os J2 penetram e migram intercelularmente até atingir as células parenquimáticas do cilindro vascular, onde enzimas são liberadas através do estilete e transformam de 5 a 7 células vasculares da raiz em células gigantes, que resultam de sucessivas mitoses sem citocinese. Células gigantes são células multinucleadas, metabolicamente ativas, com citoplasma denso contendo numerosas mitocôndrias, plastídios e ribossomos, com complexo de Golgi e retículo endoplasmático liso bem desenvolvidos. O vacúolo central desaparece e dá lugar a numerosos vacúolos de menor tamanho. Além disso, ocorrem invaginações da parede celular, que em contato com os elementos do xilema, aumenta a superfície de contato da área associada à membrana e provavelmente aumenta a captação de solutos do sistema vascular. Concomitante com a formação das células gigantes, hiperplasia e hipertrofia das células corticais circundantes levam a formação dos sintomas típicos que são as galhas radiculares. Portanto, nutrientes e absorção de água são substancialmente reduzidos por causa do sistema radicular danificado, resultando em plantas fracas e redução da produtividade (CASTAGNONE-

SERENO et al., 2013). No sítio de alimentação o nematoide passa por três ecdises, levando a formação de machos ou fêmeas. Os machos são vermiformes e abandonam a raiz. A fêmea adulta forma uma massa de ovos envolta em uma matriz gelatinosa. Cada fêmea produz em média 500 ovos em aproximadamente 30 dias. O desenvolvimento embrionário no ovo resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que passa por uma ecdise ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2), que eclode do ovo, reiniciando o ciclo (ABAD et al., 2009).

O cafeeiro é uma das plantas cultivadas que sofrem com o parasitismo de nematoides das galhas. Até o momento 19 espécies de *Meloidogyne* parasitas do cafeeiro já foram descritas no mundo (CARNEIRO & COFCEWICZ, 2008; HUMPHREYS-PEREIRA et al., 2014). No Brasil, as espécies deste gênero que mais causam problemas na cultura são *M. exigua* Goeldi, 1887, *M. paranaensis* Carneiro et al., 1996 e *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949. *Meloidogyne exigua* possui ampla distribuição geográfica, e *M. paranaensis* e *M. incognita* causam danos intensos, destruindo quase todo o sistema radicular das plantas hospedeiras (GONÇALVES et al., 2004).

A principal medida de manejo para qualquer nematoide fitoparasita é a exclusão, pois uma vez presente na área sua erradicação torna-se praticamente impossível, sendo necessário o uso de outras estratégias de manejo, como utilização de nematicidas, rotação de culturas, destruição das plantas atacadas, uso de mudas sadias, porta-enxerto resistente e o emprego de variedades resistentes (BERTRAND; ANTHONY, 2008). Culturas perenes, como o café, são geralmente cultivadas em sistemas de produção que permanecem em vigor por anos. Portanto, é mais difícil implementar um sistema de rotação em um curto período de tempo. Já a utilização de nematicidas é restrita em vários países, pois causa problemas ambientais e à saúde de humanos e animais. Além disso, estes produtos não são tão eficientes para controlar espécies agressivas como *M. paranaensis*, pois mesmo ocorrendo redução da população no solo e nas raízes, o sistema radicular das plantas de café não consegue se recuperar dos danos causados pelo patógeno (SALGADO et al., 2011). A resistência genética é considerada uma estratégia mais econômica e eficaz (BERTRAND; ANTHONY, 2008). Ela é utilizada principalmente para o controle de nematoides endoparasitas sedentários, como os do gênero *Meloidogyne*, que apresentam uma interação especializada com suas hospedeiras (ROBERTS, 2002).

A resistência consiste na habilidade da planta em suprimir o desenvolvimento ou a reprodução do nematoide (WILLIAMSON; KUMAR, 2006). Os mecanismos de resistência

podem ser classificados em resistência pré-infecção ou pós-infecção (ANWAR; MCKENRY, 2000; BENDEZU; STARR, 2003). Os mecanismos de resistência pré-infecção estão relacionados à presença de substâncias químicas tóxicas ou antagonicas nos tecidos radiculares que vão impedir a penetração do nematoide (BENDEZU; STARR, 2003). Na resistência pós-infecção, os nematoides penetram as raízes das plantas hospedeiras, mas não induzem formação de um sítio de alimentação funcional capaz de suportar o desenvolvimento de uma fêmea reprodutiva (ANWAR; MCKENRY, 2000).

Os programas tradicionais de melhoramento do cafeeiro geralmente dependem da introgressão de genes oriundos da espécie diplóide *C. canephora* como fonte de resistência a *Meloidogyne* spp. (MALUF, 2008). Estas espécies são alógamas e possuem incompatibilidade do tipo gametofítica (CONAGIN; MENDES, 1961). Em razão da fecundação cruzada há grande variabilidade genética. Entretanto a obtenção de cultivares resistentes através de cruzamentos dessa espécie diplóides e *C. arabica*, uma espécie alotetraplóide que possui pouca variabilidade genética, é um processo demorado e possui custos elevados até a obtenção de um novo genótipo resistente.

Fontes de resistência a *M. paranaensis* foram encontradas em genótipos silvestres de *C. arabica* na região de Amphillo na Etiópia (ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009). Em 1953 Amphillo foi introduzido no Brasil e registrado como IAC 1167-19. A planta Amphillo MR 2-161, proveniente da geração S3 de IAC 1167-19, foi selecionada como resistente a *M. incognita* em condições de campo e estufa nos anos 70 (FAZUOLI, 1986). Desde então, plantas do genótipo Amphillo têm sido utilizadas em programas de melhoramento de *C. arabica* como fontes de resistência a nematoides. O genótipo 16-6-1 avaliado neste estudo representa a geração F6 do cruzamento entre Catuaí Vermelho e Amphillo MR 2-161 (SALGADO et al., 2014). Estes genótipos provavelmente representam uma fonte de variabilidade vinda de *C. arabica* para desenvolvimento de novos cultivares, uma vez que todas as fontes de resistência conhecidas até o momento vêm de outras espécies de cafeeiro.

O objetivo do trabalho foi caracterizar a resistência do genótipo 16-6-1 derivado do germoplasma silvestre Amphillo à *M. paranaensis*. No primeiro artigo a penetração, estabelecimento do sítio de alimentação, desenvolvimento e reprodução de *M. paranaensis* no genótipo resistente 16-6-1 foi comparada com o cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144. Já no segundo artigo, extratos das folhas foram submetidos a análises de ressonância

magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) para identificar diferenças metabólicas entre os genótipos.

1.2 Controle químico de fitonematóides

O controle químico é uma importante ferramenta para o manejo integrado de fitonematóides (SIKORA; FERNANDEZ, 2005). Nematicidas fumigantes foram amplamente utilizados durante anos, com destaque para o brometo de metila (ZASADA et al., 2010). Este nematicida possui amplo espectro de ação e pode ser usado como fungicida, herbicida e inseticida. Apesar da eficiência em controlar nematoides, o seu uso foi limitado devido a sua capacidade em afetar a camada de ozônio (DESAEGER et al., 2017). Outros fumigantes foram utilizados como alternativa ao brometo de metila, como o nematicida cloropicrina. Entretanto, cloropicrina é comumente utilizado com outros fumigantes para ter um bom controle, e geralmente é menos efetivo do que o brometo (DUNIWAY, 2002). O 1,3-dicloropropeno possui boa eficiência, entretanto não tem ação sobre plantas daninhas (MARTIN, 2003). Produtos a base de isocianato de metila possuem boa eficiência, porém não possuem boa volatilidade, o que influencia a sua distribuição no solo (MARTIN, 2003). Como os nematicidas fumigantes possuem amplo espectro de ação, a população de organismos benéficos do solo pode ser reduzida (SANCHEZ-MORENO et al., 2010), o que pode ocasionar rápida reinfestação do solo com nematoides parasitas de plantas (MAZZOLA; MANICI, 2012; WATSON et al., 2017). Nematicidas a base de organofosforados e carbamatos surgiram como alternativa ao uso de nematicidas fumigantes. O modo de ação destes nematicidas baseia-se na inibição da enzima acetilcolinesterase. A inibição dessa enzima leva a paralisia dos nematoides (OPPERMAN; CHANG, 1990). Apesar de eficientes muitos nematicidas desses grupos foram proibidos devido à alta toxicidade a humanos. Devido à proibição ou restrição de muitos produtos químicos convencionais, existe a necessidade de utilizar outras moléculas com ação nematicida para preencher esta lacuna no manejo dos nematoides.

O fluopyram, *N*- [2- [3-cloro-5- (trifluorometil) -2-piridinil] etil] -2- (trifluorometil) benzamida, é um fungicida que pertence ao grupo químico piridiletilamida desenvolvido e registrado pela Bayer Crop Science. O fluopyram inibe o crescimento e germinação de esporos controlando vários fungos em culturas importantes (LABOURDETTE et al., 2011;

CHAWLA et al., 2018; KANDEL et al., 2018). Na planta, o fluopyram possui ação sistêmica, movendo-se da semente para o cotilédone e primeiras folhas verdadeiras da planta da soja.

Em fungos, o fluopyram atua como inibidor do complexo succinato desidrogenase (SDHI) (AVENOT; MICHAILIDES 2010; PROFFER et al., 2013). A enzima succinato desidrogenase (SDH) é heterotetramérica composta por quatro subunidades (CECCHINI, 2003). As subunidades SDHA e SDHB estão expostas à matriz mitocondrial e SDHC e SDHD são proteínas de membranas que ancoram o dímero SDHAB, formado pelas subunidades A e B, na membrana interna das mitocôndrias. O complexo succinato desidrogenase acopla à oxidação do succinato ao fumarato na matriz mitocondrial (ou membrana citoplasmática em bactérias) com a redução da ubiquinona (UQ), um transportador de elétrons ligado à membrana hidrofóbica, ao ubiquinol (UQH₂) na membrana durante a respiração aeróbica (HORSEFIELD et al., 2006). Esta enzima também desempenha papel importante no ciclo do ácido tricarboxílico. Fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) se ligam especificamente ao sítio de ligação a ubiquinona (sítio-Q) do complexo mitocondrial II, e inibe a respiração em fungos. O modo de ação do fluopyram foi comprovado em alguns estudos com fungos (SCALIET et al., 2012; VELOUKAS et al., 2013).

Devido à retirada de vários nematicidas do mercado, tornou-se necessário o desenvolvimento de novas moléculas ou estudar moléculas já existentes para o controle de fitonematóides. O potencial nematicida do fluopyram vem sendo avaliado em alguns trabalhos devido a grande importância dos nematoides para a agricultura. Segundo Faske e Hurd (2015), o fluopyram possui ação nematostática inibindo a motilidade de *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchus reniformis*. O estudo demonstrou que baixas concentrações do fluopyram inibem a penetração desses nematoides nas raízes de tomate através da redução da motilidade. O efeito nematostático de fluopyram também foi demonstrado para *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* em estudos de Oka e Saroya (2019). Silva et al. (2019) avaliaram o efeito do fluopyram em *M. incognita*. Segundo o estudo, houve redução no número de galhas, ovos e fator de reprodução em plantas de tomate quando comparadas ao controle. Em estudos de Watson e Desaegeer (2019), a aplicação de fluopyram aumentou a produtividade de morango no campo e reduziu a população de *Belonolaimus longicaudatus*. No Brasil existem produtos a base de fluopyram com registro no MAPA para o controle de nematoides. Verango Prime® (Fluopyram – Bayer) possui registro para o controle de *M. javanica* em batata, *M.*

exigua em café, *Pratylenchus zae* em cana e *P. brachyurus* em soja. O ilevo®, desenvolvido pela Basf, possui registro para *M. incognita* em algodão e milho, e *P. brachyurus* em algodão, milho e soja (AGROFIT, 2020).

O modo de ação do fluopyram em nematoides foi comprovado em estudos de Burns et al. (2015) para o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Neste trabalho, mutantes de *C. elegans* resistentes a inibidores de succinato desidrogenase, foram resistentes ao fluopyram. Diante destas evidências acredita-se que o mecanismo de ação desta substância contra fitonematóides seja o mesmo.

Uma das técnicas que pode ser utilizada para encontrar o alvo de uma molécula em um organismo é o *docking* molecular. O *docking* molecular é uma ferramenta utilizada para prever se uma molécula se ligará a outra. Esse método prevê a afinidade e o modo de ligação entre um ligante e uma macromolécula assim como o correto posicionamento do ligante no sítio ativo da enzima, e a partir de cada conformação espacial, são obtidas diferentes energias de ligação (ALONSO et al, 2006). Quanto menor a energia de ligação do complexo proteína-ligante, mais estável será a interação entre eles (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Deste modo, o objetivo do estudo foi identificar *in silico* o alvo enzimático do fluopyram em fitonematóides do gênero *Meloidogyne* utilizando ferramentas de *docking* molecular para comprovar a afinidade do fluopyram com as enzimas-alvo.

REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. In: PERRY, N.R.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Ed.). **Root-Knot Nematodes**. Cambridge: CAB International, 2009, p.163-181.

AGROFIT. SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 mar. 2020.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal research reviews**, v. 26 n. 5, p. 531-568, 2006.

ANWAR, S.A.; MCKENRY, M.V. Penetration and development of *Meloidogyne arenaria* on two new grape rootstocks. **Journal of Nematology**, v. 34, n.2, p. 143-145. 2002.

ANZUETO, F. et al. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica**, v. 118, n. 1, p. 1-8, 2001.

AVENOT; H.F.; MICHAILEDIS, T.J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v 29, n. 7, p. 643–651, 2010.

BENDEZU, I.F., STARR, J.L. Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. **Journal of Nematology**, v 35, n. 1, p. 115-118, 2003.

BERTRAND, B.; ANTHONY, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: SOUZA, R. M. (Ed). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer, 2008, p. 165-190.

BOISSEAU, M. et al. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.1, p.38-41, 2009.

BURNS, A. R. et al. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2015.

CARNEIRO, R. M. D. G. et al. *Meloidogyne paranaensis* n. sp.(Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v. 28, n. 2, p. 177, 1996.

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E. T. Taxonomy of Coffee-Parasitic Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R. M. (Ed). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer, 2008, p. 87-122.

CASTAGNONE-SERENO, P. et al. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 203-220, 2013.

CECCHINI, G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. **Annual Review of Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 77-109, 2003.

CHAWLA, S. et al. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11626-11634, 2018.

CONAGIN, C. H.; MENDES, A. J. T. Pesquisas citológicas e genéticas em três espécies de *Coffea*: auto-incompatibilidade em *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. **Bragantia**, v. 20, p. 788-804, 1961.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.

DAVIS, E. L.; MITCHUM, M. G. Nematodes. Sophisticated parasites of legumes. **Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 1182-1188, 2005.

DESAEGER, J.; DICKSON, D. W.; LOCASCIO, S. J. Methyl bromide alternatives for control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in tomato production in Florida. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 2, p. 140, 2017.

DUNIWAY, J. M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. **Phytopathology**, v. 92, n. 12, p. 1337-1343, 2002.

ELLING, A. A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology**, v. 103, n. 11, p. 1092-1102, 2013.

FASKE, T. R.; HURD, K. (2015). Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Fluopyram. **Journal of Nematology**, v. 47, n. 4, p. 316, 2015.

FAZUOLI, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B., Malavolta, E., Rocha, N., Yamada, J. (Ed). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**. Piracicaba, Brazil, Potafós, 1986, p. 87-113

GONÇALVES, W. et al. Manejo de nematóides na cultura do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – CAFÉ, 10., 2004, Mococa. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 2004, p. 48-66.

HORSEFIELD, R. et al. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 11, p. 7309-7316, 2006.

HUMPHREYS-PEREIRA, D. A. et al. *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. **Nematology**, v. 16, n. 6, p. 643-661, 2014.

JASMER, D. P.; GOVERSE, A.; SMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 245-270, 2003.

JONES, J. T. et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.

KANDEL, Y. R. et al. Impact of fluopyram fungicide and preemergence herbicides on soybean injury, population, sudden death syndrome, and yield. **Crop Protection**, v. 106, p. 103-109, 2018.

LABOURDETTE, G. et al. Fluopyram: efficacy and beyond on problematic diseases: Modern fungicides and antifungal compounds. In: Dehne, H. W. , Deising, H. B., Gisi, U., Kuck, K. H., Russell, P. E. & Lyr, H. (Ed). VI. 16th INTERNATIONAL REINHARDSBRUNN SYMPOSIUM, FRIEDRICHRODA, Germany, Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Selbstverlag, 2011. p. 75-80.

- MALUF, M. P. Genomic tools for the development of engineered *Meloidogyne*-resistant coffee cultivars. In: SOUZA, R. M. (Ed). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 191-205.
- MARTIN, F. N. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 325-350, 2003.
- MAZZOLA, M.; MANICI, L. M. Apple replant disease: role of microbial ecology in cause and control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 45-65, 2012.
- MOENS, M.; PERRY, R.; STARR, J. *Meloidogyne* species-a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Ed). **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2009, p. 483.
- NICOL, J. M. et al. Current nematode threats to world agriculture. In: JONES, J.T.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed). **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. Netherlands: Springer, 2011. p. 21-43.
- OKA, Y.; SAROYA, Y. Effect of fluensulfone and fluopyram on the mobility and infection of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2095-2106, 2019.
- OPPERMAN, C.H.; CHANG, S. Plant-parasitic nematode acetylcholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. **Journal of Nematology**, v. 22, n. 4, p.481, 1990.
- PROFFER, T. J. et al. Evaluation of dodine, fluopyram and penthiopyrad for the management of leaf spot and powdery mildew of tart cherry, and fungicide sensitivity screening of Michigan populations of *Blumeriella jaapii*. **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 747-754, 2013.
- QUIST, C. W.; SMANT, G.; HELDER, J. Evolution of plant parasitism in the phylum Nematoda. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 289-310, 2015.
- ROBERTS, P. A. et al. Concepts and consequences of resistance. In: STAR, J.L. et al. (Ed). **Plant resistance to parasitic nematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002. p. 23-41.
- SALGADO, S. M. L.; CARNEIRO, R. M. D. G.; PINHO, R. S. C. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. **EPAMIG, Belo Horizonte**, 2011.
- SALGADO, S.M.L.; REZENDE, J.C.D.; NUNES, J.A.R. Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 94-101, 2014.

SÁNCHEZ-MORENO, S. et al. Nematodes as indicators of fumigant effects on soil food webs in strawberry crops in Southern Spain. **Ecological Indicators**, v. 10, n. 2, p. 148-156, 2010.

SCALLIET, G. et al. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **PLoS One**, v. 7, n. 4, 2012.

SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA R.A.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2.ed. Wallingford: CABI Publishing, 2005, p. 319-392.

SILVA, J. O. et al. Efficacy of new nematicides for managing *Meloidogyne incognita* in tomato crop. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 5, p. 295-298, 2019.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

VELOUKAS, T., MARKOGLU, A. N.; KARAOGLANIDIS, G. S. Differential effect of *Sdh* B gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 97, n.1, p. 118-122. 2013.

WATSON, T. T. et al. Soil amendments influence *Pratylenchus penetrans* populations, beneficial rhizosphere microorganisms, and growth of newly planted sweet cherry. **Applied Soil Ecology**, v. 117, p. 212-220, 2017.

WATSON, T. T.; DESAEGER, J. A. Evaluation of non-fumigant chemical and biological nematicides for strawberry production in Florida. **Crop Protection**, v. 117, p. 100-107, 2019.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327-333, 2003.

WILLIAMSON, V. M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 7, p. 396-403, 2006.

ZASADA, I. A.; HALBRENDT, J. M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAMONDIA, J.; MCKENRY, M. V.; NOLING, J. W. Managing nematodes without methyl bromide. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 311-328, 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - Early and late responses characterise the resistance derived from Ethiopian wild germplasm Amphillo to *Meloidogyne paranaensis*

Published in *Nematology*, July 2019.

Authors

Paula Soares Alves¹; Bárbara Joana dos Reis Fatobene²; Sônia Maria de Lima Salgado³; Ana Cristina Meneses Mendes Gomes⁴; Vicente Paulo Campos¹; Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro⁴; Jorge Teodoro de Souza¹

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Nematologia, CP3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café / INCT Café

³Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Unidade Regional do Sul de Minas, Campus da UFLA, s/n, CP176, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Nematologia, CP02372, 70849-970, Brasília, DF, Brazil

Corresponding author: J.T De Souza, jorge.souza@dfp.ufla.br

Summary

Meloidogyne paranaensis is one of the most important pathogenic nematode species on coffee. Our aim with this study was to characterise the resistance of genotype '16-6-1', derived from germplasm 'Amphillo' of *Coffea arabica* to *M. paranaensis*. Second-stage juveniles (J2) penetrated the roots of '16-6-1' in lower numbers and at a slower pace as compared to the susceptible genotype. The strong blue fluorescence observed in the resistant, but not in the susceptible, genotype suggested that resistance responses occurred as early as 2 days after inoculation (DAI). Late responses involved the degradation of the giant cell at 14 DAI onwards in the resistant genotype, whereas nematode and giant cell development progressed normally in the susceptible genotype. Our results suggested that the resistance of genotype '16-6-1' is related to early and late defence responses. These results may be used to develop molecular markers linked to the resistance genes to use in breeding programmes.

Keywords: *Coffea arabica*, giant cells, histopathology, root-knot nematode

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the main group of phytonematodes that parasitize the coffee crop in the world (Campos & Villain, 2005). Among the 18 species described as pathogenic to coffee to date (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Humphreys-Pereira *et al.*, 2014), *Meloidogyne paranaensis* Carneiro *et al.*, 1996 stands out as one of the most important because it causes intense damage and destruction of the plant root system (Villain *et al.*, 2018). In addition, this species has spread greatly throughout Brazilian coffee regions (Terra *et al.*, 2018) and is widely distributed in other main production countries, such as Guatemala and Mexico (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Ferraz, 2008; Lopez-Lima *et al.*, 2015).

Coffea arabica L. is the major coffee species produced in the world, and most cultivars are susceptible to *M. paranaensis*. Research indicates that wild *C. arabica* genotypes from Ethiopia possess variability for resistance to *M. paranaensis* (Anzueto *et al.*, 2001; Boisseau *et al.*, 2009; Salgado *et al.*, 2014; Fatobene *et al.*, 2017), with potential to become good sources of resistance in breeding programmes. Accessions of *C. arabica* derived from crosses between Catuaí Vermelho and the wild germplasm Amphillo of *C. arabica* were selected as resistant to *M. paranaensis* in naturally infested fields (Salgado *et al.*, 2014). Peres *et al.* (2017) confirmed the resistance of these genotypes to *M. paranaensis* and *M. incognita* under greenhouse conditions. Although advanced generations of this material are already being developed, the resistance mechanisms of these *C. arabica* genotypes to *M. paranaensis* remain unknown.

Plants containing resistance (R) genes commonly exhibit defence responses to root-knot nematodes that may include accumulation of phenolic compounds and hypersensitive reaction (HR)-mediated cell death around the nematode feeding site. Hypersensitive reactions consist of localised and programmed cell death resulting from recognition of pathogen gene

products by specific plant R proteins. This reaction is followed by plant defence responses, such as release of active oxygen species, activation of the salicylic acid pathway (Dixon *et al.*, 1994) and production of phenolic compounds (Huang & Rhode, 1973; Bajaj & Mahajan, 1977; Pegard *et al.*, 2005). Activation of plant defence genes has been associated with HR and also with cell wall reinforcement, phytoalexin biosynthesis (Hutcheson, 1998), lignin deposition (Moerschbacher *et al.*, 1990) and pathogenesis-related (PR) protein secretion (Kemp *et al.*, 1999). Hypersensitive reactions have been observed in some plants infected by *Meloidogyne* species (Moon *et al.*, 2010; Khallouk *et al.*, 2011; Cabasan *et al.*, 2014; Marini *et al.*, 2016). This reaction can occur either in the early stages of parasitism, before the formation of the feeding site, leading to the death of the J2 and the inhibition of giant cell development, as reported for the *Mi* gene in tomato (Williamson & Kumar, 2006) and in pepper plants carrying the gene *Me3* (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998), or HR can also occur at subsequent late stages of parasitism, during or after the formation of feeding sites, suppressing pathogen development and reproduction as observed in peanut resistant to *M. arenaria* race 1 (Proite *et al.*, 2008). Senescence and death of giant cells has also been reported at later stages (7 days after penetration) in pepper plants containing the gene *Me1* (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998). However, in cowpea genotypes containing the resistance gene *Rk*, no evidence of HR occurrence was found (Das *et al.*, 2008). The absence of HR was also observed in sugar beet plants containing the gene *HspI^{pro1}*, which confers resistance to the cyst nematode *Heterodera schachtii* by interfering with the development of its feeding sites, the syncytia (Holtmann *et al.*, 2000).

In coffee, HR to *M. paranaensis* was observed in *C. canephora* (Lima *et al.*, 2015). Similar responses were found in *C. arabica* germplasm with introgression of *C. canephora* genes when infected by *M. incognita* (Albuquerque *et al.*, 2010) and *M. exigua* (Anthony *et*

al., 2005). Up to now the resistance responses against *M. exigua* involve only one gene denominated *Mex-1*, which is derived from *C. canephora* (Noir *et al.*, 2003). However, no histopathological studies have been carried out with *C. arabica* derived from wild Ethiopian genotypes.

The aim of this study was to characterise at the histological level the resistance of genotype '16-6-1', derived from wild germplasm Amphillo of *C. arabica* to *M. paranaensis*. The penetration and post-infective development of *M. paranaensis* in this resistant genotype was compared with the susceptible genotype 'Catuaí Vermelho IAC 144' to study the mechanisms of resistance.

Material and methods

Plant material

The genotypes were obtained from the *Coffea arabica* Active Germplasm Bank of Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). Genotype '16-6-1' derived from wild germplasm 'Amphillo' is resistant to *M. paranaensis* ('Catuaí Vermelho' x 'Amphillo MR 2-161 MG 0179 pl.1 R1') and cultivar 'Catuaí Vermelho IAC 144' was used as the susceptible control. The seeds of the genotypes were placed to germinate in trays containing autoclaved sand. Germinated seedlings were transplanted to 300 ml plastic cups containing sterile sand and maintained under greenhouse conditions (25-30°C). The seedlings were supplied with a controlled-release complex fertilizer (NPK 16-8-12) and monthly sprayed with foliar fertilizer (NPK 6-4-6 +micronutrients).

Nematode population

The population of *M. paranaensis* was collected in the municipality of Piumhi, Minas Gerais province, Brazil. The identity of the species was confirmed by using the esterase phenotype (Carneiro & Almeida, 2001). The population was multiplied in susceptible coffee plants of 'Catuaí Vermelho IAC 144' for 4 months. The eggs were extracted from infected roots using a 0.5% NaOCl solution according to the protocol of Hussey & Barker (1973) with the maceration for 30 s in a kitchen blender instead of manual agitation to release the eggs from the egg masses. The eggs were placed in a Baermann funnel to hatch and the required amount of second-stage juveniles (J2) inoculum was obtained by daily collecting freshly hatched J2 and storing at 4°C for a maximum of 4 days before using in the histopathological experiments.

Resistance assays

In the first experiment, 6-month-old seedlings of resistant and susceptible genotypes of *C. arabica* containing four pairs of leaves were transplanted to 3 l plastic pots containing a mixture of autoclaved soil and sand (1:1). Two weeks after transplanting, each plant was inoculated with a suspension containing 5000 eggs of *M. paranaensis*. The suspension was pipetted into four holes that were 5 cm deep and equidistant from the plant stem. The experimental design was completely randomised with two treatments and 18 replicates. In the second experiment, the age of the seedlings, the substrate, the experimental design and the number of replicates were as described for the first experiment. However, in this experiment, the seedlings of the same age were grown in plastic cups containing 300 ml of substrate and were inoculated with 1600 J2 of *M. paranaensis* 2 months after transplantation. The evaluation of both experiments was performed 4 months after the inoculations.

The reaction of the coffee genotypes to *M. paranaensis* was evaluated according to the following variables: final population of nematodes (g root)⁻¹, damage index and reproduction factor. Roots were stained with phloxine B for visualization of egg masses and determination of damage index, according to the scale proposed by Hussey & Jansen (2002), where 0 = absence of galls, 1 = traces of infection with some small galls, 2 = 25% of roots with galls, 3 = 25-50%, 4 = 51-75% and 5 = > 75%. Eggs were extracted as previously mentioned and then quantified under light microscopy using a Peters chamber. The final population was considered as the total number of J2 and eggs. The reproduction factor (RF) was calculated by the ratio between initial population ($P_i = 5000$ eggs) and final population (P_f). When $RF < 1$ the genotype is considered resistant, and $RF \geq 1$, susceptible (Sasser *et al.*, 1984).

The results were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and homogeneity of variances by the Levene test. Data were transformed in $\log(x + 1)$ and the *t*-test was performed ($P < 0.05$) to compare resistant and susceptible genotypes.

Dynamics of penetration of *M. paranaensis* in resistant and susceptible genotypes and histopathology

Seedlings of resistant genotype '16-6-1' and susceptible control 'Catuaí Vermelho IAC 144' that were approximately 6 months old were inoculated with 2500 J2 of *M. paranaensis* 2 months after transplantation. Half the number of plants was used to evaluate the dynamics of penetration and the other half was used in the histopathological study. The roots of each genotype were carefully removed at 2, 4, 6, 8, 10, 14, 22, 27, 37 and 47 days after inoculation (DAI) and washed thoroughly with tap water. The sampling times 14 and 22 were only used in the histopathological studies. Samples of three plants were collected at each

time point. Non-infected plants of resistant and susceptible genotypes were also collected for the histopathological study.

In the dynamics of penetration study, roots were stained with acid fuchsin (Byrd *et al.*, 1983) and were observed under a stereoscopic microscope to observe the penetration, location and stage of development of the nematode within the roots. Nematode quantification was performed in the whole root system. At 47 DAI the average weight of the ‘Catuaí Vermelho’ root system was 7.6 g, while for genotype ‘16-6 -1’ it was 4.1 g.

To perform histopathological observations, roots of infected and non-infected plants were cut into small fragments of approximately 2 mm and fixed in 1% solution of glutaraldehyde and 4% (v:v) formaldehyde in 100 mM phosphate buffer pH 7.2 for 24 h at 4°C. Dehydration of the material under agitation was carried out in an increasing ethanolic series of 10-100%, with intervals of 20 min between the exchanges. The root fragments were embedded in Technovit 7100® epoxy resin (Kulzer Friedrichsdorf) according to Pegard *et al.* (2005). The roots were cut with a Leica Ultracut UCT ultra-microtome in longitudinal and transversal slices that were 3.5 µm thick. Unstained roots sections were mounted on glass slides and fluorescence was observed under UV (Filter Set 01-488001-9901-000; Zeiss – UV excitation 365 nm and UV emission 395 nm). Subsequently, the same sections were stained with 0.5% toluidine blue in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 5.5 for 1 min at 60°C and observed under a light microscope.

Results

Resistance to *M. paranaensis* and dynamics of penetration and reproduction

Genotype ‘16-6-1’ was resistant to *M. paranaensis* according to two independent greenhouse experiments. Final populations of nematodes (g root)⁻¹, damage index and

reproduction factor were significantly higher in the susceptible genotype ‘Catuaí Vermelho IAC 144’ as compared to the resistant genotype ‘16-6-1’ in both experiments (Table 1). The reproduction factor of *M. paranaensis* in the genotype ‘16-6-1’ was lower than 1 (RF <1), whereas in ‘Catuaí Vermelho’ was higher than 1 (RF ≥ 1), in the first and second experiments. When RF <1, the genotype is considered resistant, and RF ≥ 1, susceptible (Sasser *et al.*, 1984).

Table 1. Reproduction of *Meloidogyne paranaensis* in roots of susceptible and resistant coffee genotypes under greenhouse conditions.

Genotype	Experiment 1			Experiment 2		
	Nematodes (g root) ⁻¹	Damage index	RF	Nematodes (g root) ⁻¹	Damage index	RF
‘Catuaí Vermelho’	1578 a	2.94	6	510 a	2.89	2.18
‘16-6-1’	37 b	1	0.074	61 b	1	0.13

Mean values of 18 replicates are shown for final population of nematodes (g root)⁻¹, damage index and reproduction factor (RF) in two independent experiments. Mean values followed by different lowercase letters in the columns are significantly different according to the *t* test ($P < 0.05$).

J2 of *M. paranaensis* penetrated in roots of the susceptible genotype in higher numbers and at a faster rate than in the resistant genotype. While penetration in the susceptible genotype peaked at 4 days after the inoculation (DAI) and remained high at 6 DAI, it was only high at 6 DAI in the resistant genotype (Fig. 1). For both, susceptible and resistant

genotypes, the number of J2 was similar at 8 DAI; however, it decreased sharply in the resistant genotype from 10 DAI onwards and remained constant in the susceptible genotype. In the susceptible genotype the nematodes began to moult to third-(J3) and fourth-stage juveniles (J4) 10 DAI, whereas the first J3/J4 were only observed at 27 DAI in the resistant genotype. Young females were observed at 37 DAI in the susceptible genotype. At 37 and 47 DAI, developed females were found in the susceptible but not in the resistant genotype (Fig. 1).

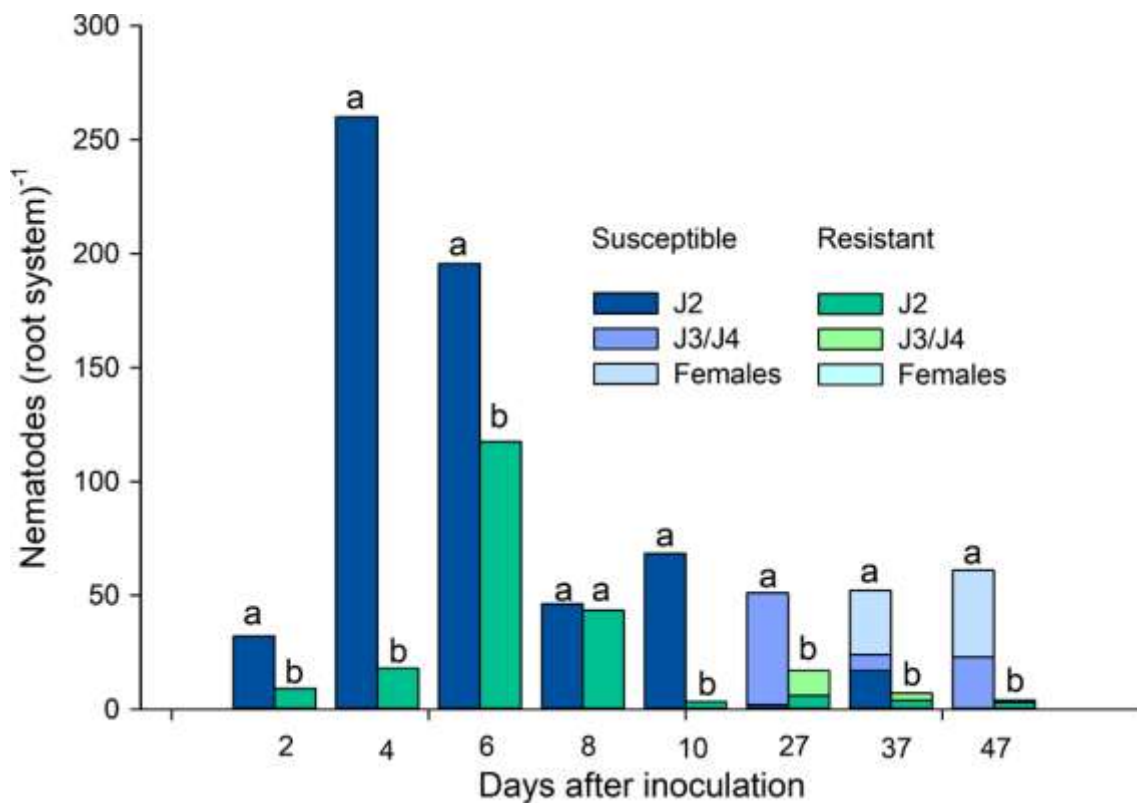


Fig. 1. Dynamics of penetration and development of *Meloidogyne paranaensis* in the susceptible genotype ‘Catuaí Vermelho’ and in the resistant genotype ‘16-6-1’. Mean number of nematodes (g root)⁻¹; data were transformed in Log (x+1). Mean values of 18 replicates. Different letters on the columns indicate significant differences between the susceptible and the resistant genotypes according to the *t* test ($P < 0.05$).

Histopathology

Histological analysis of coffee roots

Comparative analyses of *M. paranaensis*-infected and non-infected tissues were performed. Sections of the root tissue of coffee genotypes were observed under a light microscope after toluidine blue staining and under UV light with a fluorescence microscope. Non-infected tissues of the susceptible genotype showed the cortex as the most external cell layer followed by the endodermis and the vascular cylinder as the most internal (Fig. 2A). The cortex is composed of bigger cells when compared to the endodermis and the vascular bundle. The endodermis is formed by a single continuous layer of compacted and interconnected cells located between the cortex and the vascular cylinder. The vascular cylinder contains the vascular bundles that appear in variable numbers (Fig. 2A). Infected tissues of the susceptible genotype show a disorganised endodermis and vascular cylinder, with the vascular bundles pushed toward the root cortex due to rearrangements of the vascular cylinder to accommodate the giant cells induced by the nematode (Fig. 2B). A similar morphological organisation was observed for the infected and non-infected resistant genotype (data not shown). However, there were differences in the morphology of the giant cells as will be shown below.

Coffee roots show natural autofluorescence under UV light in the exodermis, a single layer of cells with suberised walls that surround the cortex, and in the vascular bundles. The epidermis, cortex and vascular cylinder of uninfected roots have lower autofluorescence (Fig. 2C). Roots of the non-infected resistant genotype showed similar results (data not shown). However, infected tissues of the resistant genotype exhibited a strong blue fluorescence at the cortex at 2 DAI (Fig. 2D). At this time the J2 were moving in the cortex to reach the vascular cylinder. The blue fluorescence indicates the presence of defence related compounds.

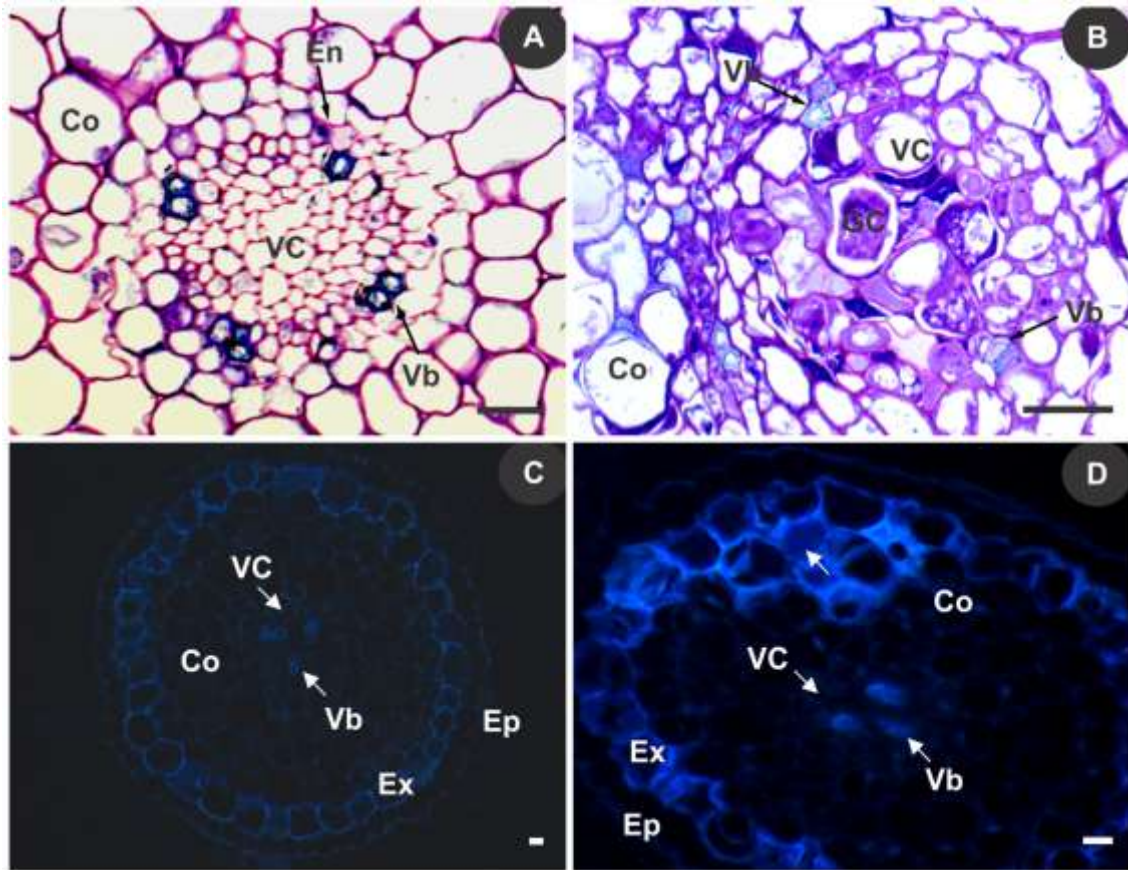


Fig. 2. Sections from roots of *Coffea arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 144’ (susceptible genotype) and *C. arabica* genotype ‘16-6-1’ (resistant genotype). A, B: Toluidine blue staining; C, D: UV fluorescence observation. A: Sections from roots of the non-infected susceptible genotype; B: Sections from roots of susceptible genotype infected by *Meloidogyne paranaensis* and onset of feeding sites at 6 days after inoculation; C: Sections from roots of non-infected susceptible genotype without blue fluorescence of tissues; D: Sections from roots of resistant genotype infected with *M. paranaensis* and the strong blue fluorescence of the root cortex cells. GC = giant cell, Vb = vascular bundles, VC = vascular cylinder, Co = cortex, En = endodermis, Ex = exodermis, Ep = epidermis. White arrows showing autofluorescence in cells. (Scale bars = 20 μm).

Histopathology of the interaction between the susceptible genotype and *M. paranaensis*

Root sections stained with fuchsin and toluidine blue showed that at 2 DAI a high number of J2 penetrated the root tips and reached the apical meristem (Fig. 3A). Changes in the vascular cylinder to form the giant cells were first visualised at 4 DAI (data not shown). At 6 and 8 DAI, J2 were observed in the vascular cylinder of the root with the giant cells in development (Fig. 3B, C). It was also possible to visualise J2 in the root cortex at 8 DAI (Fig. 3C). At 14 DAI, hypertrophied giant cells with nuclei, dense cytoplasm and small vacuoles were observed in the vascular cylinder (Fig. 3D, E). The stages J3/J4 were observed at 14 DAI (Fig. 3D) and at 22 DAI J4 were still found (Fig. 3F). Well-developed females and giant cells were visualised at 37 and 47 DAI (Fig. 3G). At 47 DAI females were visualised in roots stained with acid fuchsin (Fig. 3H).

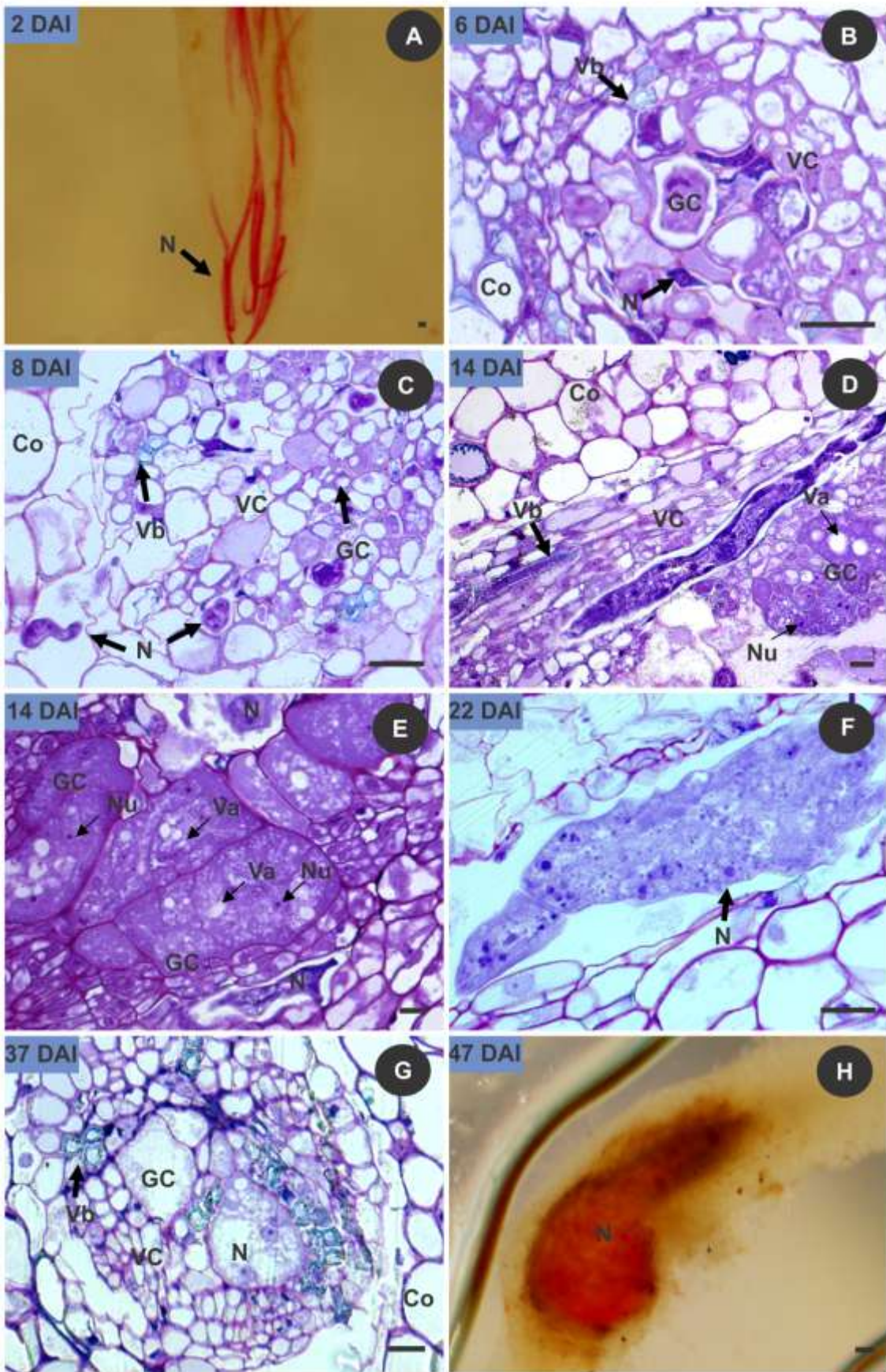


Fig. 3. Sections from roots of *Coffea arabica* ‘Catuaí Vermelho IAC 144’ (susceptible genotype) infected with *Meloidogyne paranaensis*. A, H: Staining with acid fuchsin; B-G: Toluidine blue staining. A: Nematodes penetrating the tips of the roots and reaching the apical meristem; B: Second-stage juvenile (J2) in the vascular cylinder at 6 days after inoculation (DAI) and beginning of feeding site formation; C: Nematode (J2) in the vascular cylinder at 8 DAI and formation of the feeding site; D, E: Third- and fourth-stage (J4) juveniles and giant cells hypertrophied with dense cytoplasm and nuclei at 14 DAI; F: nematode (J4) at 22 DAI; G: Nematode and giant cell in vascular cylinder at 37 DAI; H: female at 47 DAI. N = nematode, GC = giant cell, Nu = nucleus, Vb = vascular bundles, Va = vacuole, VC = vascular cylinder, Co = cortex, En = endodermis, Ex = exodermis, Ep = epidermis. (Scale bars = 20 μm).

Histopathology of the interaction between the resistant genotype and *M. paranaensis*

In the resistant genotype ‘16-6-1’ fluorescence microscopy using UV excitation of root sections harvested at 2 DAI showed a strong blue autofluorescence in several of the infection sites examined (Fig. 4A), indicating accumulation of defence-related compounds in the roots at early stages of infection, soon after nematode penetration. This strong autofluorescence was observed in all evaluations, from 2 to 47 DAI (data not shown). From 2 to 8 DAI, several J2 were found in the root cortex (Fig. 4A, C) and at 6 DAI J2 were observed in the vascular cylinder initiating the formation of feeding sites (Fig. 4B). Nematodes were observed in the cortex and in the vascular cylinder and giant cells were only in the vascular cylinder at 8 DAI (Fig. 4C). The cortex cells close to the nematode were necrotic as indicated by a dark blue colouration (Fig. 4C). Necrotic tissues stained with toluidine blue indicate accumulation of compounds that may be related to plant defence. At 14 DAI nematodes and

giant cells with large vacuoles and some nuclei were observed (Fig. 4D). Some giant cells were empty at 14 DAI with a strong dark blue colour between them indicating putative cell death (Fig. 4E). Empty giant cells were also observed at 22 and 37 DAI (Fig. 4F, G). At 47 DAI nematodes were J3/J4 (Fig. 4H).

Comparative analyses of the interaction between the susceptible and resistant genotypes with *M. paranaensis*

J2 penetrated the roots of both genotypes at 2 DAI (Figs 3A, 4A); however, a lower number of J2 penetrated roots of the resistant genotype (Fig. 1). Strong blue autofluorescence was observed at 2 DAI in the cortex of roots of the resistant genotype, indicating that the defence responses were acting locally (Figs 2C, 4A). Autofluorescence was visualised from 2 to 47 DAI in the inoculated resistant genotype (data not shown). This strong autofluorescence has never been observed in the inoculated susceptible genotype (data not shown). The presence of J2 in the vascular cylinder initiating feeding sites was observed in both susceptible and resistant genotypes at 6 DAI (Figs 3B, 4B). Up to 14 DAI giant cell development seemed to be similar in susceptible and resistant genotypes. However, at 14 DAI (Fig. 4D, E) and also at 22 and 37 DAI (Fig. 4F, G), several empty giant cells were observed in the resistant genotype, indicating that degeneration of the feeding site was occurring. In susceptible plants no degenerate giant cells were found (Fig. 3E, G) and adult females could be observed at 37 (Figs 1, 3G) and at 47 DAI (Fig. 3H). In the resistant genotype nematode development was delayed and no females were found at 47 DAI (Fig. 1), but J3/J4 could be observed (Fig. 4H).

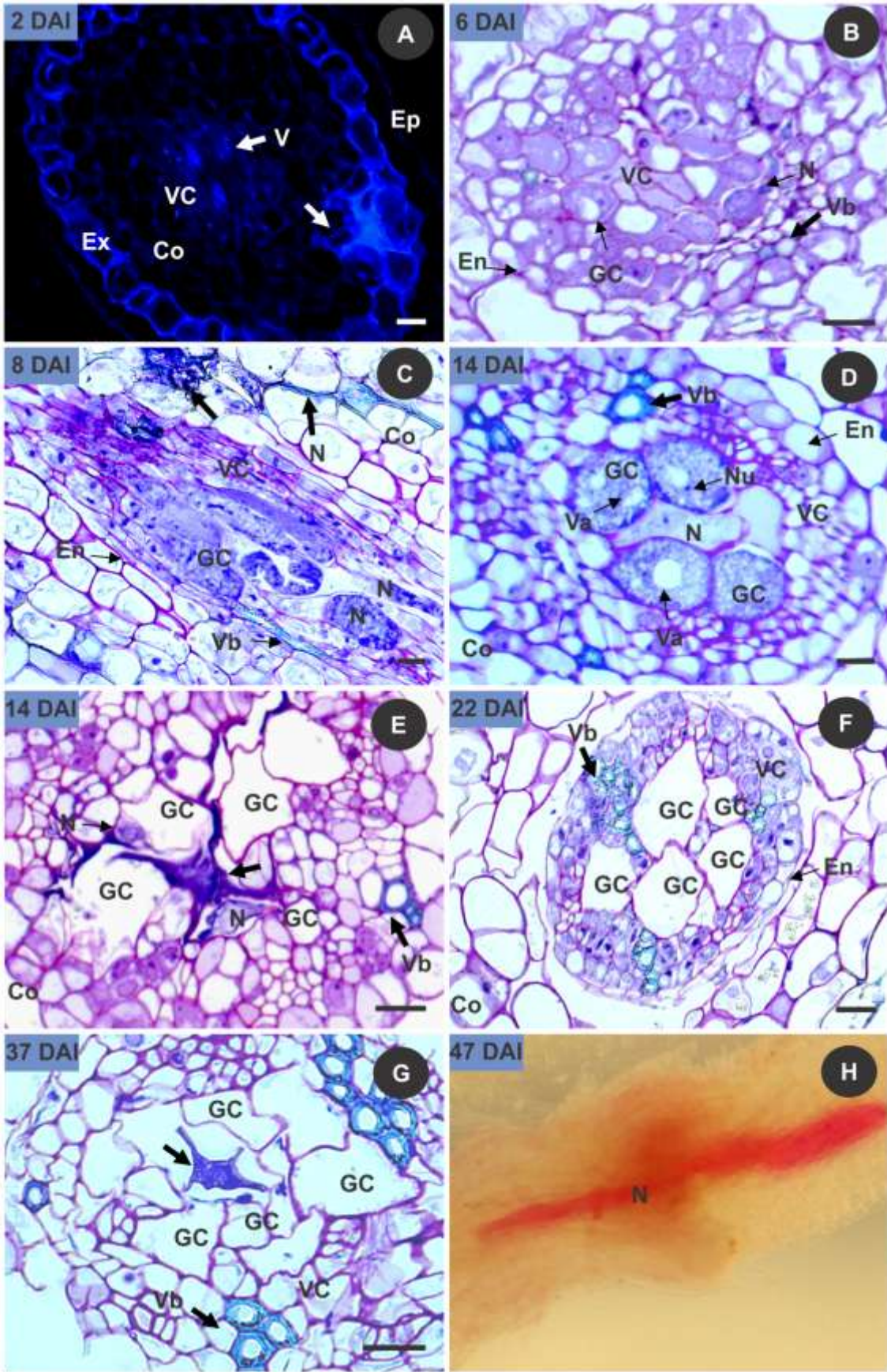


Fig. 4. Sections from roots of *Coffea arabica* ‘16-6-1’ (resistant genotype) infected with *Meloidogyne paranaensis*. Scale bars = 20 µm. A: UV fluorescence observation; B-G: Toluidine blue staining; H: Staining with acid fuchsin. A: A strong fluorescence in the cortex of the roots at 2 days after inoculation (DAI); B: Onset of feeding site formation at 6 DAI; C: Nematode and feeding site in vascular cylinder and cell death and nematode in the cortex at 8 DAI; D: Nematode in the vascular cylinder and giant cells with large vacuoles at 14 DAI; E: Nematodes and giant cells without cytoplasm and necrosis at 14 DAI; F: Giant cells without cytoplasm at 22 DAI; G: Giant cells without cytoplasm and necrosis between them at 37 DAI; H: Third- and fourth-stage juveniles at 47 DAI. N = nematode, GC = giant cell, Vb = vascular bundles, Va = vacuole, Nu = nucleus, VC = vascular cylinder, Co = cortex, Ep = epidermis, Ex = exodermis, En = endodermis. White arrows showing autofluorescence in cells and black arrow showing putative necrosis.

Discussion

In this study, the resistance of genotype ‘16-6-1’ of *Coffea arabica* to *M. paranaensis* was investigated in greenhouse experiments and in histopathological observations. The reproduction factor (RF) of *M. paranaensis* in roots of the resistant genotype was lower than 1 and higher than 1 in the susceptible genotype. Although strong resistance responses of the plant were observed, including accumulation of phenolic compounds and cell death, the nematode was able to reproduce at low rates in roots of the resistant genotype. These defence responses were neither fast nor strong enough to inhibit nematode reproduction completely.

‘Amphillo’ is an Ethiopian cultivar of *C. arabica* introduced in Brazil in 1953 and registered as IAC 1167-19. The plant ‘Amphillo MR 2-161’, from S₃ generation of IAC 1167-19, was selected as resistant to *M. incognita* in field and greenhouse conditions in the 1970s

(Fazuoli, 1986). Since then, Brazilian *C. arabica* breeding programmes have employed resistant ‘Amphillo’ plants as sources of resistance to nematodes. Genotype ‘16-6-1’, evaluated in this study, represents a F₆ generation of cross between ‘Catuaí Vermelho’ and ‘Amphillo MR 2-161’ (Salgado *et al.*, 2014). Our study adds more knowledge on the resistance of genotype ‘16-6-1’ to *M. paranaensis*.

The histopathological observations revealed autofluorescence and vacuolisation of the giant cells produced in the resistant genotype. The vacuolization is related to the accumulation of hydrolases and toxins and a calcium flux in the cytoplasm, which is a common feature of HR in different resistant plant species (Jones, 2001; Mota *et al.*, 2013; Cabasan *et al.*, 2014). The autofluorescence is associated with the accumulation of phenolic compounds that may have a role in plant defence, including against nematodes (Bajaj & Mahanaj, 1977; Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Chlorogenic acid has been identified as the main phenolic compound present in resistant plants and may be responsible for the delay in nematode development (Huang & Rhode, 1973; Pegard *et al.*, 2005).

It is possible to categorise the mechanisms of resistance to root-knot nematodes in pre-infection and post-infection resistance (Anwar & McKenry, 2000; Bendezu & Starr, 2003). Pre-infection resistance is related to the failure of the nematode to penetrate the roots, which is due to the presence of toxic or antagonistic chemicals in root tissues (Bendezu & Starr, 2003). In this study, the number of J2 that penetrated the roots of the genotype ‘16-6-1’ was lower and penetration occurred at a slower pace when compared to the susceptible genotype (Fig 1). Similar results were found in grape rootstocks resistant to *M. arenaria* (Anwar & McKenry, 2000) and in peanut resistant to *M. arenaria* (Bendezu & Starr, 2003).

In post-infection mechanisms, resistance acts after nematode penetration occurs, preventing its development and reproduction (Cook & Evans, 1897). After nematode

penetration the absence of essential nutrients required for nematode development led to the egression of J2 from roots of resistant plants (Huang, 1985). In this study there was a reduction in the number of J2 inside the roots of both resistant and susceptible genotypes at 8 DAI, which could be explained by the exit of J2 that were unable to establish a feeding site, as observed in peanut and alfalfa (Bendezu & Starr, 2003; Dhandaydham *et al.*, 2008).

The mechanism of post-infection resistance also occurs due to the presence of host resistance genes (R) that inhibit the establishment of nematodes. For example, the *Mi* gene confers resistance to root-knot nematodes by inducing a rapid and strong HR that results in host cell death before the initiation of the feeding sites. This response takes place within 24 h after host invasion and in nematode-resistant tomatoes neither the feeding site nor the nematodes develop (Paulson & Webster, 1972). Another example of R gene that acts in a similar manner is the *Me3* gene in pepper (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998). The defence responses observed in this study differ to a certain extent. The resistant genotype exhibited accumulation of phenolic compounds and cellular necrosis, indicated by the blue autofluorescence and strong staining with toluidine blue at 2 DAI, but the resistance responses were not strong enough completely to inhibit nematode infection and reproduction.

The gene *Hero A* described in tomato confers resistance to cyst nematodes and initiates its response after feeding site induction by the nematode, leading to atrophy or abnormal development of the syncytia (Sobczak *et al.*, 2005). In plants containing the gene *HsI^{pro1}*, cyst nematodes die due to degradation of the feeding site, without evidences of HR (Holtmann *et al.*, 2000). These responses undermine the extended functioning of feeding sites as metabolically active transfer cells. The lack of nutrients reduces the growth and development of females and egg production. This type of delayed or late resistance response may or may not be related to HR responses (Das *et al.*, 2008; Kandoth & Mitchum, 2013).

Most cyst and root-knot nematodes resistance genes described so far act in this way, including *H1* in potato, *Me1* in pepper, *Rk* in cowpea, *Gpa2* in potato (Rice *et al.*, 1987; Bleve-Zacheo *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2008; Palomares-Rius *et al.*, 2012). The only resistance gene described in coffee is the *Mex-1* gene derived from *C. canephora*, which confers resistance to *M. exigua* (Noir *et al.*, 2003). Coffee genotypes containing the *Mex-1* gene allow the formation of the feeding site, but it degrades over time (Anthony *et al.*, 2005), allowing for low rates of nematode reproduction. Genotype '16-6-1' exhibited a pattern of defence responses similar to what was described in these studies. The feeding site was formed, but its degradation occurred before 14 DAI, because at this time there were giant cells with large vacuoles (Fig. 4D) and some of them without cytoplasm (Fig. 4E). However, some nematodes escaped these defence responses and reproduced. The gene *Mex-1* is probably not involved in the resistance of *C. arabica* 'Amphillo 16-6-1' to *M. paranaensis* because this genotype is susceptible to *M. exigua* (Fatobene *et al.*, 2018). On the other hand, *C. canephora* genotypes containing the gene *Mex-1* may behave as susceptible to *M. paranaensis* (Lima *et al.*, 2015).

Molecular analyses of R genes such as *Mi* and *Hero A* that confer resistance to root-knot and cyst nematodes, respectively, revealed that their protein products are classified in the same group and share highly conserved amino acid domains, which include a central conserved region with a nucleotide-binding site (NBS) and a C-terminal leucine rich repeat (LRR) region (Williamson & Kumar, 2006). Although they are both cytoplasmic proteins with a similar structure, the timing, localisation and amplitude of the response varies greatly. It is possible that the gene *Mi* recognises early root-knot nematode effectors, showing a fast and strong response against root-knot nematodes, whilst the gene *Hero A* recognises late cyst nematodes effectors and thus shows late responses to nematode infection.

The results of this study demonstrated that the pre-infection and post-infection mechanisms act on the resistance of genotype '16-6-1' to *M. paranaensis*. Pre-infection mechanisms were responsible for the reduction of penetration of J2 in the resistant genotype when compared to the susceptible genotype. On the other hand, the post-infection mechanisms acted in the early stages of parasitism killing some J2 after penetration and in late stages degrading the giant cells, preventing many nematodes from reaching the reproductive stage. These results begin to shed light on the mechanism of the resistance against *M. paranaensis* in genotype '16-6-1' and give support for further studies employing time-course gene expression experiments with RNAseq analyses. Furthermore, it opens new opportunities to find markers associated with the resistance to use in molecular breeding programmes.

Acknowledgments

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for providing a scholarship to the first and senior authors. This work was funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais), INCT-Café (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café) and Consórcio Brasileiro de Pesquisas em Café.

References

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. & Grossi-de-Sá, M.F. (2010). Resistance to

Meloidogyne incognita expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology* 127, 365–73. DOI 10.1007/s10658-010-9603-3

Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M. & Nicole, M. (2005). Hypersensitive-like reaction conferred by the *Mex-1* resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. *Plant Pathology* 54, 476–82. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2005.01239.x

Anwar, S.A. & McKenry, M.V. (2002). Penetration and development of *Meloidogyne arenaria* on two new grape rootstocks. *Journal of nematology* 34, 143-145.

Anzueto, F., Bertrand, B., Sarah, J.L., Eskes, A.B. & Decazy, B. (2001). Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica* 118, 1-8.

Bajaj, K.L. & Mahajan, R. (1977). Phenolic compounds in tomato susceptible and resistant to *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood. *Nematologia Mediterranea* 5, 329-333.

Bendezu, I.F. & Starr, J.L. (2003). Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of nematology* 35, 115-118.

Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M., Melillo, M.T. & Castagnone-Sereno, P. (1998). The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science* 133, 79-90. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00021-1

Boisseau, M., Aribi, J., Sousa, F.R.D., Carneiro, R.M.D.G. & Anthony, F. (2009). Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 34, 38-41.
DOI: 10.1590/S1982-56762009000100006

Byrd Jr, D.W., Kirkpatrick, T. & Barker, K.R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of nematology* 15,142-143.

Cabasan, M.T.N., Kumar, A., Bellafiore, S. & De Waele, D. (2014). Histopathology of the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology* 16, 73-81. DOI:10.1163/15685411-00002746

Campos, V.P. & Villain, L. (2005). Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (Eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 529–579.

Carneiro, R.M.D.G. & Almeida, M.R.A. (2001). Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25, 35-44.

Carneiro, R.M.D.G. & Cofcewicz, E.T. (2008). Taxonomy of coffee-Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Berlin, Germany, Springer, pp. 87-122.

Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, M.O., Santos, M.S.N.A. & Almeida, M.R. (1996). *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28, 177–89.

Cook, R. & Evans, K. (1987). Resistance and tolerance. In: Brown, R.H. & Kerry, B.R. (Eds). *Principles and practice of nematode control in crops*. New York, NY, USA, Academic Press, pp. 179-231.

Das, S., DeMason, D.A., Ehlers, J.D., Close, T.J. & Roberts, P.A. (2008). Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany* 59, 1305-1313. DOI: 10.1093/jxb/ern036

Dhandaydham, M., Charles, L., Zhu, H., Starr, J.L., Huguet, T., Cook, D.R., Prospero, J.M. & Opperman, C. (2008). Characterization of root-knot nematode resistance in *Medicago truncatula*. *Journal of Nematology* 40, 46-54.

Dixon, R.A., Harrison, M.J. & Lamb, C.J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32, 479-501. DOI: 10.1146/annurev.py.32.090194.002403

Fassuliotis, G. (1979). Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Lamberti, F. & Taylor, C.E. (Eds). *Root-knot nematodes (Meloidogyne species). Systematics, biology and control*. New York, NY, USA, Academic Press, pp. 425-453.

Fatobene, B.J.R., Andrade, V.T., Aloise, G.S., Silvarolla, M.B., Gonçalves, W. & Guerreiro Filho, O. (2017). Wild *Coffea arabica* resistant to *Meloidogyne paranaensis* and genetic parameters for resistance. *Euphytica* 213, 196. DOI: 10.1007/s10681-017-1986-1

Fatobene, B.J.R., Terra, W.C., Ferreira, F.R.C., Alves, P.S. & Salgado, S.M.L. (2018). Comportamento diferenciado de progênies de *Coffea arabica* germoplasma Anfilo a *Meloidogyne paranaensis* e *M. exigua*. 44 Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Franca SP, Brazil. [Abstr.]

Fazuoli, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B., Malavolta, E., Rocha, N., Yamada, J. (Eds). *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro*. Piracicaba, Brazil, Potafós, 1986. pp. 87-113.

Ferraz, L.C.C.B. (2008). Plant parasitic nematodes of coffee in Brazil. In: Souza, R.M. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes of Coffee*. Berlin, Germany, Springer, pp. 225–48.

Holtmann, B., Kleine, M., & Grundler, F.M.W. (2000). Ultrastructure and anatomy of nematode-induced syncytia in roots of susceptible and resistant sugar beet. *Protoplasma* 211, 39-50.

Huang, C., & Rohde, R.A. (1973). Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5, 253-258.

Huang, J.S. (1985). Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne*. Raleigh, NC, USA, North Carolina State University Graphics, pp. 165-174.

Humphreys-Pereira, D.A., Flores-Chaves, L., Gómez, M., Salazar, L., Gómez-Alpízar & L., Elling, A.A. (2014). *Meloidogyne lopezi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne species*. *Nematology* 16, 643-661. DOI: 10.1163/15685411-00002794

Hussey, R.S. & Barker, K.R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-1028.

Hussey, R.S. & Janssen, G.J.W. (2002). Root-knot nematode: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L., Cook, R. & Bridge, J. (Eds). *Plant resistance to parasitic nematodes*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 43–70.

Hutcheson, S.W. (1998). Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36, 59-90. DOI: 10.1146/annurev.phyto.36.1.59

Jones, A.M. (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125, 94-97. DOI: doi.org/10.1104/pp.125.1.94

Kandath, P.K., & Mitchum, M.G. (2013). War of the worms: how plants fight underground attacks. *Current opinion in plant biology* 16, 457-463. DOI: 10.1016/j.pbi.2013.07.001

Kemp, G., Botha, A.M., Kloppers, F.J. & Pretorius, Z.A. (1999). Disease development and β -1,3-glucanase expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 45-52. DOI: 10.1006/pmpp.1999.0204

Khallouk, S., Voisin, R., Van Ghelder, C., Engler, G., Amiri, S. & Esmenjaud, D. (2011). Histological mechanisms of the resistance conferred by the *Ma* gene against *Meloidogyne incognita* in *Prunus* spp. *Phytopathology* 101, 945-951. DOI:10.1094/PHYTO-01-11-0004

Lima, E.A., Furlanetto, C., Nicole, M., Gomes, A.C.M.M., Almeida, M.R.A., Jorge-Junior, A., Correa, V.R., Salgado, S.M.L., Ferrão, M.A. & Carneiro, R.M.D.G. (2015). The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee Conilon clone 14 to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Phytopathology* 105, 805-814. DOI: 10.1094/PHYTO-08-14-0232-R

Lopez-Lima, D., Sánchez-Nava, P., Carrion, G., Espinosa de los Monteros, A. & Villain, L. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European journal of plant pathology* 141, 623-629. DOI 10.1007/s10658-014-0564-9

Marini, P.M., Garbuglio, D.D., Dorigo, O.F. & Machado, A.C. (2016). Histological characterization of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Avena sativa*. *Tropical Plant Pathology* 41, 203-209. DOI 10.1007/s40858-016-0088-2

Moerschbacher, B.M., Noll, U., Gorrichon, L. & Reisener, H.-J. (1990). Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiology* 93, 465-470. DOI: 10.1104/pp.93.2.465

Moon, H.S., Khan, Z., Kim, S.G., Son, S.H. & Kim, Y.H. (2010). Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *The Plant Pathology Journal* 26, 149-153.

Mota, F.C., Alves, G.C.S., Giband, M., Gomes, A.C.M.M., Sousa, F.R., Mattos, V.S., Barbosa, V.H.S., Barroso, P.A.V., Nicole, M., Peixoto, J.R., Rocha, M.R. & Carneiro, R.M.D.G. (2013). New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. *Plant Pathology* 62, 1173-1183. DOI: 10.1111/ppa.12022

Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of Phytopathology* 30, 369-389. DOI:10.1146/annurev.py.30.090192.002101

Noir, S., Anthony, F., Bertrand, B., Combes, M.C. & Lashermes, P. (2003). Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 52, 97–103. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2003.00795.x

Palomares-Rius, J.E., Hedley, P.E., Cock, P.J., Morris, J.A., Jones, J.T., Vovlas, N. & Blok, V. (2012). Comparison of transcript profiles in different life stages of the nematode *Globodera pallida* under different host potato genotypes. *Molecular Plant Pathology* 13, 1120-1134. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2012.00821.x

Paulson, R.E. & Webster, J.M. (1972). Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 2, 227-234. DOI: 10.1016/0048-4059(72)90005-7

Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. & Djian-Caporalino, C. (2005). Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95, 158–165. DOI: 10.1094/PHYTO-95-0158

Peres, A.C.J., Salgado, S.M.L., Correa, V.R., Santos, M.F.A., Mattos, V.S., Monteiro, J.M.S. & Carneiro, R.M.D.G. (2017). Resistance of *Coffea arabica* genotypes against *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* under controlled and field conditions. *Nematology* 19, 617-626. DOI: 10.1163/15685411-00003075

Proite, K., Carneiro, R., Falcão, R., Gomes, A., Leal-Bertioli, S., Guimarães, P. & Bertioli, D. (2008). Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology* 57, 974-980. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01861.x

Rice, S.L., Leadbeater, B.S.C. & Stone, A.R. (1985). Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene *H1* derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Physiological Plant Pathology* 27, 219-234. DOI: 10.1016/0048-4059(85)90069-4

Salgado, S.M.L., Rezende, J.C.D. & Nunes, J.A.R. (2014). Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14, 94-101. DOI:10.1590/1984-70332014v14n2a17

Sasser, J.N., Carter, C.C. & Hartman, K.M. (1984). *Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, USA.

Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M.S., Ernst, K. & Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 158-168. DOI: 10.1094/MPMI-18-0158

Terra, W.C., Silva, J.C.P., Campos, V.P. & Salgado, S.M.L. (2018). Root-knot and lesion nematodes in coffee seedlings produced in the state of Minas Gerais, Brazil. *Coffee Science* 13, 178-186.

Villain, L., Salgado, S.M.L. & Trinh, P.Q. (2018). Nematodes parasites of coffee and cocoa. In: Sikora, R.A., Coyne, D.L., Hallman, J. & Timper, P. (Eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 536-583.

Williamson, V.M. & Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22, 396-403. DOI: 10.1016/j.tig.2006.05.003

**ARTIGO 2 – Metabolômica na caracterização da resistência de *Coffea arabica* Amphillo
a *Meloidogyne paranaensis***

Autores: Paula Soares Alves¹, Bárbara Joana dos Reis Fatobene², Alan Rodrigues Teixeira Machado³, Sônia Maria de Lima Salgado⁴, Vicente Paulo Campos¹, Denilson Ferreira de Oliveira¹, Jorge Teodoro de Souza¹.

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Nematologia, CP3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil

² Consórcio Brasileiro de Pesquisas em Café

³Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brasil

⁴Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Unidade Regional do Sul de Minas, Campus da UFLA, s/n, CP176, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

Corresponding author: P. S. ALVES, paulaalvesagn.pa@gmail.com

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Nematology*

(Versão preliminar)

Resumo

Meloidogyne paranaensis é uma das principais espécies de fitonematóides que parasitam o cafeeiro, sendo o controle genético utilizado como a principal forma de manejo. O trabalho teve como objetivo identificar metabólitos que possam estar relacionados à resistência do genótipo 16-6-1, derivado do germoplasma silvestre Amphillo de *Coffea arabica*, à *Meloidogyne paranaensis*, por meio de análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Plântulas do genótipo 16-6-1 e da cultivar Catuai Vermelho IAC 144 foram inoculadas com J2 de *M. paranaensis*. Aos 0, 2, 4, 8, 14, 22 e 32 dias após inoculação (DAI), folhas foram coletadas para as análises de RMN de ^1H . Foram identificadas as substâncias sacarose, α -glicose, β -glicose, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina nas folhas das plantas resistente e suscetível. A concentração de sacarose foi superior no genótipo resistente 16-6-1 aos 8 e 14 DAI, enquanto a concentração de trigonelina foi inferior no genótipo 16-6-1 aos 14 DAI. Antes da inoculação das plantas com *M. paranaensis*, aos 0 DAI, a concentração de α -glicose foi menor no genótipo 16-6-1 quando comparada a cultivar suscetível. Porém, houve aumento da concentração a partir dos 2 DAI, igualando-se a concentração encontrada na cultivar Catuai Vermelho IAC 144. Não houve diferença para os metabólitos cafeína, ácido clorogênico e β -glicose entre as plantas do genótipo 16-6-1 e cultivar Catuai Vermelho IAC 144. A principal diferença encontrada foi na concentração de sacarose, o que sugere que esse metabólito é o responsável pela resistência do genótipo 16-6-1 a *M. paranaensis*.

Palavras-chave: Nematoides das galhas, metabolômica, ressonância magnética nuclear.

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos que causam danos severos à produção de café no mundo inteiro (Campos & Villain, 2005). Dentre as espécies de maior importância para o cultivo do café, *Meloidogyne paranaensis* Carneiro *et al.* (1996) tem sido destaque devido à sua agressividade e distribuição em regiões produtoras como Brasil, Guatemala, Havaí e México (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Lopez-Lima *et al.*, 2014). A espécie induz sintomas como necrose de raízes, redução do crescimento, desfolha e pode causar morte de plantas (Campos & Villain, 2005; Terra *et al.*, 2019).

A resistência genética é um dos métodos mais eficazes para o controle de nematoides em solos já infestados (Bertrand & Anthony, 2008). Entretanto, a maioria das cultivares disponíveis para *Coffea arabica* L. são suscetíveis à *M. paranaensis*, com exceção de IPR 100 e IPR 106 (Sera *et al.*, 2017; Ito *et al.*, 2008). Fontes de resistência à *M. paranaensis* foram encontradas em acessos silvestres de *C. arabica* na região de Amphillo localizada na Etiópia, representando uma fonte de variabilidade para desenvolvimento de novas cultivares (Anzueto *et al.*, 2001; Boisseau *et al.*, 2009). O cruzamento entre Catuaí Vermelho e o germoplasma silvestre Amphillo de *C. arabica* resultou em acessos de *C. arabica* com resistência comprovada à *M. paranaensis* e *M. incognita* (Salgado *et al.*, 2014; Peres *et al.*, 2017; Alves *et al.*, 2019). Apesar de já conhecidos estes acessos em *C. arabica* que possuem fontes de resistência à *M. paranaensis* (Fatobene *et al.*, 2018; Salgado *et al.*, 2014; Boisseau *et al.*, 2009; Anzueto *et al.*, 2001), pouco se sabe sobre o que ocorre durante a interação dessas plantas com o nematoide.

A resistência consiste na habilidade da planta em suprimir o desenvolvimento ou a reprodução do nematoide como resultado da expressão de genes hospedeiros específicos. De acordo com as reações da resistência, esta pode ser pré-infectiva, ocorrendo independente da infecção, ou pós-infectiva, ocorrendo em resposta à infecção pelo nematoide. Geralmente, os

nematoides penetram as raízes das plantas hospedeiras, mas não induzem formação de um sítio de alimentação funcional capaz de suportar o desenvolvimento de uma fêmea reprodutiva (Williamson & Kumar, 2006).

As plantas respondem a presença do patógeno por meio da produção e alteração dos metabólitos em suas células (Kushalappa & Gunnaiah, 2013). Plantas contendo genes R de resistência aos nematoides das galhas induzem respostas de defesa como acúmulo de compostos fenólicos e reações de HR (hipersensibilidade), que são respostas de resistência envolvendo morte celular rápida e localizada dos tecidos invadidos. Como consequência da HR, ocorre a produção de vários compostos que podem estar envolvidos na defesa das plantas como espécies ativas de oxigênio (EAO's), ácido jasmônico, óxido nítrico, compostos fenólicos, fitormônios (Pegard *et al.*, 2005; Melillo *et al.*, 2006; Ahlfors *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2009; Yonn *et al.*, 2009). Por outro lado, as respostas de defesa das plantas podem ser expressas de maneira constitutiva, ou seja, compostos relacionados à defesa já estão presentes antes de ocorrer penetração nas raízes (Karban, 2011). Neste contexto a análise total dos metabólitos encontrados nas plantas podem indicar outros aspectos da resistência. Para esses estudos, inclui-se a metabolômica.

Metabolômica é uma ferramenta de análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos presentes em um organismo sob determinada condição. A análise dos metabólitos pode revelar o status bioquímico de um organismo em determinado momento e pode ser usado para monitorar a expressão gênica durante a interação planta-patógeno (Fiehn *et al.*, 2000). Esta ferramenta pode ser útil para os programas de melhoramento de plantas na identificação dos compostos responsáveis pela resistência das plantas a pragas e doenças. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar metabólitos

relacionados à resistência do genótipo 16-6-1 de *C. arabica* a *M. paranaensis* por meio de análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H).

Material e métodos

Nematoide

Raízes de cafeeiro parasitadas por *Meloidogyne paranaensis* foram coletadas no município de Piumhi, estado de Minas Gerais, Brasil. A confirmação da espécie foi feita utilizando o fenótipo de esterase (Carneiro & Almeida, 2001). A população de *M. paranaensis* foi multiplicada em cafeeiros cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Após 4 meses, os ovos foram extraídos das raízes infectadas usando uma solução de NaOCl 0,5% (Hussey & Barker, 1973), com maceração por 30 s em um liquidificador de cozinha. Para a obtenção de juvenis de segundo estágio (J2), os ovos foram colocados em funil de Barmann. Os juvenis coletados nas primeiras 24h foram descartados. Os juvenis eclodidos após 48h e 72h foram coletados e armazenados a 4°C por um período máximo de 4 dias até serem utilizados.

Mudas de café

Sementes do genótipo resistente 16-6-1 e da cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 foram obtidas do Banco de Germoplasma do programa de melhoramento de café da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). O genótipo 16-6-1 resistente à *M. paranaensis* é derivado do germoplasma silvestre Amphillo de *C. arabica* (Catuaí Vermelho x Amphillo MR2-161 MG 0179 pl1R1). O controle suscetível utilizado foi o Catuaí Vermelho IAC 144. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia autoclavada. Plântulas foram transplantadas para copos plásticos de 300 mL contendo areia esterilizada e foram mantidas em casa de vegetação (25-30°C). As mudas foram fertilizadas

com adubo de liberação lenta (N-P-K) e periodicamente fertilizadas com adubo foliar (N-P-K + micronutrientes).

Inoculação das plantas de café

Mudas da cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 e do genótipo resistente 16-6-1, com aproximadamente 6 meses de idade, foram inoculadas com 2500 J₂ de *M. paranaensis*. Folhas de três plantas foram cuidadosamente retiradas para avaliação aos 0, 2, 4, 8, 14, 22 e 32 dias após a inoculação (DAI). As folhas foram liofilizadas, moídas, pesadas e armazenadas a -15°C.

Preparo dos extratos

Para a obtenção dos extratos 50 mg das folhas foram submetidas à extração com uma combinação de 0,75 mL de solução tampão de KH₂PO₄ em D₂O (pH 6), contendo 0,01 % (m/v) do TSP-*d*₄ como referência interna e 0,75 mL de metanol-*d*₄ (Kim *et al.*, 2010). Após a combinação dos solventes as amostras foram agitadas por 1 minuto em vortex, colocadas em banho de ultrassom por 20 min e centrifugadas a 17000 rpm. Logo depois, 800 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de ressonância magnética nuclear (RMN) com diâmetro de 5 mm.

Análise por RMN de ¹H

Todos os extratos foram analisados por RMN de ¹H utilizando uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI-“Broadband Inverse”) de 5 mm. Para realização dos experimentos foram usados os parâmetros descritos por Kim *et al.* (2010) com algumas adaptações. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos a 300 K com janela espectral de 16 ppm, número

de pontos 32k, com pré-saturação do sinal de HDO, 128 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2,6 s e 1,5 s, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgcpr. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa TopSpin 3.2 e, por fim, os espectros foram calibrados pelo sinal do TSP- d_4 em 0 ppm.

Análise multivariada

Para análise multivariada, os espectros de RMN de ^1H foram processados com o programa Amix® (Bruker) e neste mesmo *software* fez-se o alinhamento do sinal pelo método conhecidos como “bins” ou “buckets”, em que o espectro é dividido em pequenos intervalos de deslocamentos químicos (0,04 ppm). Em seguida, os espectros foram convertidos automaticamente para arquivos ASCII. A partir destes arquivos foi construída uma matriz com deslocamento químico versus intensidade. Em seguida, uma matriz de classe discreta (neste caso, 0 para o suscetível e 1 para o grupo resistente) foi inserida a matriz obtida com os dados dos espectros. A matriz resultante foi submetida à análise de projeções de estruturas latentes por mínimos quadrados parciais (PLS, Partial Least Squares) utilizando o software Pirouette 3.11 (Infometrix). Todos os dados foram centrados na média e as regiões de δ 4,8 a δ 4,9 e δ 3,28 a δ 3,40 foram excluídas da análise devido ao sinal residual de água e MeOH, respectivamente.

Resultados

Em escores VL1 (Fig. 1a), ocorreu forte tendência na separação dos metabólitos do genótipo resistente 16-6-1 e da cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144. Foi observada a

formação de dois grupos. Esses grupos foram separados ao longo de VL1, com os metabólitos do genótipo resistente 16-6-1 dispostos em escores positivos e os metabólitos da cultivar suscetível Catuai Vermelho IAC 144 em escores negativos.

O gráfico de pesos (Fig. 1b) mostra as variáveis de maior relevância para a separação dos metabólitos dos genótipos, observada na Figura 1a. Os escores positivos de VL1, região onde foram agrupados os metabólitos do genótipo 16-6-1 foram influenciados pelos sinais de hidrogênios na região de δ 0,80-3,00, que podem ser relacionado à presença de aminoácidos. Também houve influência de sinais de hidrogênios na região entre δ 3,00-5,50, relacionado à presença de carboidratos. Os sinais da região dos carboidratos foram atribuídos aos hidrogênios da sacarose (Tabela 1). Os escores negativos de VL1, região onde foram agrupados os metabólitos da cultivar Catuai Vermelho foram influenciados de forma preponderante pelos sinais de hidrogênios na região de aromáticos (δ 5,50-10) e carboidratos (δ 3,00-5,50). Na região dos carboidratos foi possível identificar a glicose (Tabela 1).

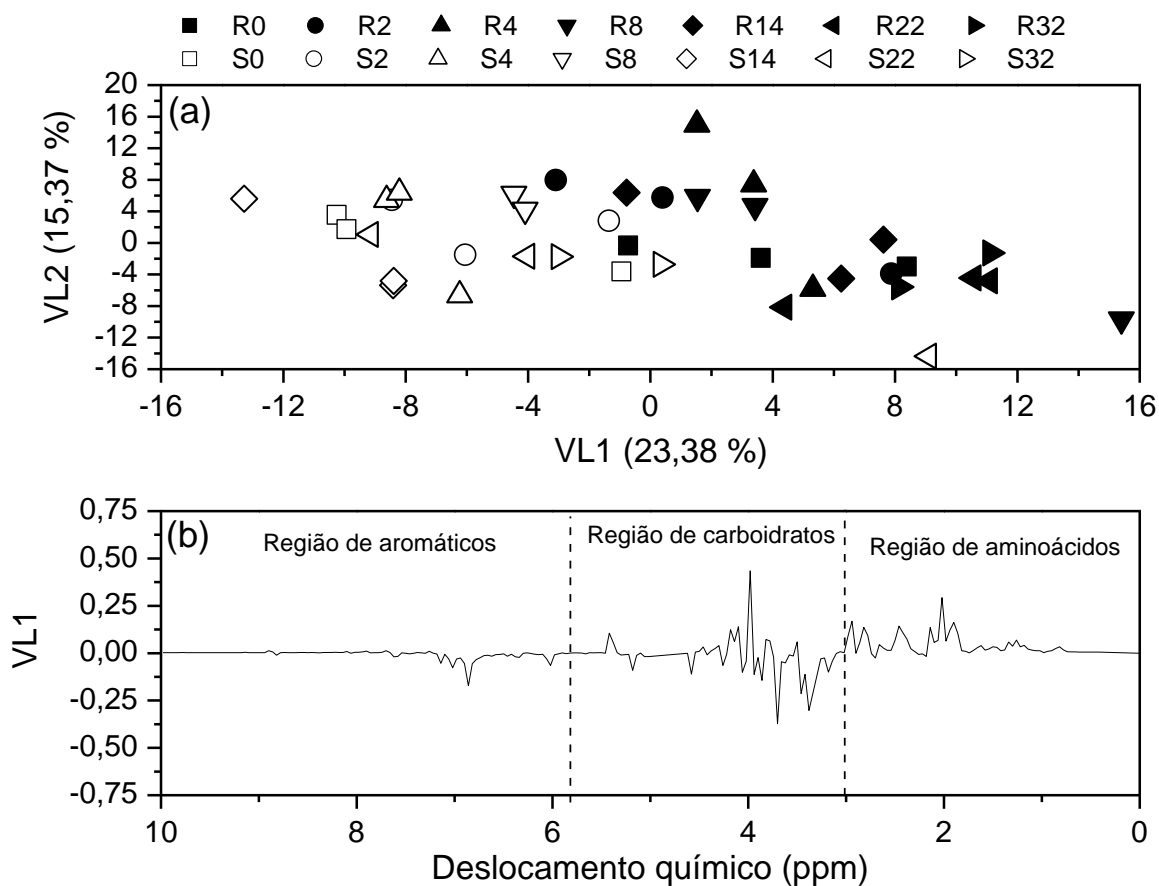


Fig. 1 – (a) Escores da análise de componentes principais (VL1 versus VL2) dos espectros de RMN de ^1H das folhas de café do genótipo resistente 16-6-1 e da cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 à *Meloidogyne paranaensis*. “R” corresponde a planta resistente e “S” a planta suscetível. O primeiro número após “R” ou “S” corresponde aos dias após a inoculação (DAI) da planta com 2500 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. paranaensis*. (b) Gráfico de peso obtido a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de café do genótipo 16-6-1 e da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144.

Tabela 1 - Metabólitos identificados nos extratos das folhas do genótipo 16-6-1 e da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144.

Substâncias	Deslocamento químico (δ); multiplicidade; [constante de acoplamento escalar (J/Hz)]
Alanina	1,48; d; [7,2]
Treonina	1,32; d; [6,6]
Ácido málico	4,34; dd, [6,5 e 4,7]; 2,74; dd; [16,6 e 4,7]; 2,68 [16,6 e 6,6]
Colina	3,24; s
Sacarose	5,40; d; [3,8]; 4,17; d; [8,5]
Glicose	5,18; d; [3,8]
Ácido clorogênico	6,36; d [16,0]; 6,87; d; [8,3]; 7,05; dd; [8,3, 1,9]; 7,13; d; [2,0]; 7,58; d; [15,9]
Cafeína	7,92; s
Trigonelina	9,14; s; 8,87; m

Foram identificados nove metabólitos nas folhas de café do genótipo 16-6-1 (resistente) e da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 (suscetível): alanina, treonina, ácido málico, colina, sacarose, glicose, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina (Tabela 1). Dos nove metabólitos identificados, seis foram quantificados nas folhas das plantas de ambas as plantas de café, resistente e suscetível: sacarose, α -glicose e β - glicose, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina (Fig. 2). Dentre os metabólitos quantificados, todos foram encontrados no genótipo 16-6-1 e na cultivar Catuai Vermelho antes da inoculação do nematoide aos 0 DAI. Porém, aos 2 DAI houve diferença na concentração apenas para o metabólito α -glicose, que foi inferior no resistente 16-6-1 quando comparado a cultivar suscetível. Entretanto, a

concentração de α -glicose aumentou aos 2 DAI no genótipo resistente, igualando-se a concentração encontrada na cultivar suscetível Catuai Vermelho. A concentração de sacarose foi superior no genótipo resistente 16-6-1 aos 8 e 14 DAI quando comparada a concentração na cultivar suscetível Catuai Vermelho. Aos 14 DAI a concentração de trigonelina foi inferior no genótipo 16-6-1. Não houve diferença dos metabólitos cafeína, ácido clorogênico e β -glicose entre o genótipo 16-6-1 e a cultivar Catuai Vermelho IAC 144 (Fig. 2).

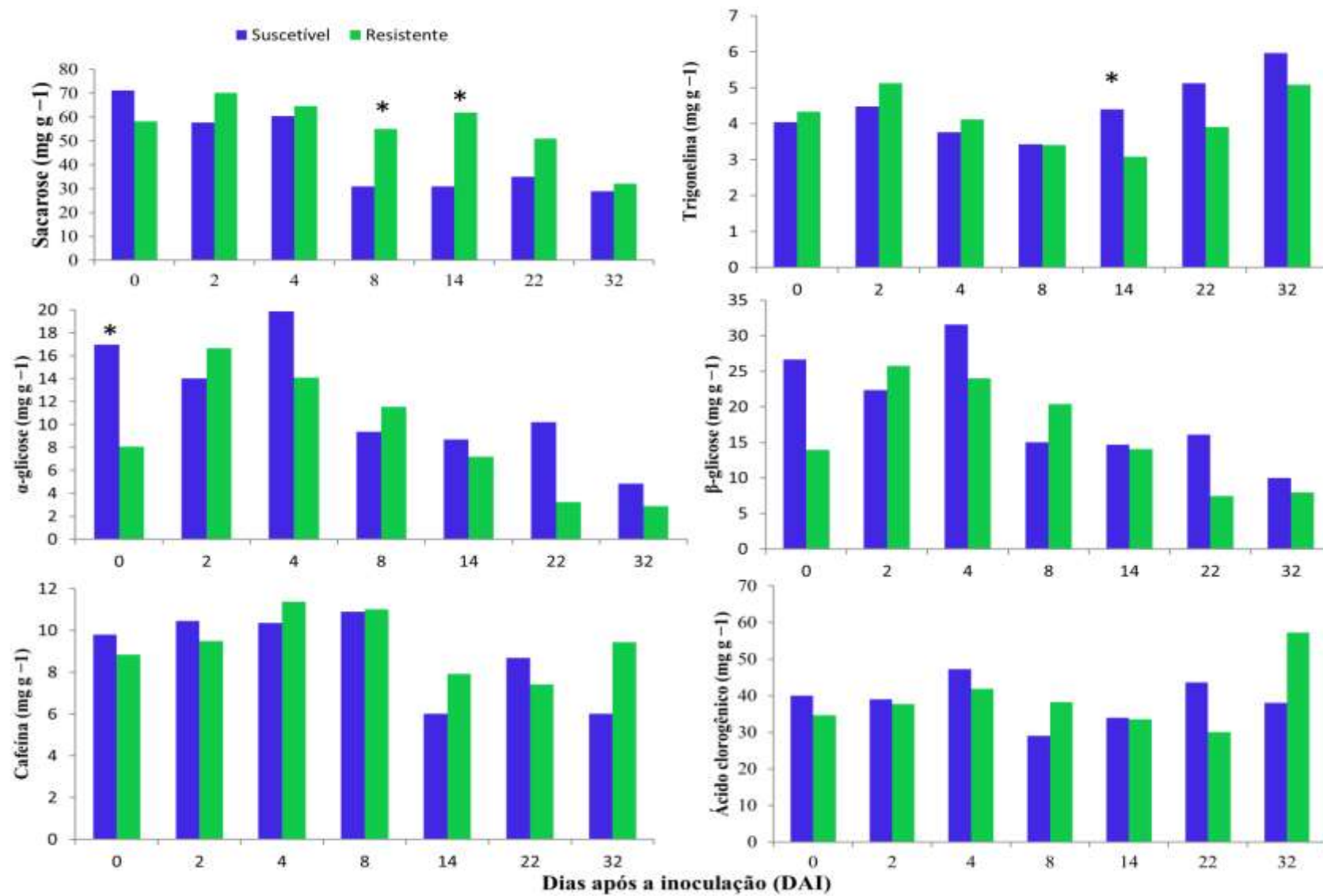


Fig. 2 - Metabólitos identificados e quantificados por análise de por RMN de ^1H , em folhas do genótipo resistente 16-6-1 e da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 suscetível à *Meloidogyne paranaensis*. As análises foram realizadas aos 0, 2, 4, 8, 14, 22 e 32 dias após a inoculação (DAI) das plantas com 2500 juvenis de segundo estágio (J2). (*) Diferença significativa entre os metabólitos de 16-6-1 e Catuaí Vermelho ($P < 0,5$) de acordo com o teste *t*.

Discussão

O genótipo 16-6-1, avaliado neste estudo, representa a geração F6 do cruzamento entre Catuaí Vermelho e Amphillo MR 2-161 (Salgado *et al.*, 2014). Amphillo é um germoplasma de *Coffea arabica* proveniente da região de Amphillo na Etiópia introduzido no Brasil em 1953 e registrado como 'IAC 1167-19'. A planta Amphillo MR 2-161, da geração S3 de 'IAC 1167-19', foi selecionada como resistente a *M. incognita* em condições de campo e estufa nos anos 70 (Fazuoli, 1986). Desde então, as programas de melhoramento de *C. arabica* no Brasil têm estudado esse germoplasma como fonte de resistência a nematoides.

No presente trabalho, o estudo de metabólitos por meio de análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) associado a uma análise multivariada dos dados permitiu encontrar diferenças metabólicas entre o genótipo resistente 16-6-1 e a cultivar suscetível Catuaí Vermelho IAC 144 quando parasitados por *Meloidogyne paranaensis*. Os resultados da análise de componentes principais indicam que houve uma tendência na separação desses metabólitos formando dois grupos. Os metabólitos do genótipo resistente agruparam principalmente na região dos carboidratos e aminoácidos. Já os metabólitos da cultivar suscetível foram agrupados na região dos aromáticos e carboidratos. Depois, alguns

desses metabólitos foram quantificados, sendo as principais diferenças encontradas na concentração de sacarose e trigonelina.

Carboidratos são compostos que podem atuar na regulação de genes envolvidos com mecanismos de defesa das plantas (Sadka *et al.*, 1994). A sacarose que foi o carboidrato identificado em maior quantidade na planta resistente pode estar envolvida no mecanismo de defesa de *Amphillo* à *M. paranaensis*. Maiores concentrações de sacarose foram observadas aos 8 e 14 DAI no genótipo 16-6-1. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Machado *et al.* (2012) que observaram maiores concentrações de sacarose em raízes de cafeeiros resistentes a *M. exigua* 24 horas após a inoculação das plantas com esse nematoide. Testes *in vitro* e *in vivo* indicam atividade da sacarose contra *Meloidogyne* spp. (Santiago *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007). Segundo Roitsch *et al.* (2003), glicose e sacarose induziram aumento nas enzimas relacionadas a resistência das plantas fenilalanina amônia-liase (PAL) e invertases de parede celular em tomateiros. Outros trabalhos também relataram a ação de carboidratos na indução de genes de defesa nas plantas (Herbers *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Salzman *et al.*, 1998). O aumento de concentração da sacarose possivelmente atua bloqueando a ação de citocinas (Ikeda *et al.*, 1999), substâncias que estão envolvidas na formação e manutenção dos sítios de alimentação (Lohar *et al.*, 2004).

A glicose foi outro carboidrato quantificado, porém houve diferença entre o genótipo 16-6-1 e a cultivar Catuai Vermelho apenas para a α -glicose. Aos 0 DAI, antes da inoculação das plantas com o nematoide, a concentração de α -glicose era inferior no genótipo 16-6-1. Porém, a partir dos 2 DAI houve aumento desse metabólito no genótipo resistente 16-6-1, igualando-se a concentração encontrada no genótipo suscetível, o que indica que este metabólito pode estar envolvido com respostas rápidas de resistência.

A trigonelina é um alcaloide encontrado em várias espécies de plantas. Esse composto está associado a respostas de defesa de plantas contra patógenos e tal resposta é associada à hipometilação do DNA (Kraska & Schönbeck 1993). A trigonelina possui atividade contra nematoides através da sua ação contra a enzima acetilcolinesterase, que atua na terminação dos impulsos nervosos. Essa enzima é alvo de vários nematicidas comerciais (Satheeshkumar *et al.*, 2010). Entretanto, nesse trabalho, houve aumento na concentração de trigonelina aos 14 DAI no genótipo suscetível. Esse aumento pode ser uma resposta tardia na tentativa de cessar o desenvolvimento dos nematoides. Resultados diferentes foram encontrados em extratos de raízes de café resistente a *M. exigua*, onde a concentração de trigonelina foi superior as 0 e 24 horas após a inoculação. Porém após 48 horas, a concentração de trigonelina na cultivar suscetível Catuai Vermelho se igualou a concentração encontrada na cultivar resistente IAPAR-59 (Machado *et al.*, 2012).

Os mecanismos de resistência podem atuar antes ou após a infecção da planta pelo nematoide (Anwar & McKenry, 2000; Bendezu & Starr, 2003). Os mecanismos de resistência pré-infecção estão relacionados à presença de metabólitos que podem impedir a penetração do nematoide (Bendezu & Starr, 2003). Nesse trabalho, os metabólitos envolvidos nas respostas de defesa de *C. arabica* ao nematoide estão presentes em ambas as plantas resistente e suscetível antes da penetração de *M. paranaensis*, aos 0 DAI. Esse fato indica que os metabólitos estão presentes de forma constitutiva nas plantas de café. O genótipo resistente 16-6-1 e a cultivar suscetível Catuai Vermelho IAC 144 foram estudados por Alves *et al.* (2019) e os autores concluíram que respostas de defesa iniciais, que envolvem mecanismos do tipo pré-infecção, atuam no genótipo 16-6-1 fazendo com que ocorra redução e atraso da penetração de *M. paranaensis* nas raízes. Na resistência pós-infecção, pode ocorrer formação de novos metabólitos ou aumento dos metabólitos já presentes após a penetração dos

nematoides nas raízes das plantas hospedeiras. Nesse caso, alterações metabólicas podem influenciar a formação de um sítio de alimentação pelos nematoides e desenvolvimento de fêmea reprodutiva (Bell, 1981; Anwar & McKenry, 2000). As maiores concentrações de sacarose no genótipo 16-6-1 aos 8 e 14 DAI, indicam que as respostas de defesa tardias estão ocorrendo para impedir o estabelecimento e formação do sítio de alimentação. Estudos anteriores com o genótipo 16-6-1 e cultivar Catuai Vermelho IAC 144 indicam que respostas de defesa atuam antes dos 14 DAI no genótipo resistente 16-6-1, pois ocorre início de degradação de células gigantes (Alves *et al.*, 2019). Deste modo, é possível afirmar que os mecanismos de defesa pré e pós-infecção atuam na resistência do genótipo 16-6-1 a *M. paranaensis*.

O aumento de compostos fenólicos tem sido associado com a resistência de plantas a vários nematoides (Chitwood, 2002). Ácido clorogênico foi identificado como o principal composto fenólico presente em plantas resistentes e pode ser responsável por atrasar o desenvolvimento dos nematoides (Pegard *et al.*, 2005). Esse metabólito foi identificado em maior quantidade em tomateiros resistentes parasitados por *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus penetrans* (Huang & Rhode, 1973). O ácido clorogênico também está associado à resistência a herbivoria, sendo associado à resistência de crisântemo ao trips *Frankliniella occidentalis* (Leiss *et al.*, 2009). Entretanto, nesse estudo, não houve diferença significativa de ácido clorogênico entre o genótipo 16-6-1 e a cultivar Catuai Vermelho IAC 144, indicando que o metabólito não está relacionado às respostas de resistência desse genótipo. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com o cafeeiro IAPAR-59 resistente à *M. exigua* (Machado *et al.*, 2012).

A cafeína é um metabólito secundário do grupo dos alcalóides que também pode estar relacionado com respostas de defesa da planta a patógenos e herbívoros (Ashihara & Crozier,

2001). Em folhas de café infectadas por *Hemileia vastatrix*, houve maior concentração no teor de cafeína em plantas resistentes quando comparadas as plantas suscetíveis (Medeiros *et al.*, 1990). Neste trabalho, não houve diferença na concentração de cafeína nas folhas da planta resistente e suscetível.

Esses resultados fornecem evidências de que ocorrem diferenças na concentração de metabólitos entre o genótipo resistente e a cultivar suscetível de *Coffea arabica*. A principal diferença encontrada foi na concentração de sacarose que ocorreu aos 8 e 14 DAI. Estes resultados corroboram o trabalho anterior de Alves *et al.* (2019) e dá suporte para trabalhos adicionais que podem ser utilizados em programas de melhoramento de plantas na identificação dos compostos responsáveis pela resistência das plantas a pragas e doenças.

Referências

- Ahlfors, R., Brosché, M., Kollist, H. & Kangasjärvi, J. (2009). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 58, 1-12. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03756.x
- Alves, P. S., Fatobene, B. J. D. R., Sônia, M. D. L., Gomes, A. C., Campos, V. P., Carneiro, R. M. & de Souza, J. T. (2019). Early and late responses characterise the resistance derived from Ethiopian wild germplasm ‘Amphillo’ of *Coffea arabica* to *Meloidogyne paranaensis*. *Nematology* 21, 1-12. DOI: 10.1163/15685411-00003254
- Anwar, S.A. & McKenry, M.V. (2002). Penetration and development of *Meloidogyne arenaria* on two new grape rootstocks. *Journal of Nematology* 34, 143-145.

Anzueto, F., Bertrand, B., Sarah, J.L., Eskes, A.B. & Decazy, B. (2001). Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica* 118, 1-8.

Ashihara, H. & Crozier, A. (2001). Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science* 6, 407-413. DOI: 10.1016/S1360-1385(01)02055-6

Bell, A. A. (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 32, 21-81.

Bendezu, I.F. & Starr, J.L. (2003). Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of Nematology* 35, 115-118.

Bertrand, B. & Anthony, F. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and breeding. In: SOUZA, R. M. (Ed). *Plant-parasitic Nematodes of Coffee*. Dordrecht: Springer, 2008, p. 165-190.

Boisseau, M., Aribi, J., Sousa, F.R.D., Carneiro, R.M.D.G. & Anthony, F. (2009). Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology* 34, 38-41. DOI: 10.1590/S1982-56762009000100006

Campos, V.P. & Villain, L. (2005). Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R. & Bridge, J. (Eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 529–579.

Carneiro, R.M.D.G. & Almeida, M.R.A. (2001). Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25, 35-44.

Carneiro, R.M.D.G. & Cofcewicz, E.T. (2008). Taxonomy of coffee-Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: *Plant-parasitic nematodes of coffee*. Berlin, Germany, Springer, pp. 87-122.

Carneiro, R.M.D.G., Carneiro, R.G., Abrantes, M.O., Santos, M.S.N.A. & Almeida, M.R. (1996). *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28, 177–89.

Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40, 221-249. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045

Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E. & Roitsch, T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell* 9, 1825-1841. DOI: 10.1105/tpc.9.10.1825

Fatobene, B.J.R., Terra, W.C., Ferreira, F.R.C., Alves, P.S. & Salgado, S.M.L. (2018). Comportamento diferenciado de progênies de *Coffea arabica* germoplasma Anfilo

a *Meloidogyne paranaensis* e *M. exigua*. 44 Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Franca SP, Brazil. [Abstr.]

Fazuoli, L.C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: Rena, A.B., Malavolta, E., Rocha, N., Yamada, J. (Eds). *Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro*. Piracicaba, Brazil, Potafós, 1986. pp. 87-113.

Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N. & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18, 1157-1161.

Gutierrez, O. A., Wubben, M. J., Howard, M., Roberts, B., Hanlon, E. & Wilkinson, J. R. (2009). The role of phytohormones ethylene and auxin in plant-nematode interactions. *Russian Journal of Plant Physiology* 56, 1-5.

Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P. & Sonnewald, U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8, 793-803. DOI: 10.1105/tpc.8.5.793

Huang, C., & Rohde, R.A. (1973). Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5, 253-258.

Hussey, R.S. & Barker, K.R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-1028.

Ikeda, Y., Koizumi, N., Kusano, T. & Sano, H. (1999). Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from wheat. *Plant Physiology* 121, 813-820. DOI: 10.1104/pp.121.3.813

Ito, D. S., Sera, G. H., Sera, T., Santiago, D. C., Kanayama, F. S. & Del Grossi, L. (2008). Progenies of coffee with resistance to nematodes *Meloidogyne paranaensis* and *Meloidogyne incognita* race 2. *Coffee Science* 3, 156-163. DOI: 10.25186/cs.v3i2.87

Karban, R. (2011). The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology* 25, 339-347. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2010.01789.x

Kim, H. K., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* 5, 536. DOI: 10.1038/nprot.2009.237

Kraska, T. & Schönbeck, F. (1993). About changes in the chromatin structure after resistance induction in *Hordeum vulgare* L. *Journal of Phytopathology* 137, 10-14. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1993.tb01320.x

Kushalappa, A. C. & Gunnaiah, R. (2013). Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends in Plant Science* 18, 522-531. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.05.002

Leiss, K. A., Maltese, F., Choi, Y. H., Verpoorte, R. & Klinkhamer, P. G. (2009). Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. *Plant Physiology* 150, 1567-1575. DOI: 10.1104/pp.109.138131

Lohar, D. P., Schaff, J. E., Laskey, J. G., Kieber, J. J., Bilyeu, K. D. & Bird, D. M. (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and rhizobial symbioses. *The Plant Journal* 38, 203-214. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02038.x

Lopez-Lima, D., Sánchez-Nava, P., Carrion, G., Espinosa de los Monteros, A. & Villain, L. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 141, 623-629. DOI 10.1007/s10658-014-0564-9

Machado, A. R. T., Campos, V. A. C., da Silva, W. J. R., Campos, V. P., de Mattos Zeri, A. C., & Oliveira, D. F. (2012). Metabolic profiling in the roots of coffee plants exposed to the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. *European Journal of Plant Pathology*, 134(2), 431-441. DOI: 10.1007/s10658-012-0008-3

Medeiros, M. A. P. X. L., Guedes, M. E. M. & Barros e Sousa, M. L. (1990). Has caffeine a role in the resistance of coffee to the orange rust?. In *13th International scientific colloquium on coffee, Paipa (Colombia) 21-25 August 1989*. (pp. 733-744). Association Scientifique Internationale du Café.

Melillo, M. T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P. & Bleve-Zacheo, T. (2006). Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170, 501-512. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01724.x

Oliveira, D. F., Carvalho, H. D., Nunes, A. S., Silva, G. H., Cavalheiro, A. J. & Campos, V. P. (2007). Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. *Nematologia Brasileira* 31, 202-209.

Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. & Djian-Caporalino, C. (2005). Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annum*. *Phytopathology* 95, 158–165. DOI: 10.1094/PHYTO-95-0158

Peres, A.C.J., Salgado, S.M.L., Correa, V.R., Santos, M.F.A., Mattos, V.S., Monteiro, J.M.S. & Carneiro, R.M.D.G. (2017). Resistance of *Coffea arabica* genotypes against *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita* under controlled and field conditions. *Nematology* 19, 617-626. DOI: 10.1163/15685411-00003075

Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54, 513-524. DOI: 10.1093/jxb/erg050

Sadka, A., DeWald, D. B., May, G. D., Park, W. D. & Mullet, J. E. (1994). Phosphate modulates transcription of soybean VspB and other sugar-inducible genes. *The Plant Cell* 6, 737-749. DOI:10.1105/tpc.6.5.737

Salgado, S.M.L., Rezende, J.C.D. & Nunes, J.A.R. (2014). Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14, 94-101. DOI:10.1590/1984-70332014v14n2a17

Salzman, R. A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* 117, 465-472. DOI: 10.1104/pp.117.2.465

Santiago, D. C., Homechin, M., Montalvan, R. & Krzyzanowski, A. A. (2005). Potential of sucrose and *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon mulch on the management of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 873-883. DOI: 10.1590/S1516-89132005000800003

Satheeshkumar, N., Mukherjee, P. K., Bhadra, S. & Saha, B. P. (2010). Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L. and its constituents. *Phytomedicine* 17, 292-295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.06.006>

Sera, G.H., Sera, T., Ito, D.S., Mata, J.S., Doi, D.S., Azevedo, J.A. & Ribeiro Filho, C. (2007). Progenies de *Coffea arabica* IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. *Bragantia* 66, 43-49. DOI: 10.1590/S0006-87052007000100006

Terra, W. C., Salgado, S. M. L., Fatobene, B. J. R. & Campos, V. P. (2019). Expanded geographic distribution of *Meloidogyne paranaensis* confirmed on coffee in Brazil. *Plant Disease* 103, 589-589. DOI: 10.1094/PDIS-09-18-1502-PDN

Williamson, V.M. & Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22, 396-403. DOI: 10.1016/j.tig.2006.05.003

Yoon, J., Chung, W. I. & Choi, D. (2009). NbHB1, *Nicotiana benthamiana* homeobox 1, is a jasmonic acid-dependent positive regulator of pathogen-induced plant cell death. *New Phytologist* 184, 71-84. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02967.x

**ARTIGO 3 - Proteína do choque térmico 90 é o provável alvo enzimático do fluopyram
em *Meloidogyne* spp.**

Autores

¹Paula Soares Alves, ²Denilson Ferreira de Oliveira, ¹Jorge Teodoro de Souza

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Nematologia, CP3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil

²Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais, CP3037, 37200-000 Lavras, MG, Brasil

Corresponding author: P. S. ALVES, paulaalvesagn.pa@gmail.com

**Artigo formatado de acordo com as normas da revista Nematology
(Versão preliminar)**

Resumo

O fluopyram, *N*- [2- [3-cloro-5- (trifluorometil) -2-piridinil] etil] -2- (trifluorometil) benzamida, atua contra fungos fitopatogênicos através da inibição da enzima succinato desidrogenase, no ciclo do ácido tricarboxílico, bloqueando o transporte de elétrons nas mitocôndrias. Acredita-se que o mecanismo de ação desta substância contra fitonematóides seja o mesmo, embora isto ainda não tenha sido cientificamente provado. O objetivo do trabalho foi identificar *in silico* o alvo enzimático do fluopyram em *Meloidogyne* spp. Utilizando o programa ACD ChemSketch, as estruturas do fluopyram foram desenhadas para serem submetidas a buscas conformacionais com o *software* Open3Dalign. Em seguida, utilizando o programa MOPAC, as conformações mais estáveis foram otimizadas. As conformações com menores energias foram submetidas a buscas farmacofóricas com o *software* Lisica, utilizando o banco de dados do Ligand Expo, para selecionar ligantes de proteínas depositadas no RCSB Protein Data Bank. As sequências das proteínas correspondentes aos ligantes selecionados foram submetidas à análise de Blastp para encontrar sequências similares em genomas de fitonematóides. Apenas a enzima 4I93 (proteína do choque térmico 90 – HSP90), selecionada na busca farmacofórica, possuía correspondente em nematoides fitoparasitas. Em seguida, utilizando o programa Autodock Vina, foi realizado um estudo da interação entre o fluopyram e as estruturas tridimensionais disponíveis da enzima HSP90: 2JJC, 2QG0, 2VCI, 4FCP, 4L93. Observou-se que as afinidades do fluopyram pelas enzimas eram similares às afinidades dos inibidores desta enzima. Logo, os resultados indicam que a enzima HSP90 é um alvo provável do fluopyram em *Meloidogyne* spp.

Palavras-chave: docking, nematoide-das-galhas, nematicida.

Os nematoides parasitas de plantas são responsáveis por grandes perdas na agricultura chegando a prejuízos de aproximadamente 80 bilhões de dólares (Nicol *et al.*, 2011). O gênero *Meloidogyne* é o mais importante entre os nematoides fitoparasitas, pois suas espécies estão amplamente distribuídas pelo mundo e parasitam várias culturas de interesse econômico e causam enormes prejuízos (Moens *et al.*, 2009). As espécies do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentárias e induzem a formação de sítios de alimentação, chamados de célula gigante, nas raízes da planta hospedeira. As células gigantes fornecem os nutrientes necessários para o desenvolvimento e reprodução dos nematoides. Esta modificação do sistema radicular do hospedeiro, leva à redução da absorção de nutrientes e água, resultando em plantas fracas e redução da produtividade (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias de manejo disponíveis para fitonematóides, o controle químico destaca-se como ferramenta importante devido a sua boa eficiência (Sikora *et al.*, 2005). Durante muitos anos, o controle de fitonematóides foi feito através do uso extensivo de nematicidas químicos, com destaque para o nematicida fumigante com ação biocida brometo de metila (Desaeger *et al.*, 2017). Entretanto, o uso do brometo de metila vem sendo restrito em vários países devido às suas propriedades que destroem a camada de ozônio (Watson *et al.*, 1992). Como alternativa ao uso dos nematicidas fumigantes, surgiram os nematicidas não-fumigantes a base de organofosforados e carbamatos. Entretanto, esses produtos possuem alta toxicidade a organismos não alvos, como seres humanos e mamíferos, e muitos produtos estão sendo banidos do mercado (Zasada *et al.*, 2010). Apesar de possuir desvantagens como custo elevado, alta toxicidade aos animais e ambiente, os nematicidas sintéticos ainda possuem importância para o manejo de fitonematóides, sendo utilizados de forma independente ou em programas de manejo integrado (Faske & Hurd, 2015). Devido à proibição ou restrição de muitos produtos químicos convencionais, existe a necessidade de

utilizar outras moléculas com ação nematicida para preencher esta lacuna no manejo dos nematoides.

O fluopyram, *N*- [2- [3-cloro-5- (trifluorometil) -2-piridinil] etil] -2- (trifluorometil) benzamida, é um fungicida de amplo espectro de ação desenvolvido pela Bayer Crop Science. Esse fungicida pertencente ao grupo piridiletilamida é um inibidor da enzima succinato desidrogenase (SDHI) que atua na respiração (Avenot & Michailides 2010; Proffer *et al.*, 2013). O complexo succinato desidrogenase (SDH), também conhecido como complexo II ou succinato-ubiquinona oxireductase, desempenha um papel crucial no ciclo tricarboxílico e na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A inibição da SDH leva ao bloqueio do acesso ao substrato, impedindo a oxidação de succinato a fumarato e a redução de ubiquinona a quinona. Isso leva à redução da produção de energia e atraso no crescimento de fungos (Sierotzki & Scalliet, 2013). Até o momento, resistência de fungos fitopatogênicos aos fungicidas SDHIs está associada a mutações nos genes *SdhB*, *SdhC* e / ou *SdhD* das subunidades da enzima succinato desidrogenase (Scalliet *et al.*, 2012; Veloukas *et al.*, 2013; Popko *et al.*, 2018).

As propriedades nematicidas do fluopyram foram avaliadas em alguns trabalhos para nematoides parasitas de plantas (Faske & Hurd, 2015; Oka & Saroya, 2018), Segundo Faske & Hurd (2015), o fluopyram é um fungicida não-seletivo e possui efeito nematostático sobre *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchus reniformis*. Burns *et al.* (2015) estudaram o efeito de fluopyram no nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, e concluíram que mutantes de *C. elegans* resistentes aos fungicidas inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) eram resistentes ao fluopyram. Estes resultados sugerem que a enzima succinato desidrogenase é o alvo provável do fluopyram em *C. elegans*. Entretanto, não há estudos que comprovem que o fluopyram atue sobre a enzima succinato desidrogenase de fitonematóides. Portanto, o

objetivo do trabalho foi identificar *in silico* o alvo enzimático do fluopyram em *Meloidogyne* spp.

Material e métodos

Busca conformacional

Utilizando o software ACD ChemSketch 14.00 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada), foram obtidas as estruturas tridimensionais do fluopyram e alguns de seus produtos de degradação na água e solo: **A**) *N*-[2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]ethyl]-2-(trifluoromethyl)benzamide, **B**) *N*-{2-[3-chloro-1-oxido-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]ethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **C**) (S)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **D**) (R)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **E**) (S)-1-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-({[2-(trifluoromethyl)phenyl]-carbonyl}amino)ethyl hydrogen sulfate, **F**) (R)-1-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-({[2-(trifluoromethyl)phenyl]-carbonyl}amino)ethyl hydrogen sulfate, **G**) (S)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-1-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **H**) (S)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-1-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide (Fig. 1). As estruturas tridimensionais obtidas pelo software ACD ChemSketch foram salvas como arquivos mol, em seguida, os arquivos foram convertidos para o formato sdf com o OpenBabel 2.3.2 (O'Boyle *et al.*, 2011). Todas as estruturas foram submetidas a buscas conformacionais utilizando o *software* Open3Dalign 2.282 (Tosco *et al.*, 2011). Cada busca foi feita com um total de 1000 simulações de dinâmica molecular com 1000 etapas 1 fs em cada simulação. Os cálculos foram realizados utilizando o Merck Molecular Force Field 94 (MMFF94) e a água considerada implicitamente pelo emprego do modelo GBSA (Generalized Born Surface Area). Este programa fornece os valores de energias em Kcal/mol

de cada conformação possível da molécula e faz um ranqueamento do menor para o maior valor de energia. Em seguida, as conformações mais estáveis obtidas pelo Open3Dalign foram otimizadas com o software Mopac2016 (18.184L) (Stewart, 2012) utilizando o método ‘Hamiltonian PM7’. A água foi implicitamente considerada através do modelo ‘conductor-like’ (COSMO). O mopac fornece os valores de energia de cada conformação da molécula na unidade eletron-volt (eV). As conformações foram selecionadas para a próxima etapa com base nos cálculos de distribuição de Boltzmann.

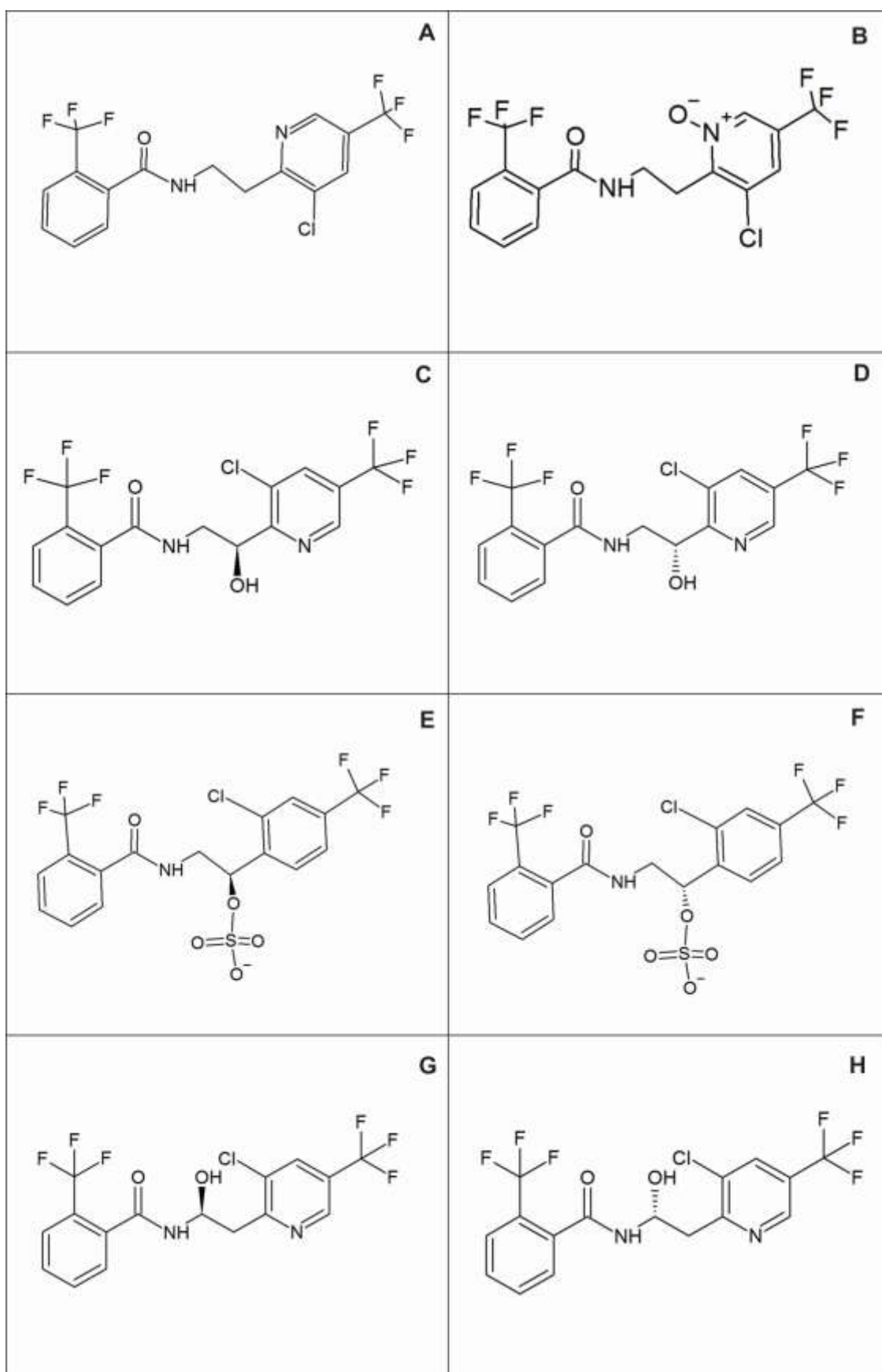


Fig. 1. Estruturas químicas do fluopyram e alguns de seus produtos de degradação em solo e água desenhadas com o programa ChemSketch. **A)** *N*-[2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]ethyl]-2-(trifluoromethyl)benzamide, **B)** *N*-{2-[3-chloro-1-oxido-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]ethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **C)** (*S*)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **D)** (*R*)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **E)** (*S*)-1-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-([2-(trifluoromethyl)phenyl]-carbonyl)amino)ethyl hydrogen sulfate, **F)** (*R*)-1-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-2-([2-(trifluoromethyl)phenyl]-carbonyl)amino)ethyl hydrogen sulfate, **G)** (*S*)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-1-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide, **H)** (*S*)-*N*-{2-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]-1-hydroxyethyl}-2-(trifluoromethyl)benzamide.

Busca Farmacofórica

As conformações mais estáveis de cada estrutura foram submetidas à busca por ligantes similares em enzimas. Para isto, foi utilizado o banco de dados do LigandExpo (<http://ligand-expo.rcsb.org/>) (Feng *et al.*, 2004) obtida do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) (Berman *et al.*, 2000). O programa utilizado na busca farmacofórica foi o Lisica 1.0.1 (Lešnik *et al.*, 2015). Somente enzimas com escore de Tanimoto $\geq 0,4$ (Peón *et al.*, 2017) foram selecionadas. Depois disso, as sequências das proteínas iguais foram baixadas em formato FASTA no site RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) e alinhadas usando o programa Ugene 1.24.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012) e o algoritmo Clustal Omega 1.2.1 com 10 interações (Sievers *et al.*, 2011). Somente uma sequência de aminoácidos de cada proteína foi mantida quando as proteínas eram 100% similares e foram utilizadas na próxima etapa.

Busca por sequências de aminoácidos nos genomas do Filo Nematoda e gênero *Meloidogyne*

As sequências de aminoácidos das enzimas selecionadas através da busca farmacofórica foram baixadas a partir do RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) para serem usadas em pesquisas para encontrar sequências similares nos genomas do Filo Nematoda e de espécies do gênero *Meloidogyne* através do banco de dados do NCBI National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). O programa Blastp (2.9.0+) (Altschul *et al.*, 1997), foi utilizado com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST). Essa pesquisa foi realizada em todos os bancos de dados não redundantes (nr). Quando não houve similaridade entre os aminoácidos das proteínas selecionadas na busca farmacofórica e os aminoácidos das espécies de *Meloidogyne*, foi realizada uma busca tBlastn (2.9.0+) em todos os bancos de dados não redundantes (nr), em que a busca com aminoácidos retorna resultados com as sequências de nucleotídeos similares.

Seleção da enzima

As sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais da enzima selecionada proteína do choque térmico 90 com seus respectivos ligantes foram baixadas no RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>). As sequências de aminoácidos das proteínas baixadas foram comparadas utilizando o programa Ugene 1.24.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012) e o algoritmo Clustal Omega 1.2.1 com 10 interações (Sievers *et al.*, 2011). Todas as enzimas homodiméricas e com similaridade $\geq 97\%$ quando comparadas à proteína do choque térmico 90 4L93 (código RCSB) foram selecionadas. Enzimas que possuíam metais em seu sítio ativo ou mutações na sequência de aminoácidos foram descartadas. As estruturas tridimensionais das enzimas selecionadas foram observadas com o programa VMD 1.9.2 (Humphrey *et al.*,

1996) que permite verificar se faltam resíduos de aminoácidos no sítio ativo da enzima ou próximo a ele. Enzimas com resíduos faltantes nestes locais também foram eliminadas. Todos os arquivos foram convertidos em arquivos pdb contendo as unidades biológicas utilizando o script Python MakeMultimer.py (<http://watcut.uwaterloo.ca/tools/makemultimer/>) que foram então alinhados a enzima 4L93 usando o software Lovovalign 1.1.0 (Martínez *et al.*, 2007). Depois disso, para saber se o ligante de uma determinada enzima estava no mesmo sítio ativo do ligante S36 (3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl[2,4-dihydroxy-5-(propan-2-yl)phenyl]methanone), da enzima 4L93, ambas as estruturas foram visualizadas com o programa Chimera 1.13.1 (Pettersen *et al.*, 2004). Enzimas cujos ligantes não estavam no mesmo sítio ativo do ligante S36 foram eliminadas.

Docking

As estruturas químicas tridimensionais de *N*-[(2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)methyl]-3-[[*(e)*-(2-oxodihydrofuran-3(2h)-ylidene)methyl]amino]benzenesulfonamide (**A94**), 5-[2,4-dihydroxy-5-(1-methylethyl)phenyl]-*n*-ethyl-4-[4-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]isoxazole-3-carboxamide (**2GJ**) e 3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl[2,4-dihydroxy-5-(propan-2-yl)phenyl]methanone (**S36**), inibidores da proteína selecionada na busca farmacofórica foram obtidas utilizando o software ACD/ChemSketch 14.00 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada) (Fig. 2). Depois de obtidas as estruturas tridimensionais, elas foram submetidas a buscas conformacionais e otimização das estruturas como mencionado acima. A conformação mais estável de cada ligante foi selecionada de acordo com os cálculos da Distribuição de Boltzmann. As conformações mais estáveis dos ligantes e do fluopyram no formato PBD foram convertidos para o formato PDBQT utilizando o software Autodock Tools 1.5.7 rc1 (Trott & Olson, 2010). Ainda com o auxílio do Autodock Tools 1.5.7 rc1, foi definida a região de ancoramento do fluopyram e dos

ligantes nas cadeias de cada uma das enzimas selecionadas, de acordo com a localização de seus respectivos ligantes. Como a proteína do choque térmico 90 é homodimérica, duas regiões para ancoramento foram selecionadas para realizar o docking (-0,028 x -8,584 x 1,687 e -0,168 x 7,591 x 0,882) x , y, z Å. O ancoramento foi realizado utilizando o software Autodock Vina 1.1.2, com o parâmetro exhaustiveness = 256. Os valores de afinidade obtidos pelo Autodock Vina foram submetidos ao teste t ($P \leq 0.05$) utilizando o programa SISVAR (5.6.86).

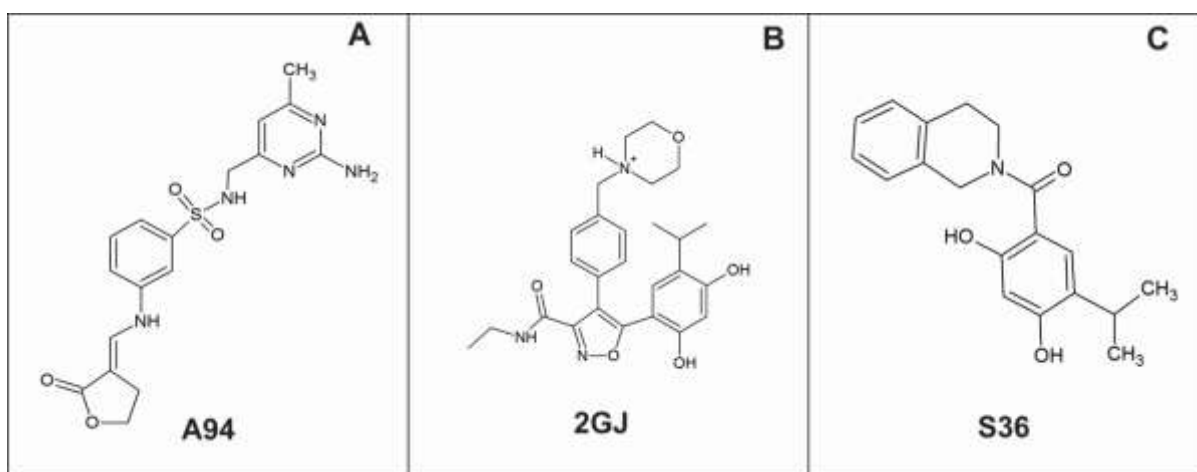


Fig. 2. Estruturas tridimensionais dos ligantes desenhadas no programa Chems sketch 14.0.

N-[(2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)methyl]-3-[[e)-(2-oxodihydrofuran-3(2h)-ylidene)methyl]amino]benzenesulfonamide (**A94**), 5-[2,4-dihydroxy-5-(1-methylethyl)phenyl]-n-ethyl-4-[4-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]isoxazole-3-carboxamide (**2GJ**) e 3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl[2,4-dihydroxy-5-(propan-2-yl)phenyl]methanone (**S36**).

Resultados

Busca farmacofórica e seleção da enzima

Para identificar o alvo enzimático do fluopyram bem como de seus produtos de degradação em solo e água (Fig. 1), foi realizada uma busca farmacofórica com as conformações mais estáveis dessas moléculas. A busca farmacofórica retornou os seguintes

resultados com proteínas com escore de Tanimoto \geq a 0,4: mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase (código RCSB: 3VRB/3VR9/4YSY) (Shimizu *et al.*, 2012; Inaoka *et al.*, 2015), beta-lactamase (4DDY) (Nichols *et al.*, 2012), E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (3TPX) (Zhan *et al.*, 2012), metallo-beta-lactamase VIM-2 (5LCA) (Li *et al.*, 2017), Carbonic anhydrase 2 (3M2Z), proteína do choque térmico 90 (código: 4L93) (dados não publicados), serine/threonine-protein kinase PLK1 (código: 4WHH) (Ahn *et al.*, 2015), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (3I6C) (Dong *et al.*, 2010), iron/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase asqJ (6EOZ/5OA7/5DAW) (Bräuer *et al.*, 2016; Mader *et al.*, 2018), sugar kinase protein (4K93) (dados não publicados). Após alinhamento das sequências das proteínas que se repetiram nos resultados da busca farmacofórica apenas as sequências de aminoácidos das enzimas 3VRB (mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase) e 6EOZ (iron/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase asqJ) foram mantidas para a próxima etapa.

As sequências de aminoácidos das enzimas 3VRB, 4DDY, 3TPX, 5LCA, 3M2Z, 4L93, 4WHH, 3I6C, 6EOZ, 4K93 foram usadas para realizar uma busca BLASTp nos genomas do filo Nematoda e do gênero *Meloidogyne* para encontrar similaridade entre elas. A pesquisa Blastp para o filo Nematoda com enzima 3VRB, mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase de *Ascarim suum*, retornou resultados de sequências da enzima succinato desidrogenase. A pesquisa mostrou sequências com escores acima de 200 e identidade acima de 70% a enzima 3VRB. Entretanto, os resultados encontrados eram de sequências de nematoides parasitas de animais ou de vida livre, não sendo encontrados resultados para nematoides parasitas de plantas. (Tabela suplementar S1). Já a busca por sequências similares a 3VRB no genoma de *Meloidogyne* spp. retornou resultados com baixa similaridade entre as sequências (Tabela suplementar S2, S3, S4). Na tentativa de encontrar sequências de nucleotídeos com correspondentes similares aos aminoácidos da enzima 3VRB, uma busca tBlastn foi realizada, entretanto, nenhuma sequência foi encontrada (dados não mostrados).

As buscas Blastp com as sequências de aminoácidos das enzimas 3TPX, 4WHH, 3I6C, 5LCA, 4K93, 3M2Z e 6EOZ retornaram resultados com baixa similaridade no genoma de *Meloidogyne* spp. (Tabelas suplementares S5, S6, S7, S8 e S9). Já para as sequências de aminoácidos das proteínas 3M2Z e 6EOZ não foi encontrada nenhuma similaridade no genoma de *Meloidogyne* spp. A busca Blastp para a enzima 4L93, uma proteína do choque térmico 90 de *Homo sapiens*, retornou resultados de sequências de aminoácidos do filo Nematoda e gênero *Meloidogyne* com escore acima de 200, cobertura acima de 90% e identidade maior que 70% (Tabela suplementar S10). A enzima 4L93 possui similaridade com sequências de aminoácidos encontradas no genoma de *Meloidogyne* spp. Esta enzima foi a única selecionada para a próxima etapa.

Seleção de proteínas para o docking

Utilizando o RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>), foram baixadas 391 sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais da proteína do choque térmico 90 (heat shock protein 90). Depois disso, as enzimas foram selecionadas quanto à similaridade acima de 97% quando comparadas a enzima 4L93 (enzima selecionada na busca farmacofórica), ausência de metais no sítio ativo da enzima, ausência de mutações nos resíduos de aminoácidos, e ausência de resíduos faltantes no sítio ativo da enzima ou próximos a ele. Feito isto, foram selecionadas proteínas do choque térmico 90 de *Homo sapiens* com os seguintes códigos no RCSB: 2JJC (Congreve *et al.*, 2008), 2VCI (Brough *et al.*, 2008), 2QG0 (Huth *et al.*, 2007), 4FCP (Davies *et al.*, 2012) e 4L93 (dados não publicados), pois não há estruturas tridimensionais cristalizadas de proteínas HSP90 de *Meloidogyne* spp. ou outros nematoides fitoparasitas.

Docking

Após busca conformacional pelo Open3Dalign e otimização das conformações mais estáveis pelo MOPAC2016, as conformações de menores energias dos ligantes 2GJ, A94 e S36 foram selecionadas para realizar o docking (ancoramento). Os ligantes selecionados e o fluopyram foram ancorados ao sítio ativo das enzimas 2JJC, 2VCI, 4FCP, 2QG0, 4L93 utilizando o programa Autodock Vina 1.1.2 e a posição experimental de cada um dos ligantes complexados com as respectivas enzimas foi reproduzida. Os valores de afinidade (Kcal/mol) dos ligantes no sítio ativo de cada cadeia da enzima foram calculados. Não houve diferença entre a afinidades do fluopyram e dos ligantes 2GJ, S36 e A94 da enzima HSP90 tanto na cadeia A quanto na cadeia B, o que indica que o fluopyram se liga de forma eficiente ao sítio ativo da enzima (Fig. 3). Logo, os resultados indicam que o alvo enzimático do fluopyram em *Meloidogyne* spp. é a enzima HSP90.

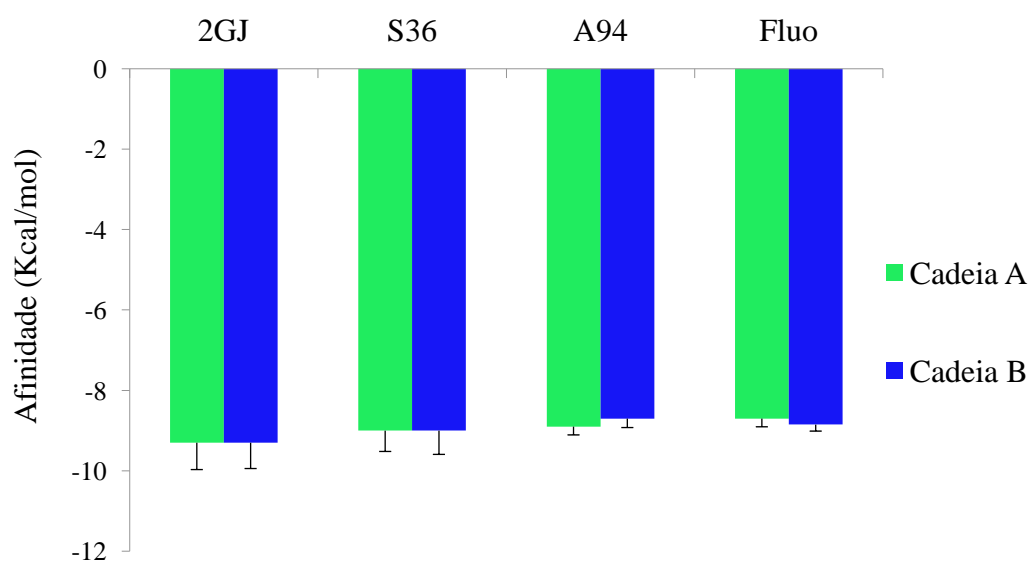


Fig. 3. Afinidades dos ligantes 2GJ (5-[2,4-dihydroxy-5-(1-methylethyl)phenyl]-n-ethyl-4-[4-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]isoxazole-3-carboxamide), S36 (3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl[2,4-dihydroxy-5-(propan-2-yl)phenyl]methanone), A94 (N-[(2-amino-6-methylpyrimidin-4-yl)methyl]-3-[[e)-(2-oxodihydrofuran-3(2h)ylidene)methyl]amino} benzenesulfonamide) e Fluo (Fluopyram) com as enzimas selecionadas 2VCI, 2QG0, 4FCP,

2JJC e 4L93, de acordo com os cálculos realizados com o Autodock Vina 1.1.2. As barras de erro correspondem aos desvios padrão. Não foi observada diferença significativa para os valores dos cálculos realizados com o Autodock Vina quando o teste *t* foi aplicado ($P \leq 0,5$).

Discussão

Neste trabalho foi investigado o alvo enzimático do fungicida fluopyram em *Meloidogyne* spp. através de estudos *in silico*. Em fungos e em *C. elegans* fluopyram tem ação sobre a enzima succinato desidrogenase (SDH) e acredita-se que o alvo em nematoides fitoparasitas seja o mesmo. Porém, neste trabalho, encontramos outro possível alvo enzimático do fluopyram, a enzima HSP90 ‘proteína do choque térmico 90’, e comprovamos a afinidade do fluopyram por esta enzima através de estudos de docking molecular.

A busca farmacofórica, possibilitou identificar os possíveis alvos enzimáticos do fluopyram em nematoides do gênero *Meloidogyne*. As proteínas 4DDY, 3TPX, 5LCA, 3M2Z, 4WHH, 3I6C, 6EOZ, 4K93, 3VRB e 4L93 foram selecionadas devido ao escore de Tanimoto $\geq 0,4$, sugerindo que estas enzimas podem ser alvos potenciais do fluopyram e dos outros compostos. O coeficiente de Tanimoto representa uma medida de similaridade entre substâncias químicas (Willet & Barnard, 1998). Porém, 4DDY, 5LCA, 4K93, 6EOZ, 3TPX, 3M2Z, 3I6C e 4WHH não tiveram uma boa similaridade com as sequências de aminoácidos de nematoides fitoparasitas. As enzimas 4DDY e 5LCA correspondem a uma beta-lactamase de *Escherichia coli* e metallo-beta-lactamase de *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente, e sua função está relacionada à resistência a antibióticos (Nichols *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017). A enzima 4K93 é uma proteína sugar kinase de *Rhizobium etli*. Quinases são proteínas que modificam outras proteínas através de fosforilação. Um resultado de uma sequência com baixa similaridade foi encontrado para *M. chitwoodi*, para a enzima beta-1,4-endoglucanase, envolvida em processos de degradação de parede celular no parasitismo. Foi obtido um

resultado para a enzima iron/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase asqJ de *Aspergillus nidulans* (6EOZ) (Mader *et al.*, 2018), e apenas uma proteína hipotética de *M. graminicola* teve alguma similaridade com a sequência desta proteína, porém foi muito baixa. As enzimas 3TPX, 3M2Z, 3I6C e 4WHH, que correspondem a E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2, carbonic anhydrase 2, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 e serine/threonine-protein kinase PLK1 encontradas em *Homo sapiens* também não tiveram boa correspondência no genoma de *Meloidogyne* spp. ou outros nematoides fitoparasitas.

A enzima succinato desidrogenase é composta por quatro subunidades: as subunidades SDHA e SDHB que compõem o domínio periférico da membrana e as subunidades SDHC e SDHD que compõem o domínio ancorado a membrana (Avenot & Michailides, 2010). O fluopyram pertence à classe dos fungicidas inibidores da enzima succinato desidrogenase (SDHI). A classe destes compostos que inibe o complexo II da respiração fúngica foi originalmente denominada fungicidas carboxamidas, sendo a carboxina o primeiro composto dessa classe comercializado em 1966 (Von schmeling & Kulka, 1966). Os primeiros trabalhos comprovando que a enzima succinato desidrogenase (SDH) era o alvo de SDHI foram realizados na década de 1970 (Georgopoulos *et al.*, 1972). Mutantes de *Ustilago maydis* e *Aspergillus nidulans* foram selecionados após serem submetidos à radiação UV em meio alterado por fungicida. Esse estudo concluiu que mutações nos genes da succinato desidrogenase eram responsáveis pela resistência a carboxina (Georgopoulos *et al.*, 1972; Van Tyul, 1975; Georgopoulos & Ziogas, 1977). Pesquisas com outros inibidores da succinato desidrogenase também indicam que esta enzima é o alvo de fungicidas SDHI (Avenot *et al.*, 2009; Glaettli *et al.*, 2009; Shima *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2011; Veloukas *et al.*, 2013). Segundo Scalliet *et al.* (2012) a mutação na enzima succinato desidrogenase de *Mycosphaerella graminicola*, altera a resistência deste fungo ao fluopyram. No fungo *Botrytis cinerea* mutações em três diferentes códons do gene SdhB conferiram diferentes

níveis de resistência aos fungicidas inibidores de succinato desidrogenase, incluindo o fluopyram (Veloukas *et al.*, 2013). No filo Nematoda a ação do fluopyram nesta enzima foi comprovada para o nematoide de vida livre *C. elegans* (Burns *et al.*, 2015).

A busca farmacofórica selecionou a enzima 3VRB, uma mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase do nematoide parasita *Ascarim suum* (Shimizu *et al.*, 2012). A enzima 3VRB possui similaridade com sequências de enzimas succinato desidrogenase de nematoides. Porém, esta similaridade foi encontrada apenas para nematoides de vida livre e parasitas de animais. Também foi realizada uma busca no NCBI por sequências de aminoácidos de enzimas succinato desidrogenase para o gênero *Meloidogyne* ou outros nematoides parasitas de plantas, entretanto não foram encontradas sequências para estes organismos (dados não mostrados). Como não houve correspondência desta enzima com sequências de aminoácidos de *Meloidogyne* spp., não havia como comprovar que a enzima nestes organismos é um alvo do fluopyram.

Dentre os resultados encontrados na busca farmacofórica, apenas a enzima 4L93, uma proteína do choque térmico 90 de *Homo sapiens*, possuiu alta similaridade com sequências de aminoácidos de nematoides do gênero *Meloidogyne*. As proteínas do choque térmico (HSP) constituem uma família de proteínas onipresentes e altamente conservadas em vários organismos. De acordo com seu peso molecular estas proteínas podem ser classificadas em diferentes famílias: HSP100 (100 kDa), HSP90 (83 a 90 kDa), HSP70 (68 a 70 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP40 (40 kDa) e HSPs de baixa massa molecular (16 a 25 kDa) (Lindquist & Craig, 1988; Bakthisaran *et al.*, 2015).

A HSP90 está presente em vários organismos (Gao *et al.*, 2008). Ela é uma proteína dimérica composta por duas subunidades idênticas e simétricas. Cada monômero consiste em três domínios, o N-terminal, o intermediário e o C-terminal (Ferrari & Rüdiger, 2019). O domínio N-terminal contém os principais elementos estruturais responsáveis pelo sítio de

ligação ao ATP. A energia gerada pela hidrólise do ATP está relacionada com a função de HSP90 como chaperonas (Obermann *et al.*, 1988; Panaretou *et al.*, 1998). Chaperonas são proteínas que auxiliam outras proteínas em seu enovelamento, caso essa etapa não ocorra corretamente às proteínas são destruídas (Hartl & Hayer-hartl, 2002). Inibidores da enzima HSP90 podem se ligar ao sítio ativo de ligação ao ATP e interferir na atividade da proteína como chaperona (Ferrari & Rüdiger, 2019), é possível que o fluopyram atue da mesma forma que esses inibidores, diminuindo a função da enzima como chaperona.

Além de função de chaperona, HSP90 também está relacionada com respostas a várias condições de estresse, como mudanças rápidas de temperatura, choque térmico ou frio, presença de metais pesados e alterações no ambiente celular que podem causar danos às proteínas (Gao *et al.*, 2008). A ação do fluopyram sobre a enzima HSP90 pode influenciar o processo de penetração do parasita (Maresca & Carratfi, 1992), uma vez que os nematoides devem se adaptar a mudança de temperatura do ambiente externo para penetrar o hospedeiro (De Luca *et al.*, 2009).

No nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, a proteína DAF-21, homóloga a HSP90, é necessária para o desenvolvimento de gônadas, reto, vulva e maturação de oocitos (Birnbay *et al.*, 2000; Gillan *et al.*, 2009). Segundo Piano *et al.* (2000) esta enzima também é crucial para nematoides adultos. Em *Brugia pahangi*, um nematoide parasita de animais, a inibição do gene Hsp90 resultou em redução da produção de ovos e morte embrionária (Devaney *et al.*, 2005). A inibição da enzima HSP90 pelo fluopyram pode interferir na reprodução e desenvolvimento dos nematoides do gênero *Meloidogyne*.

Os resultados deste estudo indicam que o fluopyram atua na enzima HSP90 em *Meloidogyne* spp. Apesar de não conseguirmos comprovar que a succinato desidrogenase era um alvo em *Meloidogyne* spp., esta possibilidade não deve ser descartada.

Referências

Ahn, M., Han, Y-H., Park, J-E., Kim, S., Lee, W. C., Lee, S. J., Gunasekaran, P., Cheong, C., Shin, S. Y., Kim, H.Y., Ryu, E. K., Murugan, R. N., Kim, N. H. & Bang, J. K. (2015). A new class of peptidomimetics targeting the polo-box domain of Polo-like kinase 1. *Journal of Medicinal Chemistry* 58, 294-304. DOI: 10.1021/jm501147g

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389

Avenot, H.F. & Michailides, T.J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29, 643–651. DOI: 10.1016/j.cropro.2010.02.019

Avenot, H., Sellam, A. & Michailides, T. (2009). Characterization of mutations in the membrane-anchored subunits AaSDHC and AaSDHD of succinate dehydrogenase from *Alternaria alternata* isolates conferring field resistance to the fungicide boscalid. *Plant Pathology* 58, 1134-1143. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02154.x

Bakthisaran, R., Tangirala, R. & Rao, C. M. (2015). Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1854, 291-319. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.12.019

Berman, H.M. *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 235–242.

DOI: 10.1107/S0907444902003451

Birnby, D. A., Link, E. M., Vowels, J. J., Tian, H., Colacurcio, P. L. & Thomas, J. H. (2000).

A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155, 85-104.

Bräuer, A., Beck, P., Hintermann, L. & Groll, M. (2016). Structure of the Dioxygenase AsqJ:

Mechanistic Insights into a One-Pot Multistep Quinolone Antibiotic Biosynthesis.

Angewandte Chemie International Edition 55, 422-426. DOI: 10.1002/anie.201507835

Brough, P. A. *et al.* (2008). 4, 5-diarylisoxazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 196-218.

Burns, A. R. *et al.* (2015). *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications* 6, 1-11. DOI: 10.1038/ncomms8485

Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Perfus-Barbeoch, L. & Abad, P. (2013). Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology* 51, 203-220. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102300

Congreve, M., Chessari, G., Tisi, D. & Woodhead, A. J. (2008). Recent developments in fragment-based drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 3661-3680. DOI: 10.1021/jm8000373

Davies, N. G. *et al.* (2012). Targeting conserved water molecules: design of 4-aryl-5-cyanopyrrolo [2, 3-d] pyrimidine Hsp90 inhibitors using fragment-based screening and structure-based optimization. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20, 6770-6789. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.050

De Luca, F., Di Vito, M., Fanelli, E., Reyes, A., Greco, N. & De Giorgi, C. (2009). Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia* and its expression as related to different developmental stages and temperature. *Gene* 440, 16-22. DOI: 10.1016/j.gene.2009.03.020

Desaeger, J., Dickson, D. W. & Locascio, S. J. (2017). Methyl bromide alternatives for control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in tomato production in Florida. *Journal of Nematology* 49, 140.

Devaney, E., O'Neill, K., Harnett, W., Whitesell, L. & Kinnaird, J. H. (2005). Hsp90 is essential in the filarial nematode *Brugia pahangi*. *International Journal for Parasitology* 35, 627-636. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.01.007

Dong, L. *et al.* (2010). Structure-based design of novel human Pin1 inhibitors (II). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20, 2210-2214. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.02.033

Faske, T. R. & Hurd, K. (2015). Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to Fluopyram. *Journal of Nematology* 47, 316.

Feng, Z., Chen, L., Maddula, H., Akcan, O., Oughtred, R., Berman, H. M. & Westbrook, J. (2004). Ligand Depot: a data warehouse for ligands bound to macromolecules. *Bioinformatics* 20, 2153-2155. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth214

Ferrari, L., Rüdiger, S. G. D. (2019). Hsp90 Chaperone in Disease. In: Asea, A. & Kaur, P. (Eds). *Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders*. Springer, Cham, pp. 473-491. DOI: 10.1007/978-3-030-23158-3_21

Gao, Q., Zhao, J., Song, L., Qiu, L., Yu, Y., Zhang, H. & Ni, D. (2008). Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 379-385. DOI: 10.1016/j.fsi.2007.08.008

Georgopoulos, S. G. & Ziogas, B. N. (1977). A new class of carboxin-resistant mutants of *Ustilago maydis*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83, 235. DOI: 10.1007/BF03041438

Georgopoulos, S. G., Alexandri, E. & Chrysayi, M. (1972). Genetic evidence for the action of oxathiin and thiazole derivatives on the succinic dehydrogenase system of *Ustilago maydis* mitochondria. *Journal of Bacteriology* 110, 809-817.

Gillan, V., Maitland, K., McCormack, G., Him, N. A. & Devaney, E. (2009). Functional genomics of hsp-90 in parasitic and free-living nematodes. *International Journal for Parasitology* 39, 1071-1081. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.02.024

Glaetli, A., Stammli, G., Schlehuber, S. (2009). Mutations in the target proteins of succinate-dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14a-demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity e structural insights from molecular modelling. In: 9th International Conference on Plant Diseases, Tours, France, pp. 670-681.

Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858. DOI: 10.1126/science.1068408

Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 14, 33-38.

Huth, J. R. *et al.* (2007). Discovery and design of novel HSP90 inhibitors using multiple fragment-based design strategies. *Chemical Biology & Drug Design* 70, 1-12. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2007.00535.x

Inaoka, D. K. *et al.* (2015). Structural insights into the molecular design of flutolanil derivatives targeted for fumarate respiration of parasite mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 15287-15308. DOI: 10.3390/ijms160715287

Lešnik, S., Štular, T., Brus, B., Knez, D., Gobec, S., Janežič, D., & Konc, J. (2015). LiSiCA: a software for ligand-based virtual screening and its application for the discovery of Butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling* 55, 1521–1528. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00136

Li, G. B., Abboud, M. I., Brem, J., Someya, H., Lohans, C. T., Yang, S. Y., Spencer, J., Wareham, D.W., McDonough, M. A. & Schofield, C. J. (2017). NMR-filtered virtual screening leads to non-metal chelating metallo- β -lactamase inhibitors. *Chemical Science* 8, 928-937. DOI: 10.1039/C6SC04524C

Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* 22, 631-677.

Mader, S. L., Bräuer, A., Groll, M. & Kaila, V. R. (2018). Catalytic mechanism and molecular engineering of quinolone biosynthesis in dioxygenase AsqJ. *Nature Communications* 9, 1-8. DOI: 10.1038/s41467-018-03442-2

Maresca, B. & Carratu, L. (1992). The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitology Today* 8, 260-266. DOI: 10.1016/0169-4758(92)90137-Q

Martínez, L., Andreani, R. & Martínez, J. M. (2007). Convergent algorithms for protein structural alignment. *BMC bioinformatics* 8, 306. DOI: 10.1186/1471-2105-8-306

Moens, M., Perry, R.N. & Starr, J.L. (2009) *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N., Moens, M. & Starr, J.L. (Eds). *Root-Knot Nematodes*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 1–17.

Nichols, D. A., Jaishankar, P., Larson, W., Smith, E., Liu, G., Beyrouthy, R., Bonnet, R., Renslo, A. R., Chen, Y. (2012). Structure-based design of potent and ligand-efficient

inhibitors of CTX-M class A β -lactamase. *Journal of Medicinal Chemistry* 55, 2163-2172.

DOI: 10.1021/jm2014138

Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Nijs, L., Hockland, S., Maafi, Z.T. (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones, J., Gheysen, G., Fenoll, C. (Eds).

Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, Dordrecht, p. 21-43. DOI: 10.1007/978-94-007-0434-3_2

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T. & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics* 3, 33. DOI:

10.1186/1758-2946-3-33

Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P. & Hartl, F. U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *The Journal of Cell Biology* 143, 901-910. DOI: 10.1083/jcb.143.4.901

Oka, Y. & Saroya, Y. (2019). Effect of fluensulfone and fluopyram on the mobility and infection of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Pest Management Science* 75, 2095-2106. DOI: 10.1002/ps.5399

Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & Ugene Team. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167. DOI:

10.1093/bioinformatics/bts091

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *The EMBO Journal* 17, 4829–4836. DOI: 10.1093/emboj/17.16.4829

Peón, A., Naulaerts, S. & Ballester, P. J. (2017). Predicting the reliability of drug-target interaction predictions with maximum coverage of target space. *Scientific Reports* 7, 1-11. DOI: 10.1038/s41598-017-04264-w

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605-1612. DOI: 10.1002/jcc.20084

Piano, F., Schetter, A. J., Mangone, M., Stein, L. & Kempfues, K. J. (2000). RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 10, 1619-1622. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00869-1

Popko Jr, J. T., Sang, H., Lee, J., Yamada, T., Hoshino, Y. & Jung, G. (2018). Resistance of *Sclerotinia homoeocarpa* field isolates to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Plant Disease* 102, 2625-2631.

Proffer, T. J., Lizotte, E., Rothwell, N. L. & Sundin, G. W. (2013). Evaluation of dodine, fluopyram and penthiopyrad for the management of leaf spot and powdery mildew of tart cherry, and fungicide sensitivity screening of Michigan populations of *Blumeriella jaapii*. *Pest Management Science* 69, 747-754. DOI: 10.1002/ps.3434

Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchhofer-Allan, L., Steinhauer, D., Ward, K., Niklaus, M., Verras, A., Csukai, M., Daina, A. & Fonné-Pfister, R. (2012). Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 7, e35429. DOI: 10.1371/journal.pone.0035429

Shima, Y., Ito, Y., Kaneko, S., Hatabayashi, H., Watanabe, Y., Adachi, Y. & Yabe, K. (2009). Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 67-76. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.10.005

Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. & Kita, K. (2012). Crystal structure of mitochondrial quinol–fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *The Journal of Biochemistry* 151, 589-592. DOI: 10.1093/jb/mvs051

Sierotzki, H. & Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103, 880-887. DOI: 10.1094/phyto-01-13-0009-rvw

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 1-6. DOI: i:10.1038/msb.2011.75

Sikora, R. A. & Fernandez, E. (2005). In: Luc, M.; Sikora R.A.; Bridge, J. (Eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2nd edition. Wallingford: CABI Publishing, p. 319-392.

Stewart P. JJ, MOPAC 2016 (Molecular Orbital PACkage), [http:// openmopac.net](http://openmopac.net), Fujitsu Limited (2016).

Tosco, P., Balle, T. & Shiri, F. (2011). Open3DALIGN: Na open-source software aimed at unsupervised ligand alignment. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 25, 777–783. DOI: 10.1007/s10822-011-9462-9

Trott, O. & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31, 455-461. DOI: 10.1002/jcc.21334

Van Tyul, J. M. (1975). Acquired resistance to carboxin in *Aspergillus nidulans*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 81, 122-123. DOI: 10.1007/BF01999863

Veloukas, T., Markoglou, A. N. & Karaoglanidis, G. S. (2013). Differential effect of Sdh B gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 97, 118-122. DOI: 10.1094/PDIS-03-12-0322-RE

Von Schmeling, B. & Kulka, M. (1966). Systemic fungicidal activity of 1, 4-oxathiin derivatives. *Science* 152, 659-660. DOI: 10.1126/science.152.3722.659

Walker, A. S., Gredt, M. & Leroux, P. (2011). Resistance to QoIs and SDHIs in populations of *Botrytis cinerea*. In: Dehne, H. D., Deising, H. B., Gisi, U., Kuck, K. H., Russel, P. E. & Lyr, H. (Eds). *Modern fungicides and antifungal compounds VI. 16th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany*. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, pp. 187-194

Watson R. T., D. T. Albritton, S. O. Anderson, and S. Lee-Bapty.(1992). Methyl bromide: Its atmospheric science, technology and economics. In: Montreal Protocol Assessment suppl. United Nations Environment Programme, pp.234. Nairobi, Kenya.

Willett, P., Barnard, J. M. & Downs, G. M. (1998). Chemical similarity searching. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 38, 983-996. DOI: 10.1021/ci9800211

Zasada, I. A., Halbrecht, J. M., Kokalis-Burelle, N., LaMondia, J., McKenry, M. V. & Noling, J. W. (2010). Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* 48, 311-328. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114425.

Zhan, C., Zhao, L., Wei, X., Wu, X., Chen, X., Yuan, W., Lu, W., Pazgier, M. & Lu, W. (2012). An ultrahigh affinity d-peptide antagonist Of MDM2. *Journal of Medicinal Chemistry* 55 6237-6241. DOI: 10.1021/jm3005465

Material Suplementar Artigo 3

Tabela S1. Algumas sequências de aminoácidos do genoma do filo Nematoda que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da subunidade A da proteína mitocondrial riodoquinol-fumarate reductase (3VRB-A), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
Chain A, Succinate dehydrogenase flavoprotein [<i>Ascaris suum</i>]	1010	100%	99.69%	4YSX_A
Chain A, Flavoprotein subunit of complex II [<i>Ascaris suum</i>]	1006	100%	100.00%	3VR8_A
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial [<i>Trichinella</i> sp. T8]	923	95%	71.20%	KRZ88266.1
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial [<i>Trichinella patagoniensis</i>]	922	95%	71.17%	KRY23718.1
unnamed protein product [<i>Thelazia callipaeda</i>]	1275	100%	74.61%	VND065821.1
succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit [<i>Trichinella nativa</i>]	920	95%	71.31%	OUC44395.1
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial [<i>Trichinella papuae</i>]	919	95%	71.50%	KRZ72658.1

Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial [<i>Trichinella spiralis</i>]	919	94%	71.92%	KRZY41207.1
--	-----	-----	--------	-------------

Tabela S2. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da subunidade A da proteína mitocondrial riodoquinol-fumarate reductase (3VRB-A), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
putative esophageal gland cell secretory protein 21 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	24.6	3%	28.57%	AAN08587.1
hypothetical protein [<i>Meloidogyne incognita</i>]	24.3	4%	31.03%	AHK09758.1
hypothetical protein [<i>Meloidogyne graminicola</i>]	23.5	3%	23.81%	AVZ46778.1
pectate lyase 2 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	23.5	3%	16.00%	AAQ97032.1

Tabela S3. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da subunidade B da proteína mitocondrial ridoquinol-fumarate reductase (3VRB-B), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
hypothetical protein [<i>Meloidogyne graminicola</i>]	21.9	3%	54.55%	AVZ46781.1

Tabela S4. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da subunidade C da proteína mitocondrial ridoquinol-fumarate reductase (3VRB-C), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
chitin synthase [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	26.2	14%	21.43%	AAG40111.1
mitogen-activated protein kinase 1 [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	24.3	11%	23.81%	CAD56894.1
mitogen-activated protein kinase 1 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	23.9	11%	23.81%	ABI96897.1

mitogen-activated protein kinase 1 [<i>Meloidogyne enterolobii</i>]	23.9	11%	23.81%	AMA07359.1
superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	22.3	17%	34.38%	AAZ29194.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne arenaria</i>]	22.3	17%	34.38%	AHX24641.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	17%	34.38%	CAR97797.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	17%	34.38%	CAR97789.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne javanica</i>]	21.9	17%	34.38%	AHX24645.1
superoxide dismutase Mn [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	17%	34.38%	CAL07965.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	17%	34.38%	CAR97788.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	22.3	17%	34.38%	CAR97795.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	17%	34.38%	CAO78623.1
superoxide dismutase Mn [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.2	17%	34.38%	CAL07966.1
manganese superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.2	17%	34.38%	CAR97793.1
superoxide dismutase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.2	17%	34.38%	AAZ29193.1

Tabela S5. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos de E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (3TPX), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
calreticulin [<i>Meloidogyne incognita</i>]	23.9	36%	17.24%	AAL40720.1
calreticulin [<i>Meloidogyne enterolobii</i>]	23.1	36%	17.24%	AMQ22793.1
putative transmembrane cation transporter [<i>Meloidogyne javanica</i>]	22.3	51%	20.00%	ADM16640.1
beta-1,4-endoglucanase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	21.9	28%	30.43%	AAD45868.1
cellulase [<i>Meloidogyne incognita</i>]	20.8	28%	21.74%	AAR37374.1
beta-1,4-endoglucanase [<i>Meloidogyne javanica</i>]	20.8	28%	21.74%	ACA66271.1
ND3 [<i>Meloidogyne hapla</i>]	20.4	13%	21.43%	AAA98774.1
npr-1 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	20.0	11%	33.33%	ACJ72212.1
NADH dehydrogenase subunit 3 [<i>Meloidogyne enterolobii</i>]	19.2	7%	33.33%	YP_009122971.1
RNA polymerase II large subunit [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	19.2	15%	33.33%	AGS13746.1
putative esophageal gland cell secretory protein 5 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	19.2	10%	37.50%	AAQ10019.1
RNA polymerase II large subunit [<i>Meloidogyne ardenensis</i>]	19.2	15%	33.33%	AGS13744.1

RNA polymerase II large subunit [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	19.2	15%	33.33%	AGS13747.1
RNA polymerase II large subunit [<i>Meloidogyne ardenensis</i>]	19.2	15%	33.33%	AGS13745.1
ND3 [<i>Meloidogyne javanica</i>]	18.9	7%	33.33%	AAA98777.1
NADH dehydrogenase subunit 3 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	18.9	7%	33.33%	YP_009029741.1

Tabela S6. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da proteína serine/threonine-protein kinase PLK1 (4HWW), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) no genoma de *Meloidogyne* spp. através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
mep-1 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	51.6	22%	20.69%	AFG25448.1

Tabela S7. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos de peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (3I6C), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) no genoma de *Meloidogyne* spp. através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
chitin synthase [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	21.9	34%	16.67%	AAG40111.1

Tabela S8. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos de metallo beta-lactamase (5LCA), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) no genoma de *Meloidogyne* spp. através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
hypothetical protein [<i>Meloidogyne graminicola</i>]	23.5	9%	12.12%	AVZ46790.1

Tabela S9. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos de sugar kinase protein (4K93), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) no genoma de *Meloidogyne* spp. através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
beta-1,4-endoglucanase [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	25.0	11%	15.56%	AER27806.1
beta-1,4-endoglucanase [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	23.5	10%	27.78%	AER27807.1

Tabela S10. Sequência de aminoácidos de *Meloidogyne* spp. que possuem similaridade com a sequência de aminoácidos da proteína do choque térmico 90 (4L93), obtidas a partir de uma pesquisa Blastp, usando o software Blastp 2.9.0+, com o algoritmo padrão Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST (DELTA-BLAST) no genoma de *Meloidogyne* spp. através do National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Description	Total score	Query cover	Per. Ident	Accession
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	289	96%	77.73%	CAU15486.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne artiellia</i>]	288	96%	77.73%	CAU15484.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	270	90%	78.16%	ADD10372.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne javanica</i>]	203	62%	80.42%	AAG39299.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne</i>]	202	62%	80.42%	ACL52277.1

<i>arenaria</i>				
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne incognita</i>]	202	62%	80.42%	ABY76189.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	199	63%	79.17%	AGW23668.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	198	63%	77.78%	AGW23648.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	198	63%	77.78%	AGW23646.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	198	63%	77.78%	AGW23647.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	197	63%	77.78%	AGW23649.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	197	62%	79.72%	AGW23672.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	197	62%	80.42%	AGW23673.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	197	62%	79.72%	AGW23671.1
heat shock protein hsp-90 [<i>Meloidogyne enterolobii</i>]	197	60%	79.86%	AXJ19917.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	196	62%	79.02%	AGW23670.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne naasi</i>]	195	62%	79.02%	AGW23669.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne hapla</i>]	194	60%	79.14	AAT35587.1

heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne hapla</i>]	193	60%	78.42%	AAT35588.1
heat shock protein 90 heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne arenaria</i>]	185	59%	79.26%	ABY76188.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	183	59%	77.94%	AGW23665.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	182	59%	77.94%	AGW23666.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	183	59%	77.94%	AGW23664.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	183	59%	77.94%	AGW23655.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	183	59%	77.94%	AGW23656.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	183	59%	77.94%	AGW23663.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	182	59%	77.94%	AGW23658.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	182	59%	77.78%	AGW23657.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	179	59%	76.47%	AGW23643.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	179	59%	76.47%	AGW23641.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	179	59%	76.47%	AGW23644.1

heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	179	59%	77.21%	AGW23667.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	179	59%	76.47%	AGW23660.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	179	59%	77.21%	AGW23659.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	178	59%	77.21%	AGW23661.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	178	59%	75.74%	AGW23642.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne minor</i>]	177	59%	77.21%	AGW23662.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne chitwoodi</i>]	176	59%	75.74%	AGW23645.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne floridensis</i>]	167	53%	78.05%	ABY76191.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne floridensis</i>]	157	53%	74.80%	ABY76195.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	153	52%	74.17%	AGW23650.1
heat shock protein 90 [<i>Meloidogyne fallax</i>]	148	50%	73.28%	AGW23654.1
