



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE PLANTAS
DE *Psidium* spp. INFECTADAS COM *Meloidogyne enterolobii*

EMANUELA DE OLIVEIRA ALVES ARAÚJO

Natal – RN

2016

EMANUELA DE OLIVEIRA ALVES ARAÚJO

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE PLANTAS DE
Psidium spp. INFECTADAS COM *Meloidogyne enterolobii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológica.

Orientadora: Professora Dra. Katia Castanho Scortecchi

Co-orientadora: Dra. Juliana Martins Ribeiro

Natal – RN

2016

EMANUELA DE OLIVEIRA ALVES ARAÚJO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ENZIMÁTICA DE PLANTAS DE
Psidium spp. INFECTADAS COM *Meloidogyne enterolobii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológica.

Aprovado em: 30/09/2016

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª. Katia Castanho Scortecchi
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN
Orientadora



Dr. Diego Araújo de Sabry
Pós-Doc IFRN
1º Examinador



Drª. Daiane Cristina Ferreira Golbert
Pós-Doc UFRN
2º Examinador

A meu esposo, Paulo Victor, por todo carinho, companheirismo e amor.

Ao nosso filho, João Victor, fruto desse amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFRN pela oportunidade de aprendizado e discursões construtivas vivenciadas no decorrer das disciplinas.

À Embrapa Semiárido pelo suporte experimental e financeiro do trabalho e aos servidores e pesquisadores empenhados nessa pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Dra. Katia Castanho Scortecci, por confiar em mim para desenvolver este trabalho, pela paciência e compreensão. Muito obrigada por toda a orientação e aprendizado.

À pesquisadora da Embrapa Semiárido e co-orientadora, Dr^a. Juliana Martins Ribeiro, pela parceria na parte experimental do trabalho.

À Professora Dra. Juliana Espada Lichston, por auxiliar e proporcionar a execução da parte histológica no Laboratório de Investigação de Matrizes Vegetais Energéticas (LIMVE).

Ao Professor Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, por disponibilizar o espaço do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL) para realização das leituras das atividades enzimáticas.

Aos membros da banca examinadora da qualificação, profa. Dra. Adriana Ferreira Uchoa, e prof. Dr. Eduardo Luiz Voigt por todas as contribuições para este trabalho.

Aos pesquisadores, Dra. Daiane Golbert e Dr. Diego de Araújo Sabry, por aceitarem participar da banca examinadora de defesa.

Ao Professor Dr. Marcos Costa e à técnica Rebecca Diniz, do Instituto do Cérebro, pelo auxílio nas análises de microscopia óptica.

A todos que fazem parte do Grupo de Plantas, em especial a Sara Caroline, por todos os ensinamentos compartilhados, confiança e amizade. Serei sempre grata! Às pessoas de Renata Kaline e Marília Gabriela, pela contribuição na parte histológica. À Vladimir (Vlad), pela ajuda na bioinformática. À Nathalia Medeiros pelas contribuições na etapa final do presente trabalho. À Nildiane Canário, Ana Karine, Helaine Cristiane (Cris), Amanda, Renata Kaline, Marília Gabriela e Sara, pelos momentos de confraternização.

À Raimunda Adlany Dias da Silva (Lany) e Fernanda Gondim Lambert Moreira (Nanda), orientandas da profa. Dra. Juliana Espada Lichston, pela parceria e ensinamentos na prática histológica.

Às técnicas de laboratório da UFRN, Verônica Aquino e Mayara Madja.

Ao servidor da UFRN, Gilvan, pela disponibilidade e prontidão nas várias viagens realizadas para encher o galão de nitrogênio líquido.

Às meninas responsáveis pela limpeza e manutenção do nosso ambiente de trabalho, Joice e Gizélia.

A Paulo Victor do Nascimento Araújo e a Carlos Eduardo Rocha Duarte Alencar (Cadu) pelas ajudas durante as análises estatísticas.

À Débora Alves de Carvalho Freire pela amizade e auxílio durante alguns momentos na construção deste trabalho.

À minha sogra, Maria Margarete do Nascimento Araújo, por todos os momentos dedicados a cuidar do meu querido filho, João Victor de Oliveira Araújo, durante as minhas ausências devido aos trabalhos acadêmicos.

Ao meu querido e maravilhoso companheiro, Paulo Victor do Nascimento Araújo, por todo carinho, amor, apoio, compreensão e paciência. Te amo hoje, mais do que ontem e menos do que amanhã!

Às minhas queridas irmãs, Ana Gabriela de Oliveira Alves e Cíntia Augusta de Oliveira Alves, pelas diferenças que nos completam e o carinho que nos aconchegam. Obrigada manas!

À minha querida mãe, Maria de Fátima Oliveira, pela educação, pelo exemplo de perseverança e fé. Por estar a me apoiar e dar conselhos. Eu te amo muito!

Ao presente maravilhoso de Deus, João Victor de Oliveira Araújo, por descobrir e vivenciar o verdadeiro sentido do amor!

À Deus e a Nossa Senhora por estarem sempre presentes em minha vida.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram ou participaram desse trabalho, que se finda com a elaboração da presente dissertação.

Sem mais delongas, muito obrigada!

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é amplamente cultivada por seus frutos comestíveis, ocupando lugar importante entre as frutas tropicais brasileiras. No entanto, a produção da goiabeira vem sendo prejudicada e inviabilizada em várias áreas de cultivo, tendo como principal fator responsável, a infecção parasitária do *Meloidogyne enterolobii*. Logo, considerando a problemática dos danos promovidos pelo *M. enterolobii*, este trabalho teve como objetivo analisar as possíveis alterações morfológicas e enzimáticas, para entender os danos do estresse ocasionado aos 26 dias após a infecção (DAI), em plantas de *Psidium* spp. quando infectadas pelo nematoide *M. enterolobii*. Para isso, foram utilizados exemplares de goiabeira (*Psidium guajava* cv 'Paluma'), consideradas suscetíveis ao nematoide, e araçazeiro da Costa Rica (*Psidium friedrichstalianum*), por ser uma espécie resistente ao nematoide e, por isso, ser utilizada como porta enxerto para *P. guajava*. Os exemplares, ao completarem quarenta dias após plantio em casa de vegetação, foram submetidos à inoculação do nematoide *M. enterolobii* e, aos 26 dias após a infecção com o nematoide, foram coletadas folhas e raízes para análise morfológica (determinação de área foliar), análises anatômica e histológica da raiz (análise de seções anatômicas transversais e longitudinais) e análises enzimáticas (análises de atividades de catalase, ascorbato peroxidase e peroxidase do guaiacol). Em paralelo, foi realizada uma pesquisa *in silico* de sequências de microarranjo relacionadas com a resistência ao estresse biótico em *Arabidopsis thaliana* com o intuito de identificar genes associados a este processo e que possam ser utilizados como marcadores para *Psidium* spp. no futuro. As análises morfológica e histológica comprovaram os danos causados pela infecção do *M. enterolobii* em goiabeiras e araçazeiros da Costa Rica. Foi verificado que a área foliar (AF) diminuiu com a infecção do *M. enterolobii* em *P. friedrichstalianum* e, em *P. guajava*, houve um aumento na AF. As alterações nas estruturas histológicas foram perceptíveis, aonde foi possível observar nos exemplares infectados a ocorrência de galhas nas raízes, a presença de células desordenadas, hiperplasia e hipertrofia celular, danos no xilema e possíveis formações de sítios de alimentações. Com as análises enzimáticas observamos que as atividades enzimáticas relacionadas com as EROs podem estar envolvidas no processo de infecção do nematoide em estudo. O tecido radicular da cv 'Paluma' apresentou menor atividade de ascorbato peroxidase (APX) em relação ao araçazeiro da Costa Rica (*P. friedrichstalianum*). Diante dos resultados obtidos da parte *in silico* foi construído um interactoma composto por 78 proteínas que foram apresentadas em grupos. As análises *in silico* em *Arabidopsis thaliana* sugerem possíveis vias de resposta envolvidas com planta hospedeira ao estresse biótico, estresse oxidativo, proteínas associadas direta e indiretamente com as duas vias, assim como também as localizações a nível celular dessas proteínas. Os dados e as evidências obtidas neste trabalho serão norteadores para futuros estudos, e a compreensão do comportamento dos processos que ocasionam a resistência das espécies de *Psidium* spp. a infecção pelo nematoide *Meloidogyne enterolobii*. Além disso, os dados *in silico* contribuíram em uma melhor compreensão biológica, trazendo informações que poderão auxiliar em estudos com estresse biótico ocasionado em outras dicotiledôneas.

Palavras-chave: Myrtaceae; estresse biótico; nematoide; morfologia vegetal; histologia vegetal.

ABSTRACT

The guava tree is widely cultivated due to its edible fruits, and it is considered an important Brazilian tropical fruits. However, the guava production has been affected in many cultivation areas by *Meloidogyne enterolobii* infection. For this reason, this work aimed to analyze the morphological and enzymatic changes promoted by the *M. enterolobii*. In order to understand this, *Psidium* spp plants when infested by the nematode *M. enterolobii* and after 26 days (DAI) were analyzed. For these assays, it was worked with *Psidium guajava* cv 'Paluma' (susceptible to the nematode) and *Psidium friedrichstalianum* (Costa Rican guava trees -resistant to the nematode). These plants were grown in green house and after forty days, these plants were infested with the *M. enterolobii* nematode, and after 26 days leaves and roots were collected for morphological analysis (determination of the leaf area), for anatomical and histological analyses of the root (analyses of cross-sectional and longitudinal anatomical sections), and for enzymatic analyses (analyses of catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase activities). Furthermore, it was also used an *in silico* approach using microarray data related to biotic stress using *Arabidopsis thaliana* data. The morphological and histological analyses confirmed the damages promoted by the *M. enterolobii* in guava and Costa Rica guava trees. It was also observed that the leaf area (LA) reduce with the infection of *M. enterolobii* in *P. friedrichstalianum*, and, in *P. guajava*, there was an increase in the LA. The histological structures alterations were observed by the presence of galls on the roots, disordered cells presence, hyperplasia and cellular hypertrophy, xylem damage, and feeding sites formation. The enzymatic analyses showed an increase in ROS. It was observed in *P. friedrichstalianum* an increase from APX activity when compared to *Psidium guajava*. The results obtained in the *in silico* analysis allowed us to build an interactome formed by 78 proteins that were presented in groups. This data suggest a potential response pathways involved in biotic stress, oxidative stress, proteins direct and indirectly associated with the two pathways, as well as the locations of these proteins in a cellular level. The results showed here may be a guideline for future studies and it helped to understand better the effects of *Meloidogyne enterolobii* nematode in *Psidium* spp species.

Keywords: Myrtaceae; biotic stress; nematode; plant morphology; plant histology.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR – Araçazeiro da Costa Rica

AF – Área foliar

ANOVA – Análise de Variância

APX - Ascorbato peroxidase

CAT - Catalase

CC – Cauda espiralada (do Inglês *Coiled-coil*)

CC-NBS-LRR – Cauda espiralada – Sítio de Ligação de Nucleotídeos – Repetições Ricas em Leucina (do Inglês *Coiled-coil – Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*)

CV - Cultivar

DAI – Dias após a infecção

En – Endoderme

Ep – Epiderme

Ex – Exoderme

FAA - Formaldeído, Ácido acético e Álcool

HIB – Híbrido Carlos Antônio

HR – Resposta de hipersensibilidade

LRR – Repetições Ricas em Leucina (do Inglês *Leucine Rich Repeats*)

MQ – Média dos quadrados

NBS – Sítio de Ligação de Nucleotídeos (do Inglês *Nucleotide Binding Site*)

NC – Nível de confiança

NCBI – Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (do Inglês *National Center for Biotechnology Information*)

PAL – cv. ‘Paluma’

PETA – Transferência de elétrons A na fotossíntese

PETC – Transferência de elétrons C na fotossíntese

POX - Peroxidase do guaiacol

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

SA - Sítio de alimentação

SQ – Soma dos quadrados

TAIR – Recurso de Informação em *Arabidopsis* (do Inglês *The Arabidopsis Information Resource*)

TIR - Receptor Toll-Interleucina (do Inglês *Toll Interleucine Receptor*)

TIR-NBS – Receptor Toll-Interleucina – Sítio de Ligação de Nucleotídeos (do Inglês *Toll Interleucine Receptor – Nucleotide Binding Site*)

TIR-NBS-LRR – Receptor Toll-Interleucina – Sítio de Ligação de Nucleotídeos – Repetições Ricas em Leucina (do Inglês *Toll Interleucine Receptor – Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação do material de <i>Psidium</i> spp.	29
Tabela 2. Relação esquemática e aferição das medidas da área foliar (AF) aos 26 DAI.	39
Tabela 3. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de CAT foliar aos 26 DAI, entre as Espécies e Inoculação [Araçazeiro da Costa Rica (ACR) vs. cv 'Paluma' (PAL)].	45
Tabela 4. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de CAT radicular aos 26 DAI, entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL).	45
Tabela 5. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de APX radicular aos 26 DAI entre as Espécies e Inoculação (ACR vs. PAL).	46
Tabela 6. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de APX foliar aos 26 DAI entre as Espécies e Inoculação (ACR vs. PAL).	46
Tabela 7. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de POX foliar aos 26 DAI entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL).	48
Tabela 8. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de POX radicular aos 26 DAI entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL).	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um ramo florífero da Goiabeira, <i>Psidium guajava</i> L.	18
Figura 2. Histórico do rendimento médio da produção nacional de goiaba.	20
Figura 3. Histórico do rendimento médio da produção de goiaba por região.	21
Figura 4. Histórico do rendimento médio da produção de goiaba por Unidade Federativa no ano de 2014.	23
Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Meloidogyne enterolobii</i>	24
Figura 6. Aspectos morfológicos de plantas de <i>Psidium</i> spp. tratadas com o <i>Meloidogyne enterolobii</i>	30
Figura 7. Fluxograma esquemático da metodologia utilizada.	37
Figura 8. Área foliar para <i>Psidium guajava</i> cv ‘Paluma’ e <i>Psidium friedrichstalianum</i> aos 26 DAI.	40
Figura 9. Raízes das amostras de <i>Psidium</i> spp. de acessos plantados por semente.	41
Figura 10. Cortes transversal e longitudinal das raízes das amostras de <i>Psidium guajava</i> cv ‘Paluma’ de acessos propagados por semente.	42
Figura 11. Atividade enzimática de catalase (CAT) nos tecidos foliares e radiculares aos 26 DAI.	44
Figura 12. Atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX) nos tecidos radiculares e foliares aos 26 DAI.	46
Figura 13. Atividade enzimática de peroxidase do guaiacol (POX) nos tecidos foliares e radiculares aos 26 DAI.	47
Figura 14. Interatoma de evidência das setenta e oito proteínas relacionadas ao estresse biótico em <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
Figura 15. Proteínas analisadas no interactoma e suas respectivas localizações subcelular.	56

ANEXO I

Tabela 1. Resultado da ANOVA da Área Foliar entre as espécies <i>Psidium guajava</i> cv ‘Paluma’ e <i>Psidium friedrichstalianum</i> aos 26 DAI.	73
--	----

Tabela 2. Comparação múltipla da Área Foliar entre os grupos na espécie <i>Psidium guajava</i> cv ‘Paluma’ e <i>Psidium friedrichstalianum</i> aos 26 DAI (método Student-Newman-Keuls).	73
--	----

Tabela 3. Resultado da ANOVA da Área Foliar entre a espécie <i>Psidium friedrichstalianum</i> aos 26 DAI.	73
---	----

Tabela 4. Comparação múltipla da Área Foliar entre os grupos na espécie <i>Psidium friedrichstalianum</i> aos 26 DAI (método Student-Newman-Keuls). DM – Diferença da média.	74
--	----

ANEXO II

Tabela 1. Determinação da concentração de proteínas solúveis totais de folhas de *Psidium* spp. pelo método de Bradford. 75

Tabela 2. Determinação da concentração de proteínas solúveis totais de raiz de *Psidium* spp. pelo método de Bradford. 75

ANEXO III

Tabela 1. Lista das proteínas utilizadas para a análise do interactoma em <i>A. thaliana</i> .	76
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Psidium</i> spp.	18
1.3 <i>Meloidogyne enterolobii</i>	22
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Coleta de material biológico.....	29
3.2 Determinação da Área Foliar (AF)	31
3.3 Análises morfológica, anatômica e histológica da raiz	31
3.4 Extração das proteínas solúveis totais	32
3.5 Ensaio enzimático	33
3.5.1 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT).....	33
3.5.2 Determinação da atividade para a enzima ascorbato peroxidase (APX)	33
3.5.3 Determinação para a atividade da enzima peroxidase de guaiacol (POX).....	34
3.6 Análises Estatísticas	34
3.7 Análise <i>in silico</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3.8 Resumo Metodológico.....	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Alterações Morfológicas: Área Foliar (AF)	38
4.2 Análises morfológica, anatômica e histológica da raiz	40
4.3 Ensaio Enzimáticos	43
4.3.1 Catalase (CAT).....	44
4.3.2 Ascorbato peroxidase (APX)	45
4.3.3 Peroxidase do guaiacol (POX).....	47
4.4 Análise <i>in silico</i>	48
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Psidium* spp.

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) (Figura 1) e o araçazeiro da Costa Rica (*Psidium friedrichstalianum*) são pertencentes à família Myrtaceae, a qual compreende aproximadamente 130 gêneros com cerca de 3.000 espécies. Essas apresentam uma distribuição geográfica em quase todas as regiões tropical e subtropical das Américas (GOVAERTS et al., 2008; AL-EDANY e AL-SAAD, 2012). Dentre as Myrtaceae, alguns gêneros apresentam uma importância econômica, como *Eugenia* [pitangueira (*E. uniflora* L.)], *Feijoa* [goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* Berg)], *Plinia* [jabuticabeira (*P. cauliflora*)] e *Psidium* (goiabeira e o araçazeiro, por exemplo) (PEREIRA e NACHTIGAL, 2003).

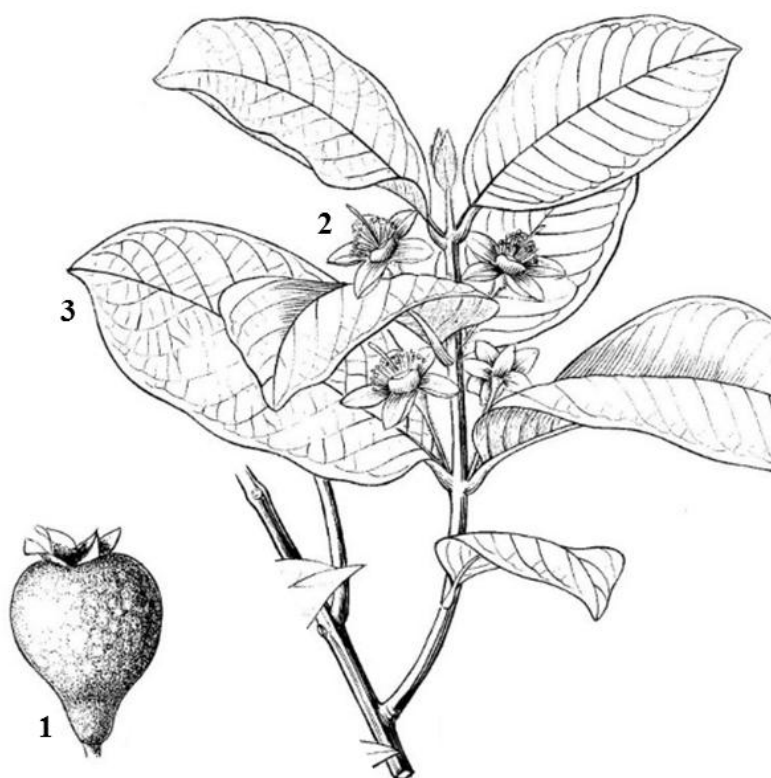


Figura 1. Ilustração de um ramo florífero da Goiabeira, *Psidium guajava* L. Aspecto geral do ramo florífero indicando o (1) fruto, a (2) flor e (3) folha. Fonte: Disponível e modificado de <http://www.efloras.org/>.

O gênero *Psidium* apresenta aproximadamente 150 espécies, observando maior destaque para *P. guajava* L, *P. cattleianum* Sabine e *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (PEREIRA, 1995). As plantas desse gênero são caracterizadas por

apresentarem porte pequeno a médio (3 – 6 metros de altura), com características tortuosas e esgalhadas e casca lisa e delgada. Essa se desprende em lâminas, frente ao processo de envelhecimento da planta (GONZAGA NETO e SOARES, 1995).

A goiabeira (*Psidium guajava* L.) é amplamente cultivada principalmente devido ao interesse por seus frutos comestíveis, ocupando lugar de destaque entre as frutas tropicais brasileiras por ter elevado valor nutritivo, por apresentar vitaminas A, B1, C, cálcio, fósforo, ferro e fibras solúveis (GOVAERTS et al., 2008). Seu consumo pode ser *in natura*, como também na indústria de processamento de sucos, néctares, doces, polpas, sorvetes, geleias, bem como serve de ingrediente na preparação de iogurtes, gelatinas e molho agri-doce (guatchup) (MANICA, 2000; SILVA et al., 2010).

O Brasil, juntamente com México, Paquistão, Índia, Egito, Venezuela, África do Sul, Jamaica, Quênia e Austrália, faz parte do grupo dos países de maior produção de goiaba (SATO et al., 2004). A presença de imensas áreas de clima e solo favoráveis faz do Brasil um pólo para a produção dessa frutífera, sendo esse aspecto importante, não apenas pelo valor nutritivo da fruta, mas também pela perspectiva que representa no incremento da produção agrícola, na ampliação da atividade industrial e no potencial de exportação (MANICA, 2000; SILVA et al., 2010).

O rendimento médio da produção (quilograma por hectare) de goiaba no Brasil (Figura 2), no período entre 2001 a 2014, demonstra como os produtores estão respondendo à demanda do mercado (IBGE, 2014). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2011), nos anos anteriores a 2011 as exportações brasileiras de frutas cresceram 25%. Mostrando que em 2006, o setor movimentou US\$ 700 milhões, número que chegou a mais de US\$ 875 milhões em 2010.

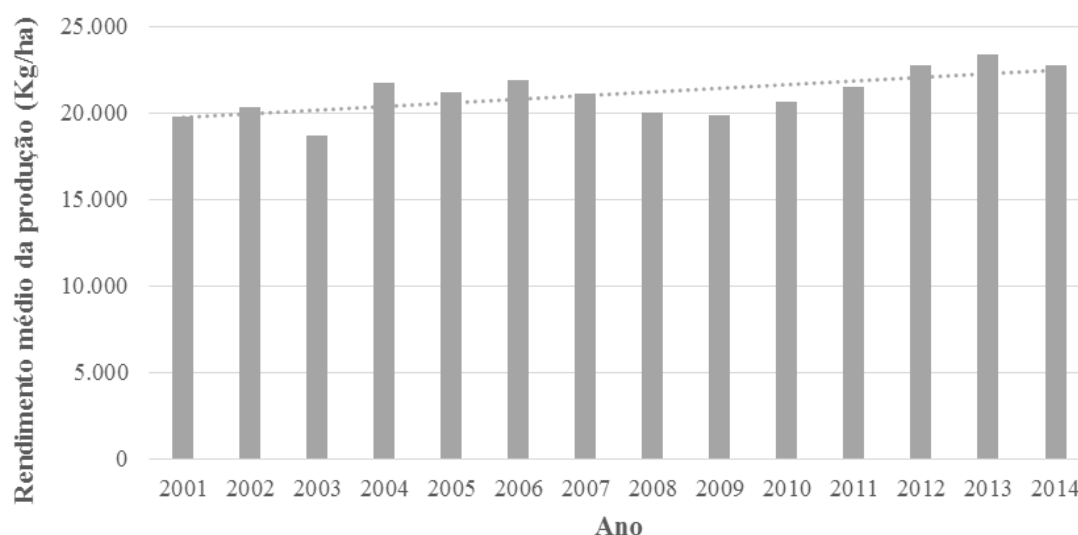


Figura 2. Histórico do rendimento médio da produção nacional de goiaba. Comparativo do rendimento da produção de goiaba no Brasil das safras de 2000/01 a 2013/14 da Série Rendimento médio da produção da lavoura permanente do IBGE. Fonte: Adaptado IBGE – Produção Agrícola Municipal.

A produção dessa fruta vem crescendo no Brasil nos últimos anos, tendo atingido 345.332 toneladas no ano de 2012 (AGRIANUAL, 2013), e, no ano de 2014 obteve um rendimento médio da produção de 22.699 Kg/ha (IBGE, 2014). Analisando a versatilidade em suas várias formas de aplicação (*in natura* e industrializada), a goiaba oferece, para o mercado interno, boas possibilidades de aumento de consumo. Como a exemplo da ocorrência de um aumento superior a 500% de sua comercialização nas principais CEASAs do País (São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte) (SILVA et al., 2010).

A goiabeira é cultivada em escala comercial em quase todas as regiões brasileiras, com destaque para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, na Região Sudeste; Bahia, Pernambuco e Paraíba, na Região Nordeste; Goiás, na Região Centro-Oeste e Rio Grande do Sul e Paraná, na Região Sul (POMER et al., 2006). Corroborando com o Histórico, dos anos de 2001 a 2014, do rendimento médio da produção de goiaba (Kg/ha) por região, observando que a produção agrícola dessa cultura se estende por todas as regiões do Brasil [Norte (10.550 Kg/ha), Sul (15.519 Kg/ha), Nordeste (20.214 Kg/ha), Sudeste (27.422 Kg/ha), Centro-Oeste (28.512 Kg/ha)] o qual foi obtido, para o ano de 2014 (Figura 3) (IBGE, 2014).

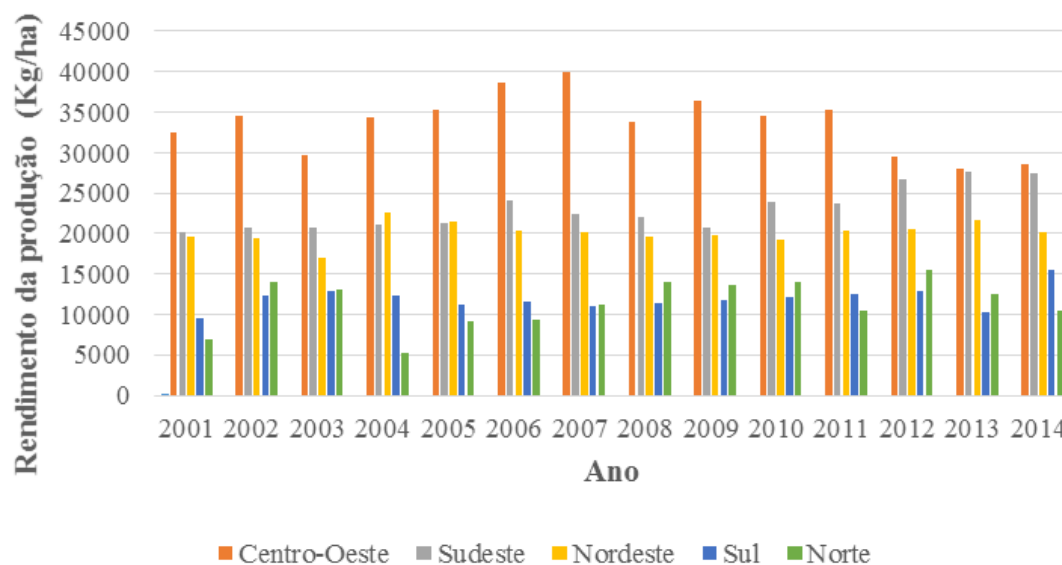


Figura 3. Histórico do rendimento médio da produção de goiaba por região. Comparativo do rendimento da produção de goiaba no Brasil das safras de 2000/01 a 2013/14 da Série Rendimento médio da produção da lavoura permanente do IBGE. Fonte: Adaptado IBGE – Produção Agrícola Municipal.

A produção do Agreste pernambucano, os cultivos irrigados do Submédio do Vale do São Francisco, juntamente com a produção paulista, destacam-se pelo volume comercializado (SILVA et al., 2010). Em 2014, dados da Produção Agrícola Municipal, em relação ao rendimento da produção de goiaba por Unidade Federativa (UF), mostrou que Goiás liderou com 34.277 Kg/ha, em seguida vieram São Paulo, com 30.129 Kg/ha, Distrito Federal, com 30.000 Kg/ha, Pernambuco, com 28.380 Kg/ha, Rio de Janeiro, com 25.320 Kg/ha, e, os demais Estados com rendimento inferior à 18.612 Kg/ha (Figura 4) (IBGE, 2014).

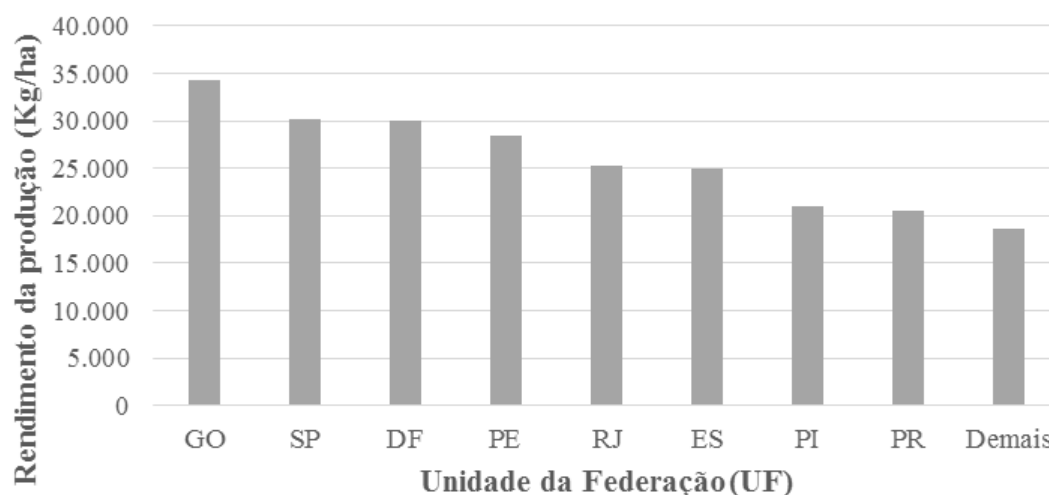


Figura 4. Histórico do rendimento médio da produção de goiaba por Unidade Federativa no ano de 2014. Comparativo do rendimento da produção de goiaba nos estados brasileiros das safras de 2013/14 da Série Rendimento médio da produção da lavoura permanente do IBGE. Fonte: Adaptado IBGE – Produção Agrícola Municipal.

Na região nordeste o rendimento médio da produção de goiaba no ano de 2014 foi de 20.214Kg/ha (IBGE, 2014). Embora a área total em produção no país tenha aumentado 45% de 1999 a 2004, no Nordeste do Brasil, esse aumento foi de 90% onde a goiaba é produzida sob irrigação e com tecnologia intensiva. Um dos fatores para notável variação na produção se deve ao uso de variedades melhoradas, as quais desempenham papel muito importante para estabelecer novos pomares como, por exemplo, a ‘Paluma’ (POMER et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Apesar do aumento da produção de goiaba na região Nordeste, observou-se que do ano de 2012 a 2014 houve uma queda na produção dessa frutífera devida a ação de nematoide no Estado de Pernambuco (IBGE, 2012; IBGE, 2014). Alguns trabalhos ressaltam que o nematoide *Meloidogyne enterolobii* pode ser um dos fatores limitantes na produção de goiaba comercial prejudicando-a e inviabilizando várias áreas de cultivo (EL BORAI e DUNCAN, 2005; FLORI e CASTRO, 2009). De acordo com Pereira e colaboradores (2009), este nematoide infecta mais de 5.000 ha, ou seja, cerca de um terço da área de produção de goiaba no Brasil.

1.3 *Meloidogyne enterolobii*

Meloidogyne enterolobii é um parasita obrigatório que infecta órgãos subterrâneos da planta. A figura 5 apresenta uma representação esquemática do ciclo de vida desse nematoide. Nela podemos observar que a fêmea madura deposita no interior

da raiz os ovos maduros produzidos pelas glândulas retais (BIRD e ROGERS, 1965) (Figura 5a). Dando continuidade, observamos que no interior do ovo, o processo da embriogênese leva ao desenvolvimento das formas juvenis de primeiro estágio (J1), que sofrem ecdise e se desenvolvem em juvenis de segundo estágio (J2). Esse representa a forma infectiva que eclode do ovo (ELLING, 2013) (Figura 5b).

Prosseguindo, nas etapas B-C da figura 5, verifica que sob condições favoráveis, as quais são ditados essencialmente pela umidade e temperatura, o nematoide de segundo estágio (J2) vai para o solo ou infecta outras plantas hospedeiras, sendo atraído por exsudados radiculares (GOODELL e FERRIS, 1989) (Figura 5c). O estágio J2 normalmente penetra nas raízes na região de alongamento da raiz ou nos locais de ramificação da raiz e com isso a migração intercelular pode ocorrer por meio da região do córtex. Para facilitar a penetração na raiz, o estágio J2 do nematoide utiliza uma combinação de ações, como: danos físicos promovidos por meio do estilete, assim como a degradação da parede celular utilizando enzimas celulolíticas e pectolíticas, produzidas nas células da glândula esofágica (HEWEZI e BAUM, 2013) (Figura 5c).

Quando este nematoide atinge a região da endoderme, que representa uma barreira impenetrável para o estágio J2, esse migra primeiramente para a ponta da raiz até que atinja a região meristemática e, em seguida, volta para dentro do cilindro vascular em direção à zona de diferenciação. Por último, o estágio J2 se torna sedentário e com isso, induz mudanças significativas no tecido do hospedeiro (WYSS et al., 1992). Dentre essas mudanças, as células vegetais são transformadas em células gigantes, formando assim um local de alimentação permanente do nematoide e, única fonte de nutrição para o restante do seu ciclo de vida (ELLING, 2013) (Figura 5d). Ocasionalmente assim, como sintomatologia, a formação de galhas em locais de alimentação, a qual podemos visualizar na região central da figura 5.

Analisando a região superior da figura 5e, verifica-se que depois que o local de alimentação foi estabelecido, ocorre um aumento de tamanho, em que o estágio J2 passa por mudas subsequentes em juvenis de terceiro e quarto estágios (J3 e J4). Após a quarta ecdise, os machos adultos recuperam a sua motilidade e são capazes de deixar a raiz, enquanto que as fêmeas permanecem sedentárias (ELLING, 2013).

A fêmea vermiforme é móvel em sua fase juvenil, torna-se globosa e imóvel, quando adulta (Figura 5e). Ao atingir a maturidade plena, produz uma massa gelatinosa, dentro da qual deposita de 500 a 2.000 ovos (Figura 5f). Esse ciclo de vida dura, em

média, de 22 a 30 dias, sendo diretamente influenciado pela temperatura (25 - 32°C) e umidade (40 – 60%) (FERRAZ, 2001).

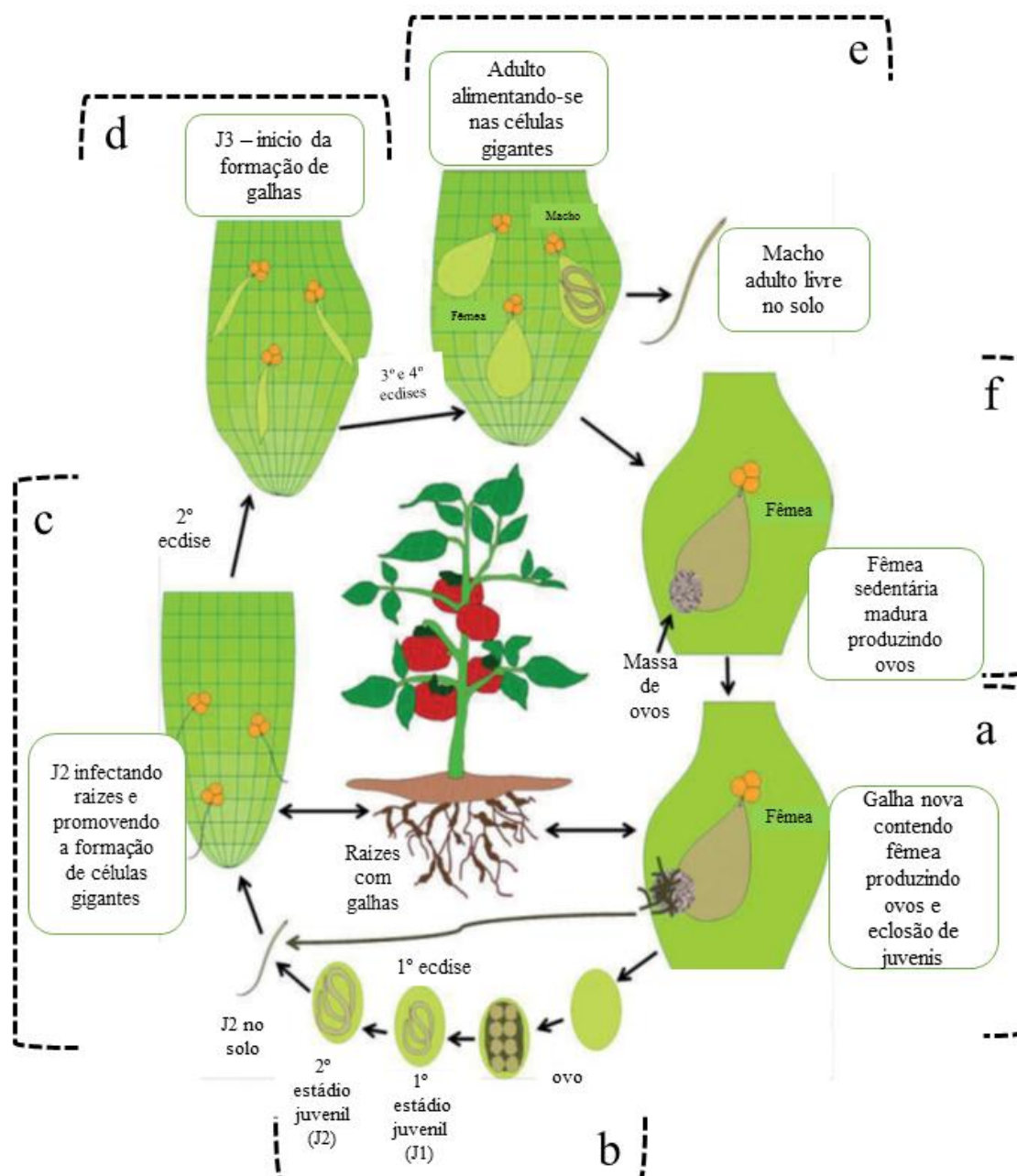


Figura 5. Representação esquemática do ciclo de vida do *Meloidogyne enterolobii*. O ciclo de vida do fitonematoide com duas fases e seis estádios. Fase no solo: ovo, primeiro estágio (J1), segundo estágio (J2) forma infectante, etapa B; Fase no hospedeiro: terceiro estágio (J3), quarto estágio (J4), fêmea (sedentária) e macho (migrante), etapas D, E, F e A, E, respectivamente. Fonte: Adaptado de AGRIOS, 2005; PAES et al., 2012; PINHEIRO et al., 2014.

O *M. enterolobii* apresenta atividade reprodutiva durante todo o ano em climas quentes e solos úmidos, porém em climas mais frios o ciclo de vida é mais longo. O

estádio de ovo é considerado o estágio de sobrevivência para os nematoides, podendo este permanecer no solo com umidade adequada ou entrar em estado de dormência em condições desfavoráveis, principalmente quando o solo estiver seco ou não apresentar plantas hospedeiras (PINHEIRO et al., 2014).

Esta espécie de nematoide possui um relato inicial na China (em 1983), tendo sido, então em 1988, confundido com outra espécie descrita como *M. mayaguensis*, em Porto Rico (BLOK et al., 2002). No entanto, no ano de 2009, foi aplicada a sinonimização entre ambas e o nome *M. enterolobii* prevaleceu como válido (KIEWNICK et al., 2009).

Existem relatos na literatura sobre a presença desta espécie de fitonematoide em vários países africanos, China, Vietnã, Estados Unidos da América, Américas Central e do Sul, França e Suíça. Inicialmente, pensava-se que *M. enterolobii* era restrito às áreas tropicais. Porém, relatórios apontaram que este não é o caso. Na verdade, o seu estabelecimento na região do Mediterrâneo e em outras áreas subtropicais parece provável (CASTAGNONE-SERENO, 2012) e, devido a isto, agências reguladoras designaram *M. enterolobii* como um patógeno de quarentena (ELLING, 2013).

Este nematoide apresenta uma ampla gama de hospedeiros comparável à de *M. incognita*, incluindo muitas espécies como: tomate, berinjela, pimenta, pimentão, brócolis, abóbora, aipo, batata, batata-doce, feijão, fumo, melancia, beterraba, soja, café, acerola, goiaba, algumas espécies ornamentais e em plantas daninhas (YANG e EISENBACK, 1983; RICH et al., 2008; HUMPHREYS et al., 2012; ELLING, 2013).

Considerando o problema representado pelo *M. enterolobii*, diferentes abordagens moleculares têm sido utilizadas para a identificação e o isolamento de vários genes importantes no processo de infecção expressos, especificamente, nas células das glândulas esofágicas de fitonematoides sedentários. A partir desses dados foi proposto a existência de um arsenal de diferentes proteínas secretadas no processo de parasitismo do nematoide, que podem ter efeitos diretos sobre as células da planta hospedeira (DAVIS et al., 2004).

Estas proteínas secretadas pelo nematoide induzem modificações na parede das células do hospedeiro, facilitando assim sua infecção na planta hospedeira. Assim como, a introdução direta de proteínas em células hospedeiras que podem influenciar o metabolismo celular, o ciclo celular, degradação seletiva da proteína, uma resposta de defesa localizada e atividade reguladora do núcleo da célula do hospedeiro (DAVIS et al., 2004). Essas proteínas da secreção, direta ou indiretamente, modificam as células

vegetais para a formação do sítio de alimentação, em nematoides formadores de galha, ou sincício, em nematoides formadores de cisto (FRAGOSO et al., 2007; LOPES, 2009).

Desta forma, tem sido observado que as plantas infectadas pelo nematoide apresentam várias modificações como, por exemplo, nas raízes, tornando-as comprometidas quanto suas funções de absorção, translocação de nutrientes e sais minerais. A infecção também pode tornar as plantas mais susceptíveis às condições de estresse abiótico como falta de água, bem como a doenças promovidas por outros organismos como fungos e bactérias. Além disso, estas plantas podem não responder adequadamente às práticas agronômicas de adubação (MOURA et al., 2008).

Considerando o impacto destas modificações para a agricultura, várias linhas de pesquisa vêm sendo desenvolvidas nesta área e, os resultados obtidos, mostram que o processo de resistência de algumas plantas envolve uma rede intrínseca de sinais, cujos componentes ainda não são totalmente conhecidos (PINTO et al., 2011). Dentre os mecanismos de defesa das plantas contra a infecção por patógenos, destacam-se os genes naturais de resistência (genes *R*) (ELVIRA et al., 2008). Estes conferem resistência a um patógeno específico, por meio de um mecanismo que envolve a interação entre genes da planta-hospedeiro e do patógeno (FLOR, 1971; HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996).

Estudos moleculares têm discutido o papel de alguns genes relacionados a resistência a nematoides em raízes (CHEN et al., 2007; TIRUMALARAJUA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2014). Chen e colaboradores (2007), isolaram o gene *CaMi*, responsável pela resistência a *M. incognita*, a partir de DNA genômico de pimentão e transformaram geneticamente plantas de tomate com o mesmo. Os genes *CaMi* apresentam oito alelos (*Mi1* a *Mi8*), sendo que o alelo *Mi1* é o mais usado nos cruzamentos com cultivares comerciais de *Solanum lycopersicum* (PINHEIRO et al., 2014). Os tomateiros transgênicos tornaram-se resistentes a *M. incognita* após a inserção desta sequência gênica de pimentão. Tirumalarajua et al. (2011), por meio de uma triagem de 960 clones de uma biblioteca subtrativa, identificaram 140 clones apresentando uma elevada taxa de expressão em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*) resistentes a *M. arenaria* em estádios iniciais de desenvolvimento.

Estes resultados moleculares mostram que apesar da descoberta de alguns genes associados a resposta da planta ao estresse biótico, ainda não se tem total conhecimento de quais vias e suas possíveis interações estariam associadas a esse processo. Sendo

assim, este trabalho está incorporado em um trabalho mais amplo que pretende identificar possíveis genes cuja expressão seja modificada frente a infecção de plantas de *Psidium* spp. pelo nematoide *M. enterolobii*. Com isso, este trabalho se propôs em avaliar as alterações morfológicas e de algumas enzimas associadas a resposta de estresse oxidativo de plantas *Psidium* spp. Assim, como também de realizar um estudo *in silico* de interactoma, a partir de informações depositadas em banco de dados de domínio público com a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, com o intuito de identificar genes/proteínas que possam ser utilizados como marcadores ao processo de resposta ao estresse biótico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar as possíveis alterações morfológicas e enzimáticas, para entender os danos do estresse ocasionado aos 26 dias após a infecção (DAI), em plantas de *Psidium* spp. quando infectadas pelo nematoide *M. enterolobii*.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar as modificações na área foliar de *Psidium* spp. quando submetido à infecção por *M. enterolobii*;
2. Avaliar as possíveis alterações histológicas nos tecidos das raízes de *Psidium* spp. submetidos à infecção por *M. enterolobii*.
3. Analisar a atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos radiculares e foliares: catalase, ascorbato peroxidase, peroxidase do guaiacol;
4. Realizar uma pesquisa *in silico* de sequências de microarranjo contidas no banco de dados do NCBI relacionadas com a resistência a estresse biótico na planta modelo *Arabidopsis thaliana* e, a partir dos dados obtidos, montar um potencial interactoma que possa fornecer informações que poderão ser utilizadas para compreender o processo de infecção pelo nematoide.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material biológico

Indivíduos de *Psidium* spp. ao completarem quarenta dias após plantio em casa de vegetação, foram submetidos à inoculação do nematoide *Meloidogyne enterolobii* (6.000 ovos/juvenil) e, aos 26 dias após a infecção (DAI), foram coletadas folhas e raízes para as avaliações morfológicas e bioquímicas. Os tratamentos foram conduzidos na Embrapa Semiárido – Petrolina/PE, no período de junho de 2014.

Para este experimento foi utilizado o método por germinação de semente, em que foram utilizadas duas espécies, Araçazeiro da Costa Rica (*Psidium friedrichstalianum*) e cv ‘Paluma’ (*Psidium guajava*) (Tabela 1 e Figura 6).

Tabela 1. Relação do material de *Psidium* spp. Avaliação morfológica e enzimática de plantas de *Psidium* spp. infectadas com *Meloidogyne enterolobii*.

Nome comum	Nome científico	Relação com o <i>Meloidogyne enterolobii</i>
Araçazeiro da Costa Rica	<i>Psidium friedrichstalianum</i>	Resistente
cv ‘Paluma’	<i>Psidium guajava</i>	Susceptível



Figura 6. Aspectos morfológicos de plantas de *Psidium* spp. tratadas com o *Meloidogyne enterolobii*. Acessos de Araçazeiro da Costa Rica (*Psidium friedrichstalianum*) não submetido à infecção do nematoide *Meloidogyne enterolobii* (a) e submetido à infecção (b). Acessos da cv ‘Paluma’ (*Psidium guajava*) não submetidas à infecção do nematoide *Meloidogyne enterolobii* (c) e submetidas à infecção (d). Seta = Quarta folha coletada para determinação da área foliar. Barra = 1 cm.

Após a separação das amostras (cv ‘Paluma’ e Araçazeiro da Costa Rica), as mesmas foram cuidadosamente lavadas com água corrente para retirada do substrato das raízes e colocadas em um recipiente devidamente limpo com papel toalha umedecido para reduzir o estresse mecânico. Para cada tratamento foram selecionados onze

exemplares divididos para extração de RNA, análises morfológica, histológica e enzimáticas.

Posteriormente, as amostras foram colocadas em garrafas térmicas com nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer -80°C. No dia seguinte, as mesmas foram alocadas em isopor com gelo químico e nitrogênio líquido para serem transportadas da Embrapa Semiárido (Petrolina – PE) para o Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN/Natal – RN), onde foram armazenadas em freezer a -80°C, para realização das análises seguintes.

3.2 Determinação da Área Foliar (AF)

No momento da coleta, foram mensuradas com paquímetro digital, as larguras e comprimentos de limbos foliares dos acessos de *P. guajava* e *P. friedrichstalianum*, em que foi utilizada a quarta folha (n = 3), porque a mesma encontrava-se totalmente expandida. A escolha da folha foi feita da base para o ápice de cada planta, para os tratamentos Controle e Inoculado (Figura 6).

O modelo adotado para estimar a área foliar deste trabalho, foi o modelo proposto por Zucoloto et al. (2006):

$$AF = 1,2312 + (0,7829 * C * L)$$

Onde:

AF – Representa a estimativa da área foliar (em cm²).

C – Representa o comprimento ao longo da nervura principal da folha (em cm).

L – Representa a largura máxima do limbo foliar (em cm).

3.3 Análises morfológica, anatômica e histológica da raiz

Análises anatômicas foram realizadas em raízes dos acessos de cv ‘Paluma’ (*P. guajava* L.) das plantas pertencentes aos tratamentos propagados por semente (controle e inoculado). Foram utilizados cinco acessos de cada tratamento para as análises. Na etapa de coleta do material vegetal na Embrapa Semiárido, as amostras foram fixadas em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70% (v/v) – 1:1:18) por

um período de 48 horas e, decorrido este tempo, a solução foi substituída por álcool 70% (v/v), na UFRN.

As secções anatômicas transversais e longitudinais foram realizadas na região da galha (no tratamento inoculado) e na raiz principal (no tratamento controle). Esses materiais foram seccionados à mão livre com o auxílio de lamina de aço inoxidável. A coloração semipermanente foi realizada de acordo com Kraus e Arduin (1997). As secções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v), por aproximadamente 2 min, seguindo de três lavagens com água destilada, por aproximadamente 2 min. Com o objetivo de identificar regiões de maior dano celular causados pelo *M. enterolobii* após as etapas de clarificação as secções foram coradas com safrablau (azul de Alcian 1% (p/v), o qual cora a parede primária, e safranina 1% (p/v), a qual cora a parede secundária), por 5 min e lavados rapidamente em álcool 70% (v/v) acidificado, e em seguida, em álcool 99% (v/v), para retirada do excesso do corante. Sendo, posteriormente, colocados em água destilada para posterior montagem das lâminas.

As lâminas, de caráter semipermanente, foram montadas em lamínulas com glicerina. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Investigação de Matrízes Vegetais Energéticas, do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia (DBEZ) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

As análises das lâminas histológicas foram realizadas em microscopia de campo claro, utilizando um Microscópio reto *ZeissImager A.2* de fluorescência e as fotografias foram feitas com auxílio do software *Zen2011* (*ZeissExaminer Z.1*), no Laboratório de Microscopia do Instituto do Cérebro da UFRN.

3.4 Extração das proteínas solúveis totais

Para a extração das proteínas solúveis totais de folhas e raízes, cerca de 250 mg de massa fresca de amostras previamente coletadas e armazenadas a -80°C foram pulverizadas com nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. A este pó foi adicionado 1,2 mL do tampão de extração (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM). Este material foi transferido para tubos de 2,0 mL, o qual permaneceu em banho de gelo até a centrifugação a 14000 *g* por 20 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. A quantificação das proteínas solúveis totais foi feita pelo método de Bradford (1976) (Tabelas 1 e 2 em Anexo II).

3.5 Ensaios enzimático

Amostras de folhas e raízes de plantas dos tratamentos controle e as submetidas à infecção por *Meloidogyne enterolobii*, foram analisadas quanto a atividade das enzimas associadas ao estresse oxidativo: catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), e determinação da atividade de peroxidase do guaiacol (POX). Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicatas biológicas.

3.5.1 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada conforme o princípio de reação do método descrito por Havie e Mchale (1987). As medidas deste ensaio foram realizadas em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}$ de proteína de massa fresca, onde foi utilizado o tampão fosfato (Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 a 30°C) contendo peróxido de hidrogênio 20 mM. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro DR 5000 UV/VIS, HACH, onde foi utilizada cubetas de quartzo, no comprimento de onda de 240 nm. Antes da leitura das amostras, o equipamento foi zerado com 2,95 mL de tampão de atividade da enzima CAT (tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 a 30°C) sem H_2O_2 e 50 μL tampão de extração de proteína (tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM). Em seguida, foi realizada a leitura do branco com 2,95 mL de tampão de atividade da enzima CAT com peróxido de hidrogênio 20 mM e 50 μL de tampão de extração de proteína. Após as leituras dos controles, foi realizada a leitura da atividade enzimática das amostras de raiz e folha de *Psidium* spp. Onde, foi utilizado 2,95 mL de tampão de atividade da enzima CAT com peróxido de hidrogênio 20 mM e 50 μL da amostra. Para cada leitura da amostra foi acompanhado o decaimento da absorbância durante 5 min, a cada 30 s no espectrofotômetro a 240 nm para estimar a atividade da enzima. As leituras foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), na UFRN.

3.5.2 Determinação da atividade para a enzima ascorbato peroxidase (APX)

A determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi realizada conforme o princípio de reação do método descrito por Nakano e Asada (1981). As medidas da atividade da enzima APX foram realizadas em AsA/mg de proteína de massa fresca. A princípio, foi preparado o tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,5 mM e uma solução de peróxido de

hidrogênio 30 mM. As leituras foram realizadas com comprimento de onda de 290 nm utilizando espectrofotômetro DR 5000 UV/VIS, HACH, no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), na UFRN.

Inicialmente, foi adicionado 100 µL de tampão de extração enzimática (tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM), 2,7 mL de tampão de ensaio de APX com ascorbato 0,5 mM e 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 mM para fazer um branco do reagente. Em seguida, foram adicionados 100 µL de amostra (extrato bruto) e 2,9 mL de tampão de ensaio da enzima APX sem ascorbato, tendo-se, pois, um branco da amostra. Por fim, foi realizada a leitura da atividade enzimática, adicionando 100 µL de amostra (extrato bruto), 2,7 mL de tampão de ensaio da enzima APX com ascorbato e 200 µL de peróxido de hidrogênio 30 mM.

3.5.3 Determinação para a atividade da enzima peroxidase de guaiacol (POX)

A determinação da atividade de enzima peroxidase de guaiacol (POX) foi realizada conforme o princípio de reação do método descrito por Kar e Mishra (1976). As medidas da atividade da enzima POX foram realizadas em UA/mg de Proteína/min de massa fresca. Para esse ensaio, foi utilizado o tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de guaiacol e 20 mM de peróxido de hidrogênio. As leituras foram realizadas com comprimento de onda de 420 nm, utilizando espectrofotômetro DR 5000 UV/VIS, HACH, no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), na UFRN.

Inicialmente, alíquotas de 11,1 µL do extrato de proteínas solúveis totais (tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM) foram transferidas para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 2,7 mL do tampão. Em seguida, foi realizada a incubação a 25 °C, durante 60 s, e interrompida a reação pela adição de 0,27 mL de 0,5 % de solução ácido sulfúrico (v/v).

3.6 Análises Estatísticas

Com as estimativas de área foliar (AF), foram realizadas análises de variância, separadamente para a área foliar, considerando as variáveis explanatórias: espécies e tratamento com inoculação.

Para os dados obtidos com os ensaios enzimáticos, foram realizadas análises de variância, separadamente para CAT, APX e POX nos casos de proteínas isoladas de

folha e raiz, considerando as variáveis explanatórias: Espécie, Método de Propagação e Tratamento com Inoculação.

Os resultados foram testados quanto a sua normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965) e pelo teste de homogeneidade de variância de Levene (SOKAL & ROHLF, 1985). Nos casos de parametricidade, os resultados foram reportados como média e desvio padrão. Não havendo parametricidade, os resultados foram reportados como mediana e erro padrão. Nos casos de diferença estatística significativa nos resultados a priori, os testes de *Student-Newman-Keuls* (para área foliar) e de Tukey (para os ensaios enzimáticos) foram utilizados para investigar as diferenças a posteriori (ZAR, 2010). Para determinação de diferença considerada estatisticamente significativa foi utilizado o valor de $p < 0,05$.

Todos os testes de premissas e análises foram realizados no software R v.2.15 (R Development Core Team, 2012) utilizando os pacotes estatísticos ‘stats’ (Teste de Shapiro-Wilk, ANOVA; R Development Core Team, 2012) e ‘car’ (Teste de Levene; FOX & WEISBERG, 2011).

3.7 Análise *in silico* em *Arabidopsis thaliana*

Com a finalidade de averiguar quais proteínas poderiam estar envolvidas com a resposta de defesa planta-parasita em goiabeira, foi realizada uma pesquisa *in silico* de sequências de microarranjo relacionadas com a resistência ao estresse biótico em *Arabidopsis thaliana*. A escolha da pesquisa *in silico* com *Arabidopsis thaliana* foi feita, por esta se tratar da planta modelo em dicotiledôneas e por conter muitas informações depositadas em bancos de dados público de microarranjo.

Para isso, primeiramente, foram exploradas diferentes ferramentas disponíveis no banco de dados online NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), onde foi utilizada a ferramenta *GEO Profiles* (www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/) as palavras-chave ‘Resistance AND *Arabidopsis thaliana*’. Para selecionar as sequências de microarray, foi aplicado um limite de corte (*Cut off*) de 50%. O *Cut off* determina a probabilidade de associação dos genes encontrados com as palavras-chaves sugeridas. Posteriormente, com os genes e as sequências das proteínas anotadas, foi feita uma busca no TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) para complementar as informações sobre cada uma das proteínas escolhidas, e BAR (*The Bio-Analytic Resource for Plant Biology*) (<http://bar.utoronto.ca/>) para verificar a localização subcelular dessas proteínas. O uso da interface *Cell eFP Browser* em *Arabidopsis eFP Browsers* da

plataforma BAR nos fornece o nível de confiança que varia de zero a um, em que quanto mais próximo de um, maior a confiabilidade da expressão da proteína no determinado local da célula. Em seguida, foi feito o uso da ferramenta *online* STRING 10.0 (<http://string-db.org/>) para construção do interactoma (SZKLARCZYK et al., 2015) e compreensão das possíveis vias envolvidas nos processos de resposta planta-parasita em *A. thaliana*.

3.8 Resumo Metodológico

A metodologia utilizada nesse trabalho, como pode ser observado na figura 7, dividiu-se em duas etapas, sendo a primeira delas a etapa *in situ*, nomeada por ‘Estresse biótico em *Psidium* spp.’, onde foram utilizadas três abordagens: Área Foliar, Histologia e Ensaio enzimáticos. A segunda etapa foi a desenvolvida *in silico*, nomeada ‘*Arabidopsis thaliana*’, na qual foram utilizadas abordagens na busca em bancos de dados de domínio público de genes/proteínas que podem estar envolvidas com a resposta ao estresse biótico. Nesta abordagem foram utilizadas plataformas BAR e TAR para complementar as informações obtidas no NCBI. Com as informações obtidas *in silico*, o programa *on line* STRING 10.0 foi utilizado para construção e análise de interactomas. Os dados obtidos nas abordagens *in situ* e *in silico* servirão para auxiliar na identificação de possíveis genes cuja expressão seja modificada frente a infecção de plantas de *Psidium* spp. pelo nematoide (*M. enterolobii*).

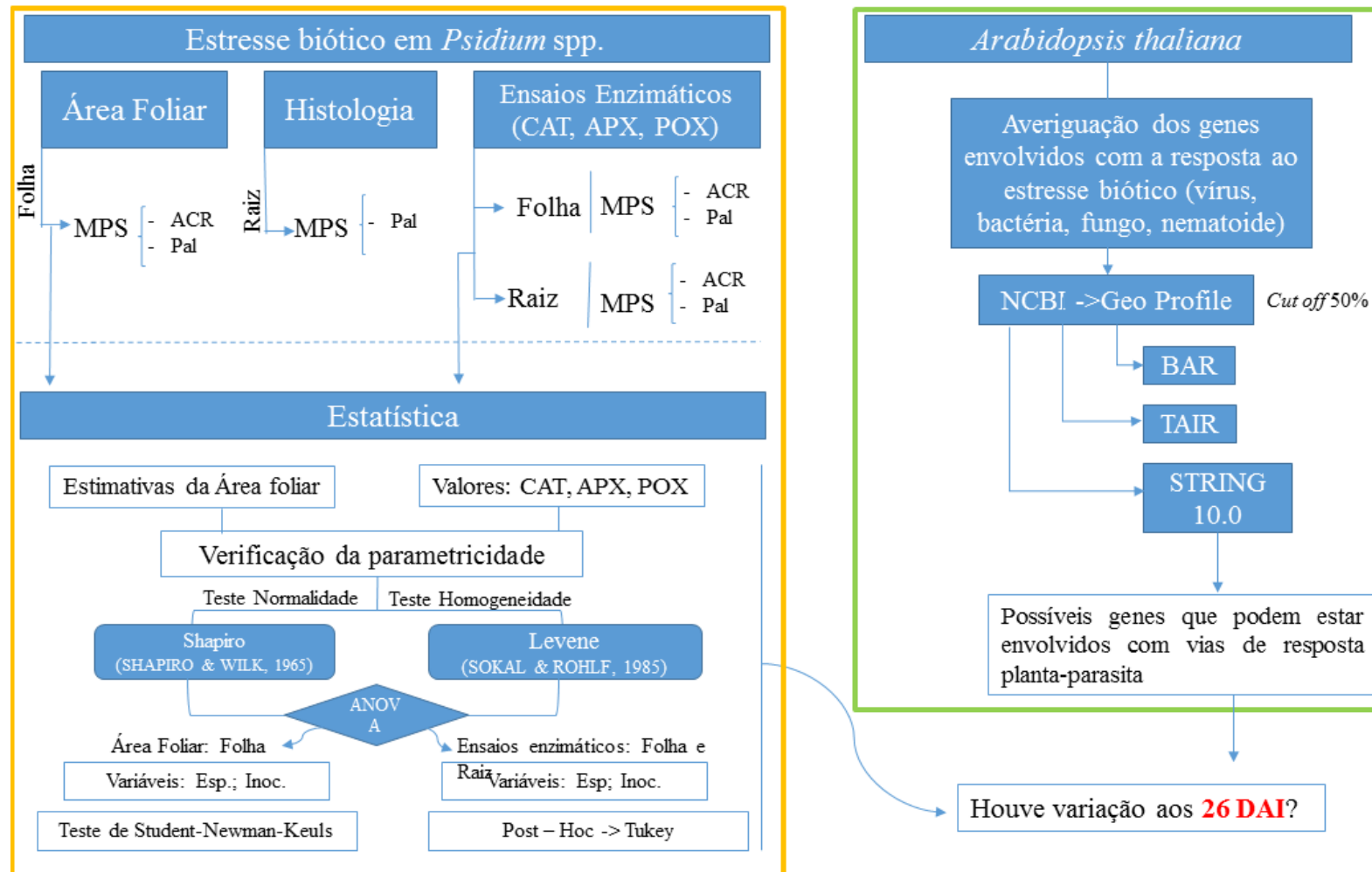


Figura 7. Fluxograma esquemático da metodologia utilizada. A metodologia divide-se em duas etapas: *in situ* nomeada por 'Estresse biótico em *Psidium* spp.', e *in silico* nomeada por '*Arabidopsis thaliana*'. MPS = Método de Propagação por Semente; ACR = Araçazeiro da Costa Rica; Pal = cv 'Paluma'; Hib = Híbrido Carlos Antônio; CAT = Catalase; APX = Ascorbato peroxidase; POX = Peroxidase do guaiacol; Esp. = espécie; Inc. = inoculação.

4 RESULTADOS

4.1 Alterações Morfológicas: Área Foliar (AF)

Para averiguar as possíveis alterações promovidas do estresse biótico ocasionado pela infecção com o nematoide de galha em plantas de *Psidium* spp., aos 26 DAI, foi realizado análise da área foliar (AF) para os tratamentos Controle e Inoculado. Considerando para esta análise a quarta folha da base para o ápice, porque a mesma encontrava-se totalmente expandida.

Podemos observar na tabela 2, para a espécie *P. guajava* cv ‘Paluma’, que no grupo do tratamento Inoculado, as aferições para comprimento e largura apresentaram-se maior, em relação ao grupo controle. Já para a espécie araçazeiro da Costa Rica (*P. friedrichstalianum*), o comprimento das folhas para o tratamento inoculado apresentou uma diminuição, quando comparado com o controle. Demonstrando assim, que o estresse acometido pelo fitonematoide aos 26 DAI, gerou um déficit no crescimento foliar para a espécie araçazeiro da Costa Rica.

Ao aplicar o modelo de área foliar proposto por Zucoloto et al. (2006), foi verificado que a média AF do grupo inoculado ($AF = 12,84 \text{ cm}^2$) da espécie *P. guajava* cv ‘Paluma’ foi maior que a média de AF do grupo controle ($AF = 10,36 \text{ cm}^2$), apresentando um aumento de 19,31%. Já para a espécie araçazeiro da Costa Rica (*P. friedrichstalianum*), foi verificado uma menor área foliar nas amostras do grupo infectados por *M. enterolobii* ($AF = 4,19 \text{ cm}^2$), enquanto as amostras do grupo controle apresentaram a maior área foliar ($AF = 4,93 \text{ cm}^2$), representando uma diminuição em 15,01% (Tabela 2) (Figura 8). Ao analisar estatisticamente foi observado diferença significativa entre todos os grupos (Espécie x Nematóide x Área Foliar) e em todas as comparações no pós-teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$) (Tabela 2 no ANEXO I) (Figura 8).

Tabela 2. Relação esquemática e aferição das medidas da área foliar (AF) aos 26 DAI. Aferição do comprimento (mm) e da largura (mm) das folhas coletadas, das espécies *P. guajava* cv ‘Paluma’ e, *P. friedrichstalianum*, não inoculadas (controle) e inoculadas com *M. enterolobii*, para estimar a área foliar (cm²).

Folha	Espécie	<i>Meloidogyne enterolobii</i>	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Área Foliar* (cm ²)	Média de Área Foliar (cm ²)
1	<i>Psidium guajava</i> L.	Controle	52,6	22,1	10,33	10,36
2			52,7	21,9	10,27	
3			52,9	22,3	10,47	
1	<i>Psidium guajava</i> L.	Inoculado	53,5	27,3	12,67	12,84
2			55,9	27,1	13,09	
3			54,2	27,2	12,77	
1	<i>Psidium friedrichstalianum</i>	Controle	38,5	12,8	5,09	4,93
2			37,8	11,7	4,69	
3			38,4	12,6	5,02	
1	<i>Psidium friedrichstalianum</i>	Inoculado	31,2	12,2	4,21	4,19
2			31,1	12,1	4,18	
3			31,2	12,1	4,19	

*Área foliar estimada a partir do modelo proposto por Zucoloto et al. (2006).

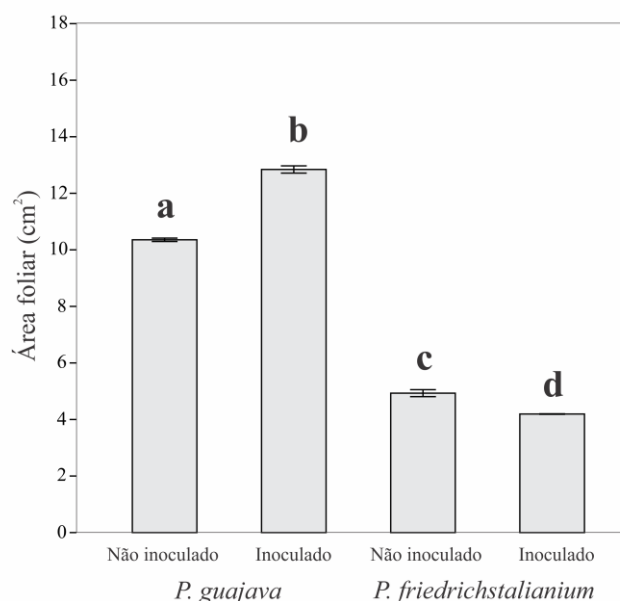


Figura 8. Área foliar para *Psidium guajava* cv ‘Paluma’ e *Psidium friedrichstalianum* aos 26 DAI. Comparação entre as espécies, grupos infectados e não infectados aos 26 DAI. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

4.2 Análises morfológica, anatômica e histológica da raiz

Sabendo que uma das principais sintomatologias da infecção por *M. enterolobii* é a formação de galha, buscou-se entender o comportamento de plantas de *P. guajava* cv ‘Paluma’ frente ao estresse biótico, aos 26 DAI. Para isso, foram realizadas análises morfológica e histológica do tecido radicular de plantas dos tratamentos inoculado e não inoculado (controle) com *M. enterolobii*, para averiguação de possíveis alterações estruturais decorrentes do estresse proposto.

Desse modo, ao analisar morfológicamente essas raízes, foi possível observar, qualitativamente, a presença de galhas no tratamento inoculado (Figura 9b), quando comparadas com às plantas do tratamento controle (Figura 9a). Pôde-se observar também, que a presença das galhas aos 26 DAI ocasionou a diminuição da área radicular das plantas, quando comparada com as plantas controle (Figuras 9). Estas galhas estão apresentadas em destaque pelas setas na figura 9b.

Com o intuito de avaliar os possíveis danos decorrentes da infecção do nematoide, foi feita uma análise histológica comparativa dos tecidos das raízes de plantas não inoculadas e inoculadas pelo *M. enterolobii*, como apresentado na Figura 10.

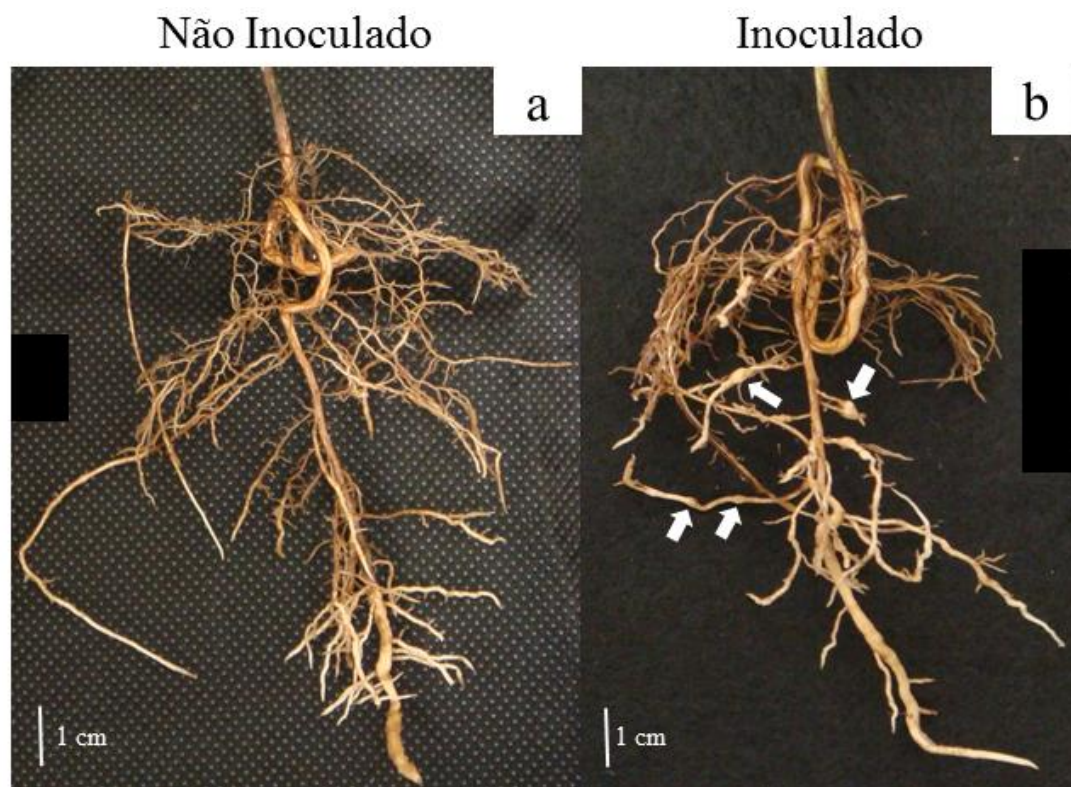


Figura 9. Raízes das amostras de *Psidium* spp. de acessos plantados por semente. (a) Acessos de *P. guajava* cv ‘Paluma’ não submetidos (controle) à infecção do nematoide *M. enterolobii*. (b) e submetidas à infecção do nematoide *M. enterolobii*; as setas brancas indicam as galhas cujo desenvolvimento foi ocasionado pela presença do parasita aos 26 DAI. Barra = 1 cm.

Ao analisar histologicamente a organização morfológica das raízes (em corte transversal e longitudinal) dos acessos de goiabeira não submetidos à inoculação do *M. enterolobii* (controle) (Figuras 10a, 10b, 10c), constatamos, na direção da região externa para a região interna da raiz, pelo radicular (Pr) (Figuras 10c), epiderme (Ep) (Figuras 10a, 10c), com células de tamanhos regulares e uniestratificadas, caracterizando-se por estarem perfeitamente justapostas. Posteriormente, foi visualizado a exoderme (Ex) (Figura 10a), o parênquima cortical (Pc) (Figuras 10a, 10b, 10c), a endoderme (En) (Figuras 10a, 10b, 10c). Logo após a endoderme, foi identificado a parte mais interna da raiz, o cilindro vascular, tendo como primeira camada o periciclo (P), que pode ser visualizado na Figura 10b, e em seguida as células vasculares como o floema (F), e o xilema (X) (Figuras 10a, 10b, 10c).

Método de propagação por Semente: cv 'Paluma'

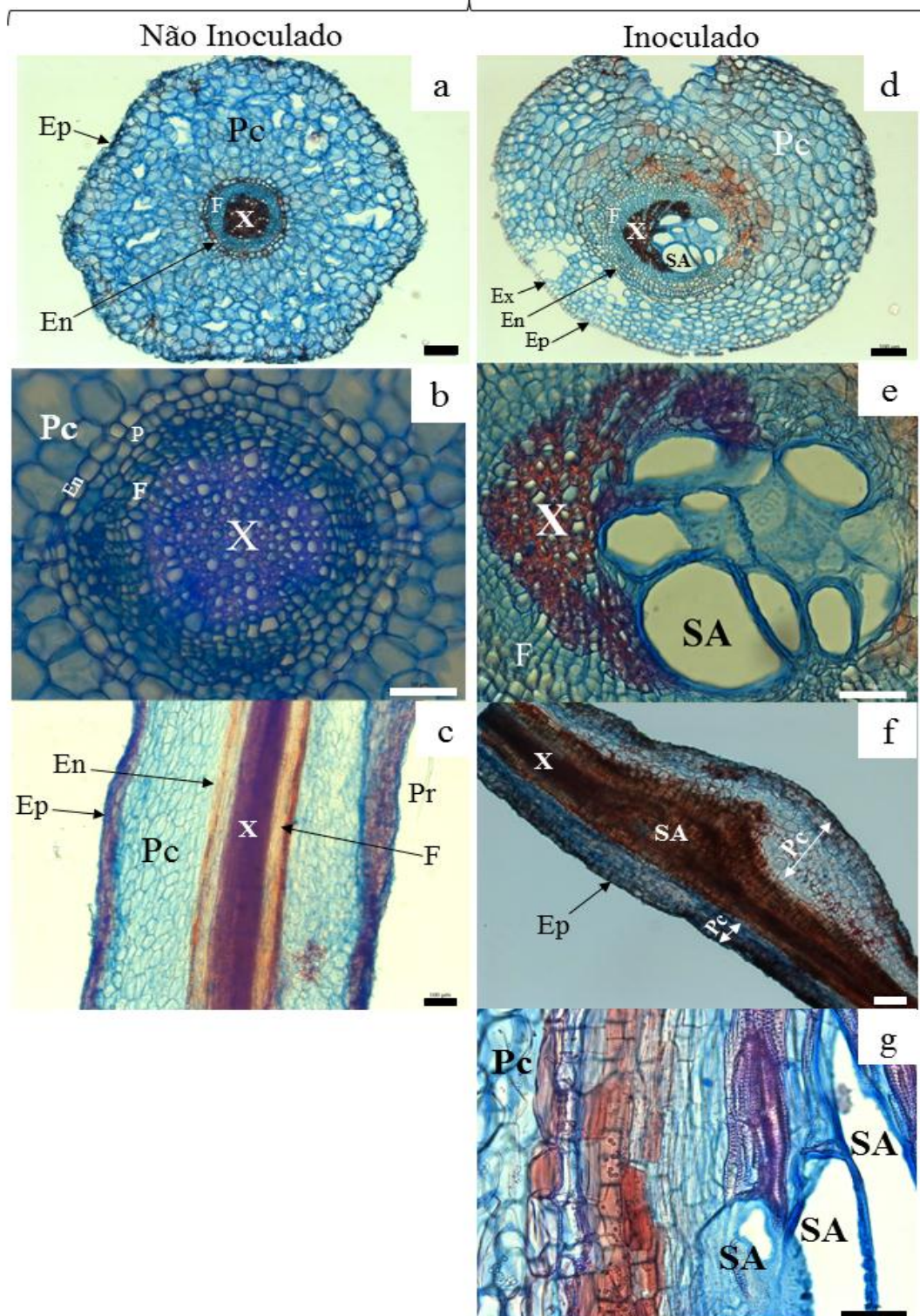


Figura 10. Cortes transversal e longitudinal das raízes das amostras de *Psidium guajava* cv 'Paluma' de acessos propagados por semente. Acesso de cv 'Paluma' não submetidos (controle) (a), (b), (c) e submetidos (d), (e), (f), (g) à infecção do nematoide *Meloidogyne enterolobii*. Pr = pelo radicular; Ep = epiderme; Ex = exoderme; Pc = parênquima cortical; En = endoderme; P = periciclo; F = floema; X = xilema; SA = sítio de alimentação. Barra: 100 µm (a), (c), (d), (f); 50 µm (b), (e), (g).

Nos tratamentos que foram submetidos à infecção pelo nematoide, foi realizada uma excisão antes e após a galha (alterações neoplásicas). Para verificar a magnitude histológica da sintomatologia ocasionada pelo nematoide à planta, foi usado o controle para efeito de comparação.

Ao observar os cortes transversais do tecido radicular, foi constatado que aos 26 DAI boa parte das células que constituem a estrutura da raiz encontram-se em desordem, principalmente na região das células vasculares. Os quais resulta do conjunto de células gigantes estabelecido no cilindro vascular, chamados de sítios de alimentação (SA), como foi possível visualizar nas Figuras 10d e 10e.

Nos cortes longitudinais foi possível observar de forma mais clara a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia das células do Pc próximo a região do SA (Figura 10f). Estas alterações morfológicas sugerem que esta região seria a mais afetada pelo parasita. Foi analisado também o perfil das células próximas da região da galha. Sendo verificado que o xilema, na região superior a galha (região superior a esquerda na Figura 10f), mostrou-se inalterado, quando comparado com o controle (Figura 10c). Já após a região dos SA (na região inferior a direita na Figura 10f), as células do xilema mostraram-se alteradas, por apresentar uma menor largura na quantidade de células do xilema.

Dessa forma, procurou-se visualizar longitudinalmente a formação desses SA, e foi possível detectar os vários SA formados (Figura 10g), assim como foi possível observar de forma mais clara as alterações promovidas ao xilema, como o rompimento de células que compõem o xilema.

Outro ponto a ser analisado no parênquima cortical (Pc), foi a ocorrência do aumento no acúmulo de lignina, quando comparado com o tratamento das plantas controle, visto por uma maior intensidade da coloração na Figura 10d.

As análises histológicas aos 26 DAI sugerem a ocorrência de um comprometimento radicular no transporte de nutriente nas plantas de *Psidium guajava* cv 'Paluma', produzidas em resposta à presença do nematoide *Meloidogyne enterolobii*.

4.3 Ensaaios Enzimáticos

Em resposta aos danos sofridos nas plantas, devido ao tratamento com o nematoide, pode ocorrer o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Este aumento pode induzir um mecanismo de defesa por parte da planta, com a ativação e inibição de várias proteínas. Com base nisso, o próximo passo avaliado neste

trabalho foi a análise de três enzimas chaves envolvidas no sistema de proteção ao aumento das espécies EROs nos tecidos de raiz e folha das plantas de cv ‘Paluma’ e araçazeiro da Costa Rica aos 26 DAI: catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase do guaiacol (POX).

4.3.1 Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima substancialmente importante para o processo de desintoxicação de células das plantas em condições de estresse oxidativo. Para os tecidos foliar e radicular, foram observadas o aumento da atividade desta enzima nos tratamentos, que foram submetidos à inoculação do nematoide, para araçazeiro da Costa Rica (ARC -tecidos foliar e radicular) (Figuras 11a e 11b, respectivamente) e cv ‘Paluma’ (PAL - tecido radicular) (Figura 11b), quando comparados com o controle de ambas as *Psidium* spp. No entanto, para o tecido foliar do tratamento que foi submetido à infecção do nematoide da cv ‘Paluma’ foi verificado uma diminuição da atividade dos níveis da enzima CAT (Figura 11a). Entretanto, ao realizar uma ANOVA não foi verificado diferença significativa ($p > 0,05$) em tecido foliar (Tabela 3) e radicular (Tabela 4) de *Psidium* spp.

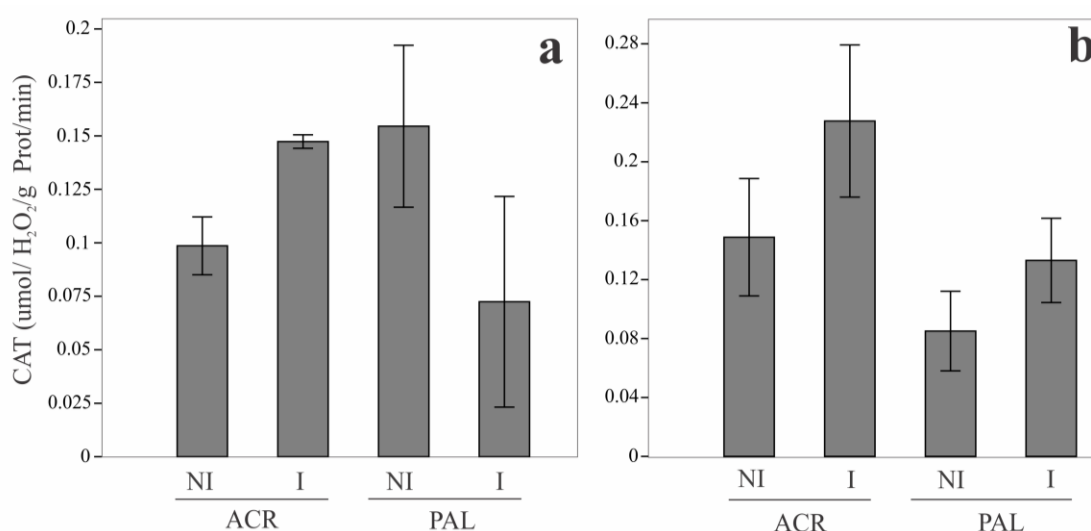


Figura 11. Atividade enzimática de catalase (CAT) nos tecidos foliares e radiculares aos 26 DAI. Comparação dos níveis da enzima CAT nos tecidos de folhas (a) e raízes (b) entre as espécies de Araçazeiro da Costa Rica (ACR) vs. cv ‘Paluma’ (PAL), dos grupos controle (Não Inoculado – NI) e submetido ao estresse biótico do *M. enterolobii* (Inoculado – I), aos 26 DAI. Barras simbolizam o desvio padrão. Teste ANOVA – Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de CAT foliar aos 26 DAI, entre as Espécies e Inoculação [Araçazeiro da Costa Rica (ACR) vs. cv ‘Paluma’ (PAL)]. GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	0.00027	0.00027	0.089	0.773
Inoculação	1	0.000831	0.000831	0.273	0.615
Espécie vs. Inoculação	1	0.012832	0.012832	4.221	0.074
Resíduos	8	0.024318	0.00304		

Tabela 4. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de CAT radicular aos 26 DAI, entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL). GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	0.01879	0.018789	4.317	0.0714
Inoculação	1	0.01207	0.012067	2.772	0.1345
Espécie vs. Inoculação	1	0.00072	0.000719	0.165	0.6951
Resíduos	8	0.03482	0.004353		

4.3.2 Ascorbato peroxidase (APX)

Ao longo do acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, verificou-se que a atividade da enzima APX, em tecidos radiculares sob condição do estresse biótico aos 26 DAI, apresentou diferença quando comparado com os tratamentos controle dos acessos de araçazeiro da Costa Rica (Tabela 5). Quando realizada a análise estatística (ANOVA), foi observado que houve variação significativa na atividade enzimática de APX ($p < 0,05$) para as amostras da espécie araçazeiro da Costa Rica tratados com *M. enterolobii*, quando comparado com o grupo controle da mesma espécie (Tabela 5, figura 12).

Em tecidos foliares, foi observado uma pequena atividade da enzima ascorbato peroxidase nas amostras de cv ‘Paluma’ (PAL), no tratamento submetido à inoculação do nematoide (Figura 12a, Tabela 6), no entanto não houve diferença significativa quando comparado entre si a resposta dos dois acessos de ‘Paluma’ (PAL) e araçazeiro da Costa Rica (ACR) submetidos ao estresse com o parasita *M. enterolobii* ($p > 0,05$).

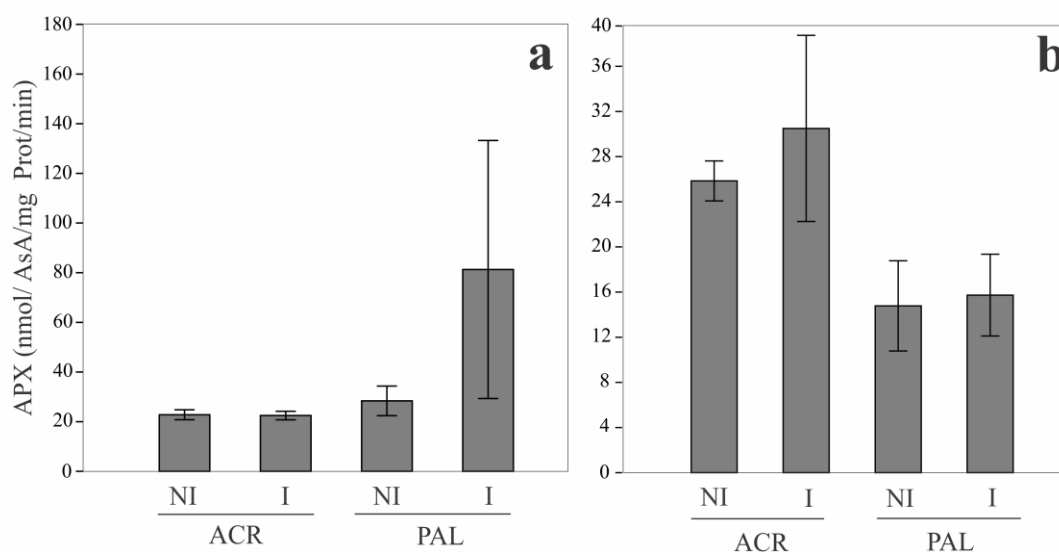


Figura 12. Atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX) nos tecidos radiculares e foliares aos 26 DAI. Comparação dos níveis da enzima APX nos tecidos de folhas (a) e raízes (b) entre as espécies de Araçazeiro da Costa Rica (ACR) vs. cv ‘Paluma’ (PAL), dos grupos controle (Não Inoculado – NI) e submetido ao estresse biótico do *M. enterolobii* (Inoculado – I), aos 26 DAI. Barras simbolizam o desvio padrão. Teste ANOVA – Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de APX radicular aos 26 DAI entre as Espécies e Inoculação (ACR vs. PAL). GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância. Valor em negrito indicam significância estatística.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	500.6	500.6	6.666	0.0325
Inoculação	1	23.6	23.6	0.314	0.5908
Espécie vs. Inoculação	1	10.3	10.3	0.137	0.7213
Resíduos	8	600.8	75.1		

Tabela 6. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de APX foliar aos 26 DAI entre as Espécies e Inoculação (ACR vs. PAL). GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	3112	3112	1.512	0.254
Inoculação	1	2073	2074	1.008	0.345
Espécie vs. Inoculação	1	2123	2123	1.032	0.339
Resíduos	8	16462	2058		

As análises das atividades enzimáticas aos 26 DAI, indicaram que há atividade significativa da enzima APX nas raízes de araçazeiro da Costa Rica (ACR) (*P. friedrichstalianum*), possivelmente em detrimento a resposta da condição do estresse ocorrido pela infecção ao *M. enterolobii*.

4.3.3 Peroxidase do guaiacol (POX)

A peroxidase do guaiacol (POX) pertence a uma classe de enzimas presente em tecidos vegetais que catalisam a oxirredução entre o peróxido de hidrogênio e vários agentes redutores, fazendo parte de uma ampla variedade de processos fisiológicos nas plantas. Foi observada no tecido foliar uma maior atividade da enzima POX, nos tratamentos não inoculados (controle) em relação ao tratamento inoculada, para cv ‘Paluma’ (PAL) (Figura 13a) e, no tecido radicular para araçazeiro da Costa Rica (ACR) (Figura 13b). Porém, foi verificado para o tecido radicular da espécie cv ‘Paluma’ (PAL) do tratamento submetido à inoculação do nematoide um aumento da atividade de POX em relação ao controle (Figura 13b). No entanto, quando foi realizado a avaliação estatística não foram observados uma variação significativa entre os tratamentos não submetidos (controle) e submetidos ao estresse com o nematoide *M. enterolobii* ($p > 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

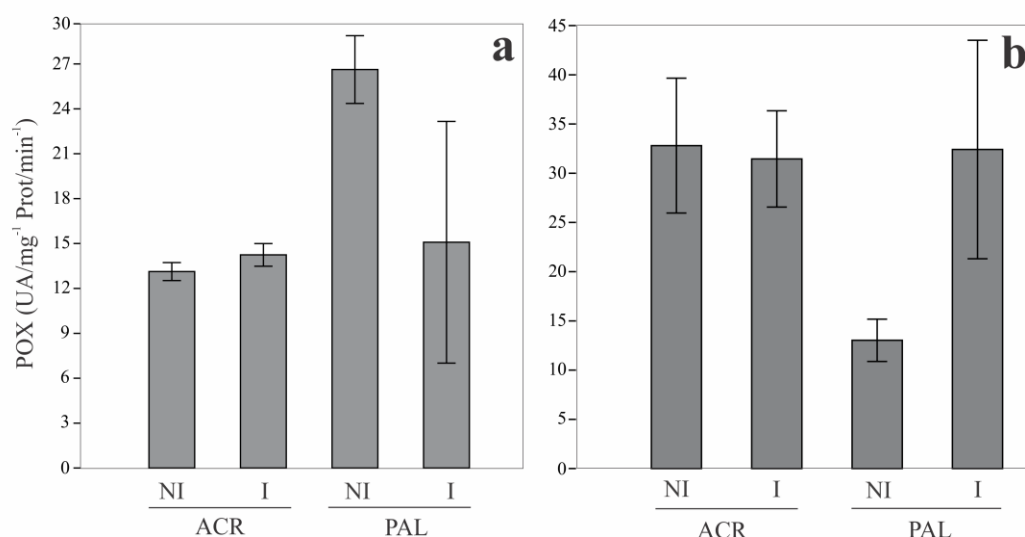


Figura 13. Atividade enzimática de peroxidase do guaiacol (POX) nos tecidos foliares e radiculares aos 26 DAI. Comparação dos níveis da enzima POX nos tecidos de folhas (a) e raízes (b) entre as espécies de Araçazeiro da Costa Rica (ACR) vs. cv ‘Paluma’ (PAL), dos grupos controle (Não Inoculado – NI) e submetido ao estresse biótico do *M. enterolobii* (Inoculado – I), aos 26 DAI. Barras simbolizam o desvio padrão. Teste ANOVA – Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de POX foliar aos 26 DAI entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL). GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	154.3	154.26	2.887	0.128
Inoculação	1	81.5	81.52	1.525	0.252
Espécie vs. Inoculação	1	120.1	120.06	2.247	0.172
Resíduos	8	427.5	53.44		

Tabela 8. Resultado inferencial das análises de variância nas comparações de POX radicular aos 26 DAI entre as espécies e Inoculação (ACR vs. PAL). GL – Graus de liberdade, SQ – Soma dos quadrados, MQ – Média dos quadrados, F – estatística F e p-valor – valor de probabilidade de significância.

ACR vs. PAL					
	GL	SQ	MQ	F	p-valor
Espécie	1	265.5	265.5	1.782	0.219
Inoculação	1	243.7	243.7	1.636	0.237
Espécie vs. Inoculação	1	322.5	322.5	2.164	0.179
Resíduos	8	1192	149		

4.4 Análise *in silico*

Nos dados apresentados até o momento, foram identificadas alterações morfológicas e no nível da atividade da enzima APX, estas alterações podem provavelmente estarem associadas ao sistema antioxidante das plantas de *Psidium* spp. Pouco se conhece a nível molecular este processo de defesa em plantas de goiabeira cv ‘Paluma’ e araçazeiro. Ribeiro et al. (2015) concluíram que a atividade de polifenoloxidasas é maior em raízes de araçazeiro ‘Costa Rica’, que são resistentes ao *M. enterolobii*, quando comparado com raízes de goiabeira ‘Paluma’, que são suscetíveis; a atividade de peroxidases em raízes de goiabeira ‘Paluma’ não difere de raízes de araçazeiro ‘Costa Rica’ inoculadas com *M. enterolobii*; em raízes de araçazeiro ‘Costa e Rica’ e de goiabeira ‘Paluma’ os tempos de 10, 20 e 30 dias após a inoculação com *M. enterolobii* não interferem significativamente na atividade de polifenoloxidasas e peroxidases. Com isto, uma outra abordagem utilizada neste trabalho foi realizar um estudo preliminar *in silico* utilizando dados disponíveis com a planta modelo *Arabidopsis thaliana* frente a diferentes condições de estresse biótico. Como os dados existentes são da planta modelo *Arabidopsis*, este trabalho teve como

intuito identificar genes associados a este processo e que num futuro possam ser utilizados como marcadores para *Psidium* spp.

Assim, para identificar genes e possíveis redes que possam estar envolvidas com resposta a estresse biótico, foi utilizada a base de dados *Arabidopsis* microarray, de domínio público. Inicialmente, a escolha de cada uma das proteínas, no recurso GEO Profiles, foi dada com base no *cut off* de 50%, resultando em um total de 356. A partir dessas, foram feitas várias análises na busca por agrupamento dessas proteínas através de ligações entre si, resultando assim em um interactoma composto por setenta e oito proteínas (Tabela 1 em Anexo III). Estas proteínas foram então analisadas no programa STRING 10.0, que é um banco de dados de interação proteína-proteína conhecidas e previstas, onde as interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). O resultado obtido está apresentado na Figura 14, um interactoma com um grau médio de nó de 8,38, tendo um coeficiente de agrupamento de 0,743 ($p < 0,05$), mostrando que os dados obtidos possuem confiabilidade significativa. Este interactoma é composto por 78 nós, representados por nós de tamanho grande (significando que há uma estrutura conhecida da proteína em 3D) e nós de tamanho pequeno (significando que não há uma estrutura da proteína em 3D), possuindo 327 arestas de cores diferentes entre os nós.

Com os dados obtidos no interactoma, foi realizado o enriquecimento destes com o intuito de buscar proteínas envolvidas com as vias de resposta planta-patógeno, onde foram obtidas 33 proteínas e as mesmas estão representadas com o nó em cor vermelha (Figura 14). Diante disso, quando as proteínas contidas no quadrante verde à direita do interactoma foram analisadas (Figura 14), foi observado a presença de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), envolvidas em várias etapas dos processos biológicos, tais como a geração de peróxido de hidrogênio durante a morte celular, como resposta de hipersensibilidade (HR) (MPK1, MPK6, MKP2, MKK5, MPK3); na cascata de sinalização imune inata (MEKK1, MKK4 / MKK5 e MPK3 / MPK6); na cascata de sinalização mediada por estresse abiótico (frio, salinidade) (MEKK1, MEK1 / MKK2 e MPK4 / MPK6); na regulação da citocinese durante a meiose e mitose (MKK6); na segunda fase da geração de peróxido de hidrogênio durante a morte celular como HR (MKK4); na cascata de sinalização mediada por estresse oxidativo (Proteína quinase ativada por mitógeno 6 - MPK6, MKP2).

As MAPKs podem também fosforilar reguladores de fatores de transcrição (Proteína quinase ativada por mitógeno 3 - MPK3) como, por exemplo, a fosfatase

MAP quinase 1 (MKP1), que atua como um regulador negativo na sinalização por desfosforilação da MPK6 e MPK3. As MAPK, também estão envolvidas na organização de microtúbulos cortical e estabilização, regulando o estado de fosforilação de proteínas associadas a microtúbulos, tais como MAP65-1 (Proteína quinase ativada por mitogenio 4 - MPK4). As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), podem também atuar como receptor (CERK1) do motivo *Lysin* (LysM) do receptor de quinase, que funciona como receptor de superfície celular em elicitor quitina de sinalização, que conduz à imunidade inata para os estresses biótico e abiótico. Assim como na presença de proteínas que contribuem para a ativação de defesa, como a proteína MKS1, a qual é regulada por acoplamento da quinase MPK4 para fatores de transcrição específicos WRKY.

Na Figura 14 também foi observado, ainda no quadrante verde, a presença de proteínas que podem desempenhar papel nas vias de transdução de sinal que envolvem cálcio como segundo mensageiro, como CDPK1 (Proteína quinase dependente de cálcio 1), CPK2 (Domínio Calmodulina de proteína quinase isoforma 2), CPK9 (proteína quinase de calmodulina-domínio 9), CPK32 (Proteína quinase dependente de cálcio 32), CPK13 (Proteína quinase dependente de cálcio 13). Proteína como a CPK32 funciona como regulador na via de sinalização do ácido abscísico mediada por cálcio (ABA).

Sabendo-se que a proteína CDPK1 pode atuar como regulador positivo no controle da transdução de sinal em resposta ao estresse, foi visualizado a localização dessa proteína no interactoma (na extremidade esquerda do quadrante verde sinalizada com uma seta vermelha), onde foi observado que a mesma possui co-expressão com várias proteínas, como o gene associado à senescência 101 (SAG101) (co-expressão com *score* de 0,411), com CPK9 (0,429), com uma das proteínas que contém o domínio de resistência Receptor Toll-Interleucina (AT1G57630) (0,427), DNA de ligação proteína 33 WRKY (WRKY33) (0,407), e com MPK3 (0,249).

Foi observado também, a presença da tirosina fosfatase 1 (PTP1) (na extremidade superior direita do quadrante verde sinalizada com uma seta verde), que desfosforila e provavelmente inibe MPK6 em condições de estresse não-oxidativo. Em associação com MKP1, reprime ácido salicílico (AS), modulando a resposta de defesa. Também pode reprimir MPK3, bem como desfosforilar e inativar MPK4.

Também foi possível visualizar proteínas contendo os domínios de resistência com Repetições Ricas em Leucina (LRR; *Leucine Rich Repeats*) e os Sítio de Ligação de Nucleotídios (NBS; *Nucleotide Binding Site*), também chamados de P-loops ou NB-

ARC como nas proteínas AT1G61190, AT1G61300, AT1G61310, AT1G61180. Duas dessas (AT1G61190 e AT1G61300) estão sinalizadas com setas azuis, sugerindo terem uma ‘função chave de sinalização’ nos processos que envolvem as vias de sinalização em resposta ao estresse planta-parasita (grande parte das proteínas contidas no quadrante verde), e nos processos de estresse oxidativo (grande parte das proteínas contidas no quadrante laranja). Estando, ambas as proteínas, contidas nesses quadrantes diretamente ligadas com COX1 (quadrante laranja).

Foi analisado também, com base na organização de domínio, a presença de proteínas envolvidas com resistência à doença pertencentes as classes CNL: Cauda espiralada – Sítio de ligação de Nucleotídeos – Repetições Ricas em Leucina (CC-NBS-LRR; *Coiled-coil – Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*), como as AT1G15890, AT1G58390, AT1G62630, AT1G63360; TNL: Receptor Toll-Interleucina – Sítio de Ligação de Nucleotídeo – Repetições Ricas em Leucina (TIR-NBS-LRR; *Toll Interleucine Receptor – Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeats*), como as AT1G63750, AT2G14080, AT2G17050, AT3G44400, AT3G44630, AT4G16960, AT4G36140 e; Receptor Toll-Interleucina – Sítio de Ligação de Nucleotídeo (TIR-NBS; *Toll Interleucine Receptor – Nucleotide Binding Site*) como as AT1G72950, AT3G04210. Bem como, a presença de proteínas que contém apenas o Receptor Toll-Interleucina (TIR; *Toll Interleucine Receptor*), como as proteínas AT1G57630, AT1G72900, AT1G72920; e apenas as LRR em AT2G34930.

Quando as proteínas existentes na extremidade esquerda do interactoma contidas no quadrante laranja foram avaliadas, observaram-se que algumas fazem parte do complexo de ubiquinol-citocromo c redutase (Complexo III ou complexo citocromo b-c1), como AT4G32470, AT5G13430, AT5G13440, AT5G25450, AT5G40810 e proteínas pertencentes ao citocromo c oxidase, como as AT1G80230, AT4G37830 e AT1G52710. Como também foi verificado a presença de PETA (Transferência de elétrons A na fotossíntese), no cloroplasto, e PETC (Transferência de elétrons C na fotossíntese), na mitocôndria, que são componentes do complexo b6-f no citocromo, que medeia a transferência de elétrons entre o fotossistema II (PSII) e fotossistema I (PSI). Bem como em mitocôndria a presença de COX 1, COX2 e COX3, as quais fazem parte do componente da cadeia respiratória, que catalisa a redução de oxigênio para a água. Essas três subunidades formam o núcleo funcional do complexo enzimático.

Foi observado que há proteínas de resistência à doença, no quadrante laranja, envolvidas com resposta de defesa da planta ao patógeno, como AT3G46710,

AT1G53350, AT1G58410, AT1G63360, AT4G27220, AT1G62630, AT1G58390, AT1G58807, AT4G10780, AT1G15890, AT3G14470 (cada uma está identificada com uma estrela laranja), que estão diretamente ligadas a COX1 (identificada com uma seta na cor laranja).

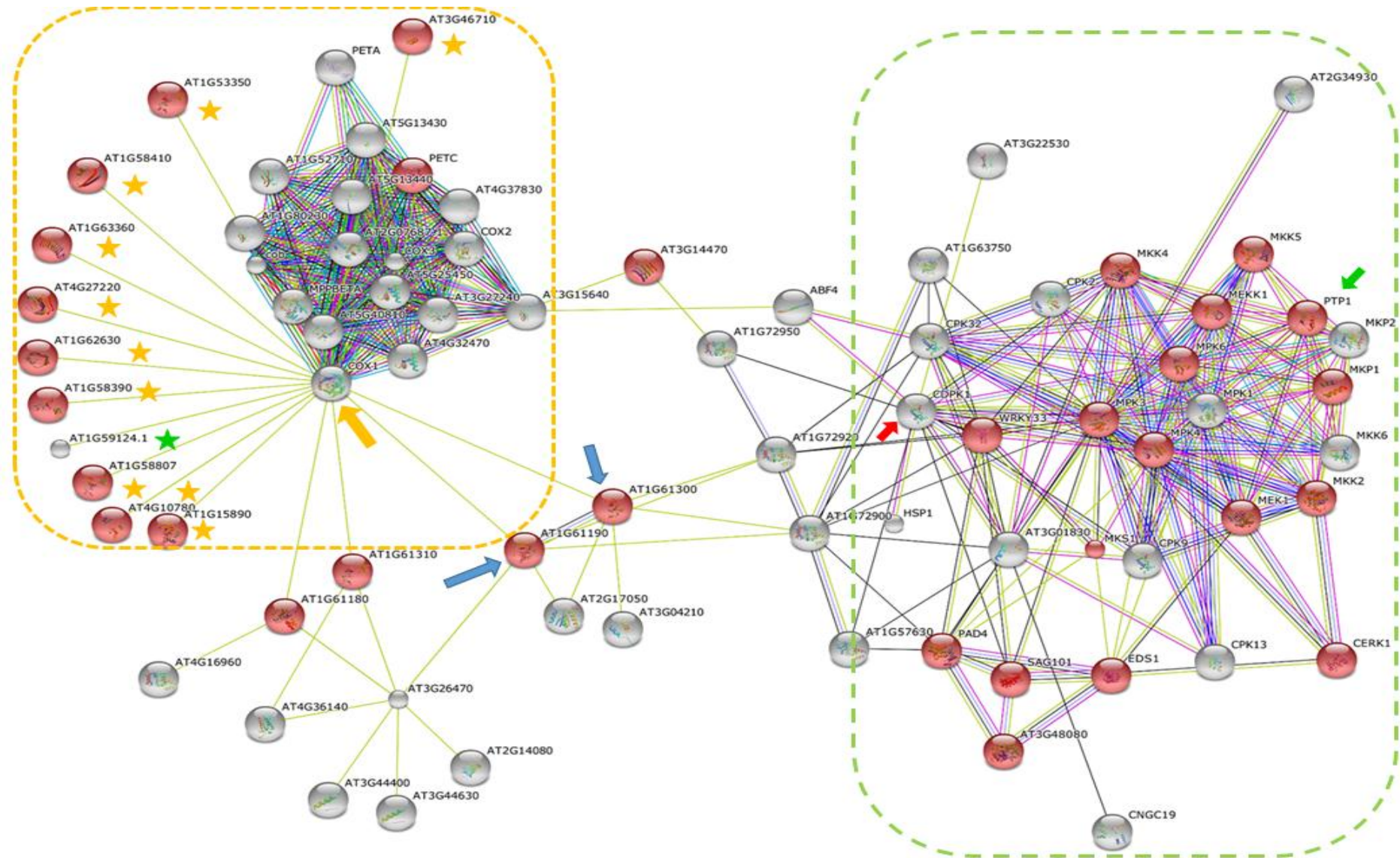


Figura 14. Interatoma de evidência das setenta e oito proteínas relacionadas ao estresse biótico em *Arabidopsis thaliana*. Os nós em vermelho representam as proteínas de resposta de defesa relacionadas ao estresse biótico, com *p-value* de 2.04e-22. As proteínas em vermelho, no interatoma, são: MKK4, MKK5, MEKK1, PTP1, MPK6, MKP1, MPK3, MPK4, WRKY33, MKK2, MEK1, MKS1, CERK1, EDS1, SAG101, PAD4, AT3G48080, AT1G61300, AT1G61190, AT1G61310, AT1G61180, AT1G15890, AT4G10780, AT1G58807, AT1G58390, AT1G62630, AT4G27220, AT1G63360, AT1G58410, AT1G53350, AT3G46710, PETC, AT3G14470. Legenda das arestas: A partir de bases de dados ; Determinado experimentalmente ; Gene *neighborhood* ; Fusão de genes ; Co-ocorrência de genes ; Mineração de texto ; Co-expressão ; Homologia entre proteínas . Legenda: Proteínas de resistência a doença ligada a COX1 (★); Proteína AT1G59124.1 ligada a COX1 (★); Maioria das proteínas envolvidas com os processos de estresse oxidativo (---); Maioria das proteínas envolvidas com processo de estresse planta-patógeno (---); COX1 (→); PTP1 (→); CDPK1 (→); AT1G61190 (→); AT1G61300 (→).

Estudando as 78 proteínas do interactoma, foi verificado a ontologia gênica (GO) dos processos biológicos com *p-value* de $< 5.04e-10$. Ontologia gênica é definida como um conjunto de vocabulários estruturados usados para descrever e categorizar genes e produtos gênicos por meio de suas funções moleculares, envolvimento em processos biológicos e localização celular. Ao avaliarmos a distribuição de cada uma das proteínas conforme o processo biológico, foi possível observar que as proteínas referentes à resposta de defesa, também estão todas envolvidas na resposta ao estresse (*p-value* de $1.959e-14$) e no processo de resposta a estímulos (*p-value* de $9.469e-13$). Foi verificada também a distribuição das proteínas para cada um dos processos biológicos, tabuladas na Tabela 1 do Anexo III. Com isso, foi observada que as MPK3, MEK1 e MKK2 foram as proteínas envolvidas em todos os processos relacionados na referida tabela.

Com o intuito de analisar a existência de proteínas até então menos exploradas no interactoma em questão, realizou-se uma pesquisa de dados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), aonde foi possível observar que, para “AT1G59124.1”, ocorreu a ausência de informação nos parâmetros *Literature*, *Health*, *Genes*, *Proteins*, *Chemicals* da base até agosto de 2016. Para complementar essa informação, observou-se que no interactoma há um score de 0,818 para mineração de texto entre COX1 – AT1G59124.1 (identificada com uma estrela verde no quadrante laranja do interactoma da Figura 14), e, com esses dados, exploramos no BAR (*The Bio-Analytic Resource for Plant Biology*) sua possível localização subcelular, onde foi obtido uma maior presença dessa proteína no peroxissomo, com nível de confiança (NC) de 0,903.

Dando continuidade, foram obtidas a localização subcelular e o nível de confiança (NC) que varia de 0 a 1 (quanto mais próximo do valor 1, maior a confiabilidade da localização subcelular da proteína) de cada uma das proteínas envolvidas no interactoma. Isso foi realizado com o intuito de conhecer a distribuição celular dessas proteínas (Figura 15) em resposta ao estresse biótico em *Arabidopsis thaliana*. Com isso, entender quais os possíveis caminhos das proteínas envolvidas nos processos de sinalização celular em ‘Paluma’ e araçazeiro da Costa Rica, ocasionados aos 26 dias após a infecção com *M. enterolobii*.

Ao realizar uma relação com os dados subcelular e o NC (diferenciado por cores), foi observado, no sentido da parte externa para interna da célula, há presença de proteínas extracelulares. Além disso, foram verificadas proteínas que podem atuar na

membrana plasmática, a qual atua como receptor quinase. Em seguida, foi observada a existência de muitas proteínas no citosol, as quais fazem parte do processo de resposta planta-patógeno e que podem dar seguimento às sinalizações seguintes em organelas específicas, sugerindo assim, uma tentativa de defesa por parte da planta (Figura 15).

Foi observado também, a presença de proteínas em organela, que realiza fotossíntese, como plastídeo, e também foi averiguado a presença de proteínas em mitocôndria. Também foi verificado que, no retículo endoplasmático e no peroxissomo, ocorreu a presença de uma das setenta e oito proteínas do interactoma, respectivamente. Por último, foi visto que no núcleo há presença de doze proteínas que atuam direta e indiretamente como possíveis ativadores ou inibidores (Figura 15).

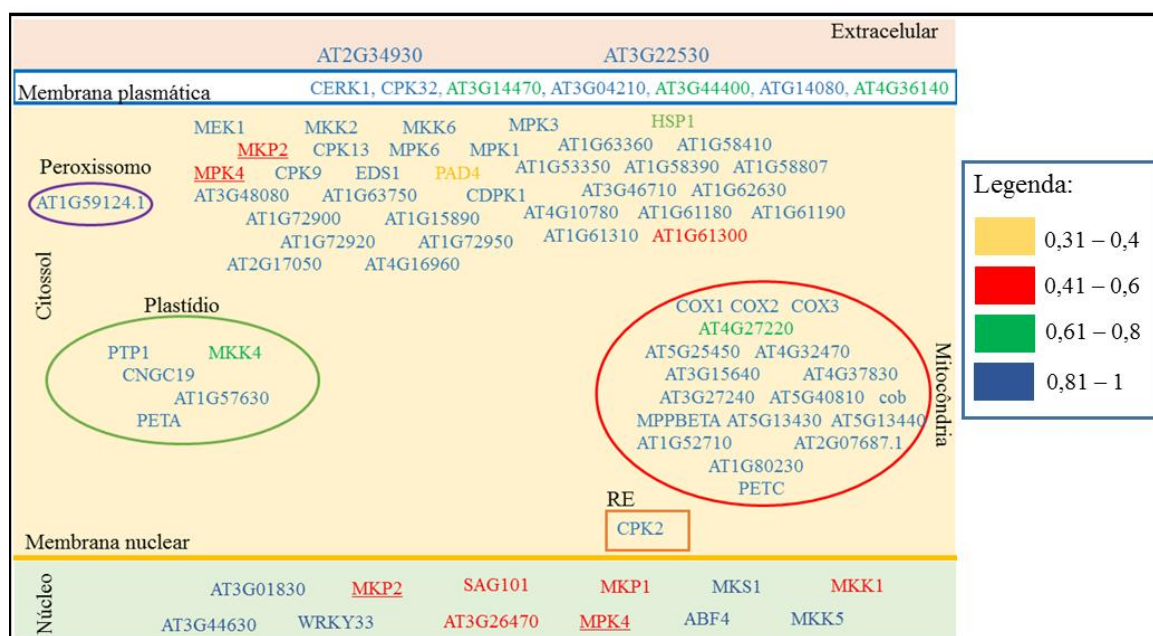


Figura 15. Proteínas analisadas no interactoma e suas respectivas localizações subcelular. Algumas organelas estão representadas por círculo: peroxissomo, círculo na cor roxa; plastídeo, círculo na cor verde; mitocôndria, círculo na cor vermelha. RE = Retículo endoplasmático. A legenda representa o nível de confiabilidade (NC) de ocorrência da proteína, representado nas cores/valores: amarelo / 0,31 a 0,40; vermelho / 0,41 a 0,60; verde / 0,61 a 0,80; azul / 0,81 a 1. Dados coletados de acordo com HOOPER et al., 2014.

Com os dados obtidos nas análises *in silico* em *Arabidopsis thaliana*, sugere-se a existência de genes que podem estar envolvidos com vias de resposta da planta hospedeira ao organismo patogênico, assim como genes envolvidos com a via de estresse oxidativo e proteínas associadas direta e indiretamente com as duas vias. Também foram confirmadas as localizações a nível celular dessas proteínas,

acarretando, com isso, melhor compreensão de suas atuações, e trazendo informações que possam auxiliar em estudos com estresse biótico ocasionado em outras dicotiledôneas, como a exemplo de espécies de *Psidium* spp. em condições de estresse ocasionado por *M. enterolobii*.

5 DISCUSSÃO

As plantas são seres sésseis e são expostas as variáveis edafoclimáticas, assim como variações nutricionais do solo e aos ataques de seres patogênicos. A maneira como a planta responde a essas variáveis ambientais faz com que ela possua diferentes mecanismos de defesa frente a essas condições adversas (BOLLER e FELIX, 2009; CAMPOS et al., 2011; PENG et al., 2016). Segundo SADAVA e colaboradores (2009), os mecanismos desenvolvidos pelos patógenos para atacar as plantas requer das mesmas uma resposta rápida, vigorosa e massiva a esse ataque. Acarretando assim, para planta, o uso de defesas estrutural e bioquímica (SADAVA et al., 2009; CAMPOS et al., 2011; PENG et al., 2016).

A cultura da goiaba estar presente em quase todas as regiões brasileiras em escala comercial (POMER et al., 2006). Logo, deve-se salientar as variações edafoclimáticas desses ambientes e os possíveis riscos fitopatogênicos que essa cultura está exposta. Dessa forma, neste estudo, plantas de *Psidium* spp., por igual período de tempo, foram submetidas ao estresse ocasionado pelo parasita *M. enterolobii*, observando-se respostas diferentes das plantas a níveis morfológicos, histológicos e bioquímicos.

Diante dos resultados obtidos da área foliar (AF), em que foi possível perceber que nos acessos analisados aos 26 DAI, o estresse ocasionado a planta pelo *M. enterolobii* foi capaz de interferir no crescimento foliar, afetando a morfologia da folha. Na espécie *P. guajava* cv 'Paluma' o nematoide ocasionou um aumento na largura das folhas. Enquanto que na espécie *P. friedrichstalianum* o nematoide influenciou na diminuição do comprimento das folhas. O estresse ocasionado por *M. enterolobii* em tecidos radiculares da planta hospedeira pode causar danos que comprometem a absorção e o transporte de água e nutrientes, e que conseqüentemente, afetarão o crescimento de folhas (CARNEIRO e MAZZAFERA, 2001; PERRY e MOENS, 2005). Almeida et al. (2011) encontraram dados semelhantes em mudas de goiabeira 'Paluma' de 12 meses de idade, esses pesquisadores observaram um decréscimo linear da área foliar com o aumento do nível do inóculo de *M. mayaguensis*.

Outros relatos de diminuição da área foliar sob condições de estresse por *Meloidogyne* spp. também foram verificados em acessos de pimenteira (*Capsicum* spp.) (SANTOS, 2008). Em tomateiros cereja (*Solanum lycopersicum*) foi observado que o nematoide de galhas (*M. javanica* (Treub)) ocasionou uma redução linear na taxa de expansão foliar na fase inicial de desenvolvimento das plantas (BELAN et al., 2011). Peixoto e colaboradores (2011) observaram uma diminuição da área foliar das plantas de alface (*Lactuca sativa*), à medida que aumentava o nível de inóculo inicial de *M. incognita* (0, 2000, 4000, e 6000 ovos mais J2/planta/vaso). Logo, a medida que o estresse biótico ocasionado por *Meloidogyne* spp. acarreta a destruição do sistema radicular, verifica-se que a área foliar passa a ser mais severamente afetada, causando perdas significativas para o cultivo (CARNEIRO e MAZZAFERA, 2001; PEIXOTO et al., 2011).

Além disso, os resultados da microscopia permitiram observar que aos 26 DAI houve uma desordem no tamanho das células que compõem os tecidos radiculares nos tratamentos que foram submetidos à infecção pelo fitonematoide. Sendo analisado também danos nas células do parênquima cortical e nas células que compõem o cilindro vascular, principalmente no xilema. Essa observação microscópica pode estar atrelada aos danos causados por *M. enterolobii*. Em plantas, a invasão por esse patógeno promove a síntese de hormônios vegetais relacionados com a formação de sítios de alimentação por meio da rediferenciação celular, no xilema (DAVIS et al., 2004; FRAGOSO et al., 2007; LOPES, 2009). Os sítios de alimentação ocasionam uma diminuição da área de captação de nutrientes, por parte da planta, comprometendo assim a fisiologia da planta e seu desenvolvimento (CARNEIRO e MAZZAFERA, 2001). Freitas et al., (2014), ao analisarem cortes histológicos de raízes de *P. guajava*, relataram que os sítios de alimentação foram observados dos 6º ao 30º DAI, e que os mesmos eram constituídos por mais de cinco células assimétricas por fêmea, na região perivascular, acarretando assim, o dano mecânico no parênquima vascular. Tem sido observado também que quando as fases juvenis dos nematoides penetrarem no tecido radicular, a partir do quinto dia de inoculação, estas promovem alterações anatômicas e fisiológicas nas plantas (LORDELLO, 1992; TIHOHOD, 1993; FREITAS, 2006). E ainda, vários estudos relataram os danos ocorridos em tecidos radiculares de plantas suscetíveis e resistentes ao *Meloidogyne* sp. (ASMUS et al., 2000; MORITZ et al., 2007; WESTERICH et al., 2012; FREITAS et al., 2014).

Nesse sentido, a determinação das alterações celulares nos tecidos de raiz em *P. guajava* cv 'Paluma' exposto à infecção, foi de extrema importância para este trabalho, confirmando assim a condição de um estresse biótico ocasionado pelo nematoide. Em contrapartida ao estresse biótico, a planta utiliza-se de meios para o isolamento e inativação das substâncias liberadas pelo patógeno (ALLAN e FLUHR, 1997; RESENDE et al., 2007; SOARES e MACHADO, 2007; BARBOSA et al., 2014; NOIROT et al., 2014).

Sendo assim, foi observado que aos 26 DAI houve alterações na atividade de algumas enzimas que fazem parte do sistema antioxidante em plantas, como as ascorbato peroxidase (APX). Durante situações de estresse a produção de H_2O_2 está diretamente ligado ao recrutamento de enzimas antioxidantes, que inibem o estresse oxidativo (PASTORI e TRIPPI, 1992). Dessa forma, uma produção elevada dessas enzimas indica um processo de detoxificação das células (APEL e HIRT, 2004). Se houver um déficit nessa produção enzimática, consequentemente, a planta morrerá ou será comprometida (necrose) pelo acúmulo de substâncias, como H_2O_2 , e por morte celular programada (LAM et al., 2001; HEATH, 2000; GECHEV e HILLE, 2005).

Os dados obtidos com as atividades enzimáticas indicaram um aumento da APX nas raízes infectadas com o patógeno aos 26 DAI, alcançado maior atividade nos acessos de araçareiro da Costa Rica (ACR) quando comparado aos acessos de cv 'Paluma'. E não foi observada variação significativa dessa enzima nos tecidos de folha em ambos os tratamentos.

Com base na variação das atividades enzimáticas Sousa e colaboradores (2015) verificaram o crescimento e resposta enzimática do feijão caupi sob estresse hídrico e nematoide de galhas. Eles observaram que em folhas o estresse hídrico afetou isoladamente a atividade de APX e que o estresse biótico causado pelo *M. incognita* alterou a concentração das enzimas CAT e APX. A variação das enzimas antioxidantes pode se dar pelo fato da resposta imune dessas plantas ao nematóide. Se a resposta foi baixa ou não houve resposta à invasão do patógeno, consequentemente, não haverá uma produção maior dessas enzimas, considerando que, o processo de oxidação não foi ativado (ROSSITER, et al., 2008).

Esses dados, frente ao estresse biótico, poderão também acarretar em um comprometimento negativo na produção de frutos e, consequentemente, na economia desta cultura. Por isso, faz-se necessário o estudo da relação de quais possíveis genes podem estar envolvidos em resposta ao estresse biótico, dando-nos então uma resposta

mais precisa dos mecanismos de resposta da planta ao ataque do parasita. Nesse sentido, usamos de ferramentas de análises *in silico* em *Arabidopsis thaliana* por esta conter mais informações moleculares depositadas nos bancos de dados para tentarmos entender quais genes podem estar envolvidos nas vias de sinalização em resposta ao estresse biótico.

Com referência aos resultados obtidos no interactoma de genes relacionados com a resistência ao estresse biótico em *A. thaliana*, observamos a interação de 78 proteínas agrupadas que formavam uma possível rede de resposta destas envolvidas com vários processos metabólicos como: as cascatas de MAP quinase, de receptores do gene *R* e resposta ao estresse oxidativo e biótico, e proteínas ligadas direta e indiretamente a esses processos. Esse fato pode ser explicado, pois o ETI (do Inglês *Effector triggered immunity*) pode desencadear uma resposta de defesa eficaz que inclui vários processos metabólicos, a fim de, limitar a expansão do agente patogênico como: transcrição de genes de defesa para facilitar a resposta de hipersensibilidade (HR), na produção de cálcio e fitormônios, as espécies reativas de oxigênio (ROS), e a ativação de cascata(s) de MAPK, (JONES e DANGL, 2006; MENG e ZHANG, 2013; BUSCAILL e RIVAS, 2014; PENG, et al., 2016).

Estudos comprovaram que os sinais de estresse ambiental são transmitidos para, pelo menos, duas cascatas de MAPK. Um deles é a cascata MPK4 (MEKK1-MEK1 / MKK2-MPK4) e o outro envolve MPK6 e p44MAPK (KHAN, et al., 2012). Em *Arabidopsis*, MPK4 e MPK6 são ativados por vários tipos de estresse como fitopatógenos, salino, seca e frio (KHAN, et al., 2012; ZHANG, et al., 2014). Foi demonstrado que no tomate, o MPK4 é necessário para a resistência ao *Botrytis cinerea* e a tolerância ao estresse hídrico (VIRK, et al., 2013). Li e colaboradores (2014) verificaram que o silenciamento de *SIMKK2* e *SIMKK4* resultou em resistência reduzida para *B. cinerea*, o aumento da acumulação de ROS e expressão atenuada de genes de defesa após a infecção com *B. cinerea* em tomate. Em *Arabidopsis* o gene MKK2 tem se mostrado funcionar como um regulador negativo da resposta imunológica contra fitopatógenos (QIU, et al., 2008; GAO, et al., 2008; KONG, et al., 2012). Mizoguchi e colaboradores (1998) realizaram análise funcional e interação em levedura que revelou interações proteína-proteína entre MEKK1 e MKK2 / MEK1, entre MKK2 / MEK1 e MPK4, e entre MPK4 e MEKK1.

A interação planta-patógeno exerce uma variação nas respostas decorrentes do grau de envolvimento dos mecanismos estruturais e bioquímicos, pré ou pós-formados,

e, concomitantemente, numa mesma interação, em função da idade da planta, do órgão ou tecido afetado, do estado nutricional e das demais condições ambientais (CAMPOS, et al., 2011). De maneira que no modelo vegetal *A. thaliana* encontramos vários genes envolvidos com a resposta de defesa, resposta ao estresse e resposta a estímulos, como AT3G14470, AT1G61190, AT3G51850, PAD4, EDS1. A identificação na expressão do RNAm destes genes corrobora com o modelo proposto por Xiao et al. (2005), onde estes pesquisadores demonstraram que o gene EDR1 (um gene que codifica uma quinase MAPKK conservada) exerce regulação negativa na resposta de hipersensibilidade (HR), sobre a morte celular e na resistência ao oídio, limitando a amplificação da transcrição da proteína de resistência ao oídio 8 (*Resistance to Powdery Mildew 8*) [RPW8.1 e RPW8.2 (AT3G26470)], em *Arabidopsis*. Eles verificaram também que as proteínas RPW8.1 e RPW8.2 recrutam em adição ao ácido salicílico e o gene EDS1. Os outros componentes de sinalização de genes NB-LRR PAD4, EDS5, NPR1 SGT1b para a ativação da resistência ao oídio e na resposta de HR. Thieme et al. (2015) identificaram 3.630 genes produzindo transcritos celulares em *Arabidopsis*, dentre os quais, 2.110 foram identificados na interação planta-patógeno, com destaque para os genes AT1G61190, AT3G51850, AT3G14470, que se movem de *Arabidopsis* em *Cuscuta reflexa*. Com base nisso, possivelmente uma das funções dos transcritos celulares é de alertar partes das células distantes ao local agredido, facilitando assim a adaptação sistêmica a estresses e na ativação de mecanismos de defesa da planta ao patógeno.

Foi observado neste trabalho, no interactoma, que alguns genes estão envolvidos na resposta ao ácido abscísico (ABA) como: ABF4, CPK32, CDPK1, CPK2, MPK6, MPK3, MPK4, CPK9 e CPK13. Pesquisas relataram que os hormônios, tal como o ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (GA), ácido jasmônico (JA), auxina e etileno, bem como a via de sinalização de ROS desempenham papéis cruciais no metabolismo de sinalização entre os estresses bióticos e abióticos (MIKOLAJCZYK et al., 2000; CAMPOS et al., 2011). Estes, por sua vez, induzem outros genes relacionados à defesa e modificam proteínas de defesa e enzimas. Estudos mostraram que o tratamento de plantas com ABA induz a regulação da transcrição, a acumulação de proteínas e a estabilidade, a atividade de quinase de vários componentes de cascatas de sinalização MAPK distinta em muitas espécies de plantas, indicando o envolvimento de cascatas de MAP quinase em via de transdução de ABA (FUJITA et al., 2006; XING et al., 2008).

Diante do exposto, foi observado que as análises *in silico* em *A. thaliana* foram importantes, pois sugerem quais genes podem estar envolvidos nos processos fisiológicos de resposta planta-patógeno e com essas informações poderemos assim tentar relacioná-los com outras plantas dicotiledôneas não modelo como, por exemplo, em estudos envolvendo os genes envolvidos com a resposta de defesa ao *M. enterolobii* em *Psidium* spp.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que estes danos permitem deduzir sobre como as espécies ‘Paluma’ e araçazeiro da Costa Rica modulam suas respostas, morfológicas e fisiológicas, frente às condições adversas impostas pelo *M. enterolobii*. Estas respostas implicam na variação da produção de H_2O_2 em diferentes localizações celulares da planta, uma vez que foi identificado que as atividades enzimáticas de antioxidantes variaram nos diferentes locais da planta propagadas por semente, implicando em maiores produções da atividade da enzima APX nos tecidos radiculares da cv ‘Paluma’ em relação ao araçazeiro da Costa Rica. Verificado assim, a resposta das espécies resistentes e susceptíveis frente ao estresse proposto, em casa de vegetação, aos 26 DAI. Com base no exposto, observa-se que há a necessidade de averiguar a nível molecular quais os genes chaves das espécies de *Psidium* spp. em resposta aos estímulos acometidos pelo fitonematoide, para, num futuro próximo, tentarmos entender quais os processos metabólicos que podem estar envolvidos com os fatores de resistência em *Psidium* spp., especificamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2013.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Boston: Elsevier, p. 921, 2005.
- AL-EDANY, T.Y.; AL-SAAD, S.A.A.M. Taxonomic significance of anatomical characters in some species of the family Myrtaceae. **American Journal of Plant Sciences**, v.3, p. 572-581, 2012.
- ALLAN, A.C. & FLUHR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, v.9, p.1559-72. 1997.
- ALMEIDA, E. J.; SANTOS, J. M.; MARTINS, A. B. G. Influência do parasitismo pelo nematoide de galhas nos níveis de nutrientes em folhas e na fenologia de goiabeira ‘Paluma’. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n.4, p. 876-881, 2011.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**. v.55, p.373-99, 2004.
- ASMUS, G. L., L. C. C. B. FERRAZ E B. APPEZZATO-DA-GLÓRIA. Alterações anatômicas em raízes de milho (*Zea mays* L.) parasitadas por *Meloidogyne javanica*. **Nematrópica**, v.30, n. 1, p.33-39, 2000.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, v.44, n.3, p. 453-460, 2014.
- BELAN, L. L.; ALVES, F. R.; JESUS JUNIOR, W. C. **Redução da taxa de expansão foliar de tomateiros parasitados por *Meloidogyne javanica***. *Nucleus*, v. 8, n.2, p. 105-114. 2011.
- BIRD, A. F.; ROGERS, G. E. **Ultrastructural and histochemical studies of the cells producing the gelatinous matrix in *Meloidogyne***. *Nematologica*. v. 11, p. 231-238, 1965.
- BLOK, V. C.; WISHART, J.; FARGETTE, M.; BERTHIER, K.; PHILIPS, M.S. **Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes**. *Nematology*. v. 4, p. 773-781, 2002.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annu Rev Plant Biol**, v.60, p.379–406, 2009.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.
- BUSCAILL, P.; RIVAS, S. Transcriptional control of plant defence responses. **Curr. Opin. Plant Biol.** v.20, p.35–46, 2014.
- CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. (In.) Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária / editores técnicos: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 730p. 2011.
- CARNEIRO, R. G.; MAZZAFERA, P. **Relação fonte-dreno e absorção e transporte de minerais em plantas infectadas por nematóides.** In: João Flávio Veloso e Silva. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. 1ed. Londrina - PR: Embrapa : Soja, v. 1, p. 63-93. 2001.
- CASTAGNONE-SERENO, P. ***Meloidogyne enterolobii* (=M. mayaguensis): Profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species.** Nematology. v. 14, p. 133-138, 2012.
- CHEN, R.; LI, H.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; XIAO, J.; YE, Z. *CaMi*, a root-knot resistance gene from hot pepper (*Capsicum annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 26, n. 7, p. 895-905, 2007.
- DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, Oxford. v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.
- EL BORAI, F. E.; DUNCAN, L. W. Nematodes parasites of subtropical and tropical fruits tree crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture.** Wallingford UK: CAB Internacinal, p. 467-492. 2005.
- ELLING, A. A. Major Emerging Problems with Minor *Meloidogyne* Species. **Phytopathology.** v. 103, n. 11, p. 1092 – 1102, 2013.
- ELVIRA, M. I.; GALDEANO, M. M.; GILARDI, P.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.6, p.1253–1265, 2008.
- FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In. SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L. &

- FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina, Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, p. 127, 2001.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275–296, 1971.
- FLORI, J. E.; CASTRO, J. M. C. A cultura da goiabeira irrigada no nordeste brasileiro. In: NATALE, W.; ROZANE, D. E.; SOUZA, H. A.; AMORIM, D. A. (Ed.). **Cultura da goiaba do plantio à comercialização**. Jaboticabal, SP, p.507-524. 2009.
- FOX, J. & WEISBERG, S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>
- FRAGOSO, R. R.; LOURENÇO, I. T.; VIANA, A. A. B.; SOUZA, D. S. L.; ANDRADE, R. V.; MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C. M.; PINTO, E. R. C.; LIMA, L. M.; ROCHA, T. L.; SÁ, M. F. G. **Interações moleculares planta-nematóide**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 56, 2007. (Documentos, 198).
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução à Nematologia**. 3ª ed. Viçosa: Editora, UFV, 2006. 83p.
- FREITAS, V. M.; CORREA, V. R.; MOTTA, F. C.; SOUSA, M. G.; GOMES, A. C. M. M.; CARNEIRO, M. D. G.; SILVA, D. B.; MATTOS, J. K.; NICOLE, M.; CARNEIRO, R. M. D. G. Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. **Plant Pathology**, v.63, p.738-746, 2014.
- FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Curr Opin in Plant Biol**, v.9, p.436–442, 2006.
- GAO, M. H.; LIU, J. M.; BI, D. L.; ZHANG, Z. B.; CHENG, F.; CHEN, S. F.; ZHANG, Y. L. MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. **Cell Res**. v.18, n.12, p.1190-1198, 2008.
- GECHEV, T. S.; HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, v.168, p.17-20, 2005.
- GONZAGA NETO, L.; SOARES, J. M. **A cultura da goiaba**. Coleção Plantar, 27. Brasília: EMBRAPA/SPI. p. 75, 1995.

- GOODELL, P. B., AND FERRIS, H. **Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita***. J. Nematol. v. 21, p. 328-334, 1989.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.; LANDRUM, L.; LUCAS, E.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA L, WILSON, P.; NICLUGHDHA, E. **World Checklist of selected plant families - Myrtaceae**. 2008.
- HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Resistance gene dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v.8, p.1773–179, 1996.
- HAVIER, E. A.; MCHALE, N. A. **Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves**. Plant Physiol. 1987, v.84, p. 450-455.
- HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current opinion in plant biology**. v.3, n.4, p.315-319. 2000.
- HEWEZI, T.; BAUM, T. J. **Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors**. Mol. Plant-Microbe Interact. v. 26, p. 9-16, 2013.
- HUMPHREYS, D. A.; WILLIAMSON, V. M.; SALAZAR, L.; FLORES-CHAVES, L.; GÓMEZ-ALPIZAR, L. **Presence of *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback (=M. mayaguensis) in guava and acerola from Costa Rica**. Nematology. v. 14, p. 199-207, 2012.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=5&z=t&o=11&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1>>. Acesso em: 01 nov. 2013.
- IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola Municipal**. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=106&z=t&o=11&i=P>>. Acesso em: 10 jan. 2016.
- JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323–329, 2006.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**. v.57, p. 315-319, 1976.

- KHAN, M. N.; SIDDIQUI, M. H.; MOHAMMAD, F.; NAEEM, M. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. **Nitric Oxide**, v.27, p.210-218. 2012.
- KIEWNICK, S.; DESSIMOZ, M.; FRANCK, L. **Effects of the *Mi-1* and the *N* root-knot nematoderesistance gene on the infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars.** Journal of Nematology. v. 41, p. 134–139, 2009.
- KONG, Q.; QU, N.; GAO, M.; ZHANG, Z.; DING, X.; YANG, F.; LI, Y.; DONG, O. X.; CHEN, S.; LI, X.; ZHANG, Y. The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in Arabidopsis. **Plant Cell**. v.24, n.5, p.2225-2236. 2012.
- KRAUS; ARDUIN. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Seropédia: Edeir, 198 p. 1997.
- LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**. v.411, n.6839, p.848-853, 2001.
- LI, X.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; OUYANG, Z.; HONG, Y.; ZHANG, H.; LI, D.; CANÇÃO, F. Tomato *SIMKK2* and *SIMKK4* contribute to disease resistance against *Botrytis cinerea*. **Biologia BMC Planta**, v.14, 2014.
- LOPES, M. J. C. **Aspectos histopatológicos e mudanças na expressão de genes em genótipos de soja resistentes, durante a interação com *Meloidogyne javanica*.** 2009. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóides das plantas cultivadas.** 8ª ed. São Paulo: Editora Nobel. 1992. 314 p.
- MANICA, I. Importância econômica. In: MANICA, I.; ICUMA, I.M.; JUNQUEIRA, N.T.V.; SALVADOR, J.O.; MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E. (Ed.). **Fruticultura Tropical 6: Goiaba.** Porto Alegre, RS: CINCO CONTINENTES EDITORA LTDA., p. 09-22, 2000.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. In: GEBRIM, S. **Exportações de frutas crescem 25% nos últimos cinco anos.** 2011. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 02 fev. 2016.
- MENG, X.; ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.51, p.245–266, 2013.

- MIKOŁAJCZYK, M.; AWOTUNDE, O. S.; MUSZYNSKA, G.; KLESSIG, D. F.; DOBROWOLSKA, G. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. **Plant cell**, v.12, p.165–178, 2000.
- MIZOGUCHI, T.; IRIE, K.; HIRAYAMA, T.; HAYASHIDA, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; MATSUMOTO, K.; SHINOZAKI, K. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, n.2, p.765–769, 1998.
- MORITZ, M. P.; CARNEIRO, R. G.; SANTIAGO, D. C.; MEDRI, M. E.; CORREA, A.; NAKAMURA, K. C.; PIGNONI, E. GOMES, J. C. Histopatologia comparada das raízes de cultivares suscetível e resistente de soja inoculadas com *Meloidogyne paranaensis*. **Nematologia Brasileira**, v.32, n.1, p. 41-49, 2007.
- MOURA, R. M.; MARANHÃO, S. R. V. L.; COELHO, R. S. B.; CAVALCANTI, V. A. L. B.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; FRANÇA, J. G. E.; FREITAS, J. L.; NEVES, J. D.; MOREIRA, W.; GONZAGA NETO, L. **O nematoide da goiabeira (*Meloidogyne enterolobii*) / Pernambuco**. Instituto Agrônômico de Pernambuco. 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. v.5, p. 867-880, 1981.
- NOIROT, E.; DER, C.; LHERMINIER, J.; ROBERT, F.; MORICOVA, P.; KIÊU, K.; LEBORGNE-CASTEL, N.; SIMON-PLAS, F.; BOUHIDEL, K. Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.17, p.5011-5022, 2014.
- PAES, V. S.; SOARES, P. L. M.; MURAKAMI, D. M.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, B. F. F.; NEVES, S. S. **Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* em muricizeiro (*Byrsonima cydoniifolia*)**. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n. 3, p. 215-219, 2012.
- PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain. **Plant Cell Physiology**, v.33, p.957-996, 1992.

- PEIXOTO, L.A.; ALVES, F. R.; MORAES, W. B.; BELAN, L. L. Quantificação de danos em alface causados por diferentes níveis de *Meloidogyne incognita* em diferentes tipos de solo. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhece – Goiania. v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.
- PENG, H.; MANTELIN, S.; HICKS, G. R.; TAKKEN, F. L. W.; KALOSHIAN, I. The conformation of a plasma membrane-localized somatic embryogenesis receptor kinase complex is altered by a potato aphid-derived effector. **Plant Physiology**, v.171, p.2211-2222, 2016.
- PEREIRA, F. M., SOUZA, R. M., SOUZA, P. M., DOLINSKI, C., AND SANTOS, G. K. **Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil**. Nematol. Bras. v. 33, p. 176-181, 2009.
- PEREIRA, F.M. **Cultura da goiabeira**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. UNESP, FUNEP, p. 47, 1995.
- PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. Melhoramento da goiabeira. In: ROZANE, D.E.; COUTO, F.A.d'A. **Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado**. Viçosa: UFV, p.53-78, 2003.
- PERRY, R. N.; MOENS, M. **Plant nematology**. Pondicherry: Biddles, 447 p. 2005.
- PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Circular Técnico, 132. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. p. 12. 2014.
- PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. Rev. Bras. de Biociências, v. 9, n. 2, p. 241-248, 2011.
- POMMER, C. V.; MURAKAMI, K. R.N.; WATLINGTON, F. Goiaba no mundo. **O Agrônomo**, Campinas, SP, v. 58, p. 22-26, 2006.
- QIU, J. L.; ZHOU, L.; YUN, B. W.; NIELSEN, H. B.; FIIL, B. K.; PETERSEN, K.; MACKINLAY, J.; LOAKE, G. J.; MUNDY, J.; MORRIS, P. C. Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. **Plant Physiol.** v.148, n.1, p.212-222, 2008.
- R Development Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

- RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **RAPP**, v.15, p. 129-198. 2007.
- RIBEIRO, J. M.; PINTO, M. S. T.; CASTRO, J. M. C.; MELO, N. F.; FERNANDES, K. V. S. **Atividade de Peroxidases e Polifenoloxidasas em *Psidium* spp. Resistentes e Suscetíveis a *Meloidogyne enterolobii***. Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, nº 122. 16p., 2015.
- RICH, J. R.; BRITO, J. A.; KAUR, R.; FERRELL, J. A. **Weed species as hosts of *Meloidogyne*: A review**. Nematropica. v. 39, p. 157-185, 2008.
- ROSSITER, J. G. A.; MUSSER, R. DOS S.; MARTINS, L. S. S.; PEDROSA, E. M. R.; MEDEIROS, J. M. Seleção de genótipos de aceloleira assistida por marcadores isoenzimáticos visando à resistência a *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p. 1057-1064, 2008.
- SADAVA, D.; HELLER, H. C.; ORIAN, G. H.; PURVES, W. K.; HILLIS, D. M. **Vida: a ciência da biologia**; tradução BONAN, C. D.; FERREIRA, C. A. S.; MARQUES, C. C.; ENDT, D. V.; BROMBERG, E.; RENARD, G.; OLIVEIRA, G. T.; ROSSI, I. C. C.; WERLANG, I. C. R.; CARDONE, J. M.; CHIES, J. A. B.; XAVIER, L. L.; GARRIDO, M. P.; VIANNA, M. R. M. R.; SCHRODER, N.; FAGUNDES, N. J. R.; OLIVEIRA, P. L.; SILVA, R. G.; LOPES, R. F. F. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed. 3 v. 2009. 1252 p.
- SANTOS, P. V. **Reação de acessos de pimenteiros (*Capsicum* spp.) a *Meloidogyne incognita* Raça 3**. 2008. 58p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2008.
- SATO, A. A. K.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CUNHA, R. L. Avaliação das propriedades físicas, químicas e sensorial de preferência de goiabas em calda industrializadas. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 550-555, 2004.
- SHAPIRO, S. S. & WILK, M. B. An analysis of variance for normality (complete samples). **Biometrika**, v.52, p.591–611. 1965.
- SILVA, A. L.; MENDES, A. M. S.; OLIVEIRA, A. R.; PARANHOS, B. A. J.; SANTOS, C. A. F.; SILVA, D. J.; BASTOS, D. C.; BATISTA, D. C.; BARBOSA, F. R.; OLIVEIRA, J. E. M.; ARAÚJO, J. L. P.; PINTO, J. M.; CUNHA E CASTRO, J. M.; SOARES, J. M.; BASSOI, L. H.; GONZAGA

- NETO, L.; MOURA, M. S. B.; CALGARO, M.; LIMA, M. A. C.; LIMA, M. F.; CORREIA, R. C.; PETRERE, V. G.; **A cultura da goiaba**. (Coleção Plantar, 66). Ed. Tec.: BRABOSA, F. R.; LIMA, M. F. A 2 ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 180, 2010.
- SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v.1, n.1, p.9-19, 2007.
- SOKAL, R. R., & F. J. ROHLF. Biometry. The principles and practice of biological research. W. H. Freeman, New York. 887 pp, 1985.
- SOUSA, C. C. M.; PEDROSA, E. M. R.; ROLIM, M. M.; OLIVEIRA FILHO, R. A.; SOUZA, M. A. L. M.; PEREIRA FILHO, J. V. Crescimento e respostas enzimáticas do feijoeiro caupi sob estresse hídrico e nematoide de galhas. **Rev. Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.2, p.113-118, 2015.
- SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. **STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life**. Nucleic Acids Res, v.43, p. 447-452. 2015.
- THIEME, C. J.; ROJA-TRIANA, M.; STECYK, E.; SCHUDOMA, C.; ZHANG, W.; YANG, L.; MIÑAMBRES, M.; WALTHER, D.; SCHULZE, W. X.; PAZ-ARES, J.; SCHEIBLE, W.; KRAGLER, F. Endogenous *Arabidopsis* Messenger RNAs transported to distant tissues. **Nature Plants**, n.15025, 2015.
- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1993. 372p.
- TIRUMALARAJUA, S. V.; JAIN, M.; GALLO, M. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and –susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. **Journal of Plant Physiology**, v.168, p.481–492, 2011.
- VIRK, N.; ZHANG, H. J.; LI, X. H.; ZHANG, Y. F.; LI, D. Y.; SONG, F. M. Tomato SlMPK4 is required for resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress. **Acta Physiol Plant**. v.35, n.4, p.1211-1221, 2013.
- WESTERICH, J. N.; RODELLA, R. A.; ROSA, J. M. O.; WILCKEN, S. R. S. Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *M. javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.3, p.192-197, 2012.

- WYSS, U., GRUNDLER, F. M. W., AND MUNCH, A. **The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*.** Nematologica. v. 38, p. 98-111, 1992.
- XIAO, S.; CALIS, O.; PATRICK, E.; ZHANG, G.; CHAROENWATTANA, P.; MUSKETT, P.; PARKER, J. E.; TURNER, J. G. The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. The plant journal, v.42, n.1, p.95-110, 2005.
- XING, Y.; JIA, W.; ZHANG, J. AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in *Arabidopsis*. **Plant J**, v.54, p.440–451, 2008.
- YANG, B.; EISENBACK, J. D. ***Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China.** J. Nematol. v. 15, p. 381-391, 1983.
- ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 5th Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ. 944 p. 2010.
- ZHANG, J.; ZOU, D.; LI, Y.; SUN, X.; WANG, N. N.; GONG, S. Y.; ZHENG, Y.; LI, X. B. GhMPK17, a cotton mitogen-activated protein kinase, is involved in plant response to high salinity and osmotic stresses and ABA signaling. **PloS One**, v.9, n.4, 2014.
- ZUCOLOTO, M., SANTOS, J. G., BREGONCIO, I. S., ALMEIDA, G. D., VICENTINI, V. B., MORAES, W. B. & COELHO, R. I. Estimativa de área foliar de goiaba por meio de dimensões foliares do limbo foliar. **Revista Univap**, v.13, n.24, p.1-4. 2006.

ANEXO I

Tabela 1. Resultado da ANOVA da Área Foliar entre as espécies *Psidium guajava* cv ‘Paluma’ e *Psidium friedrichstalianum* aos 26 DAI. GL – Grau de Liberdade; SQ – Soma dos quadrados; MQ – Média dos Quadrados; F – estatística F.

Fonte de Variação	GL	SQ	MQ	F	P
Espécie	1	148,544	148,544	5684,083	<0,001
Nematóide	1	2,288	2,288	87,556	<0,001
Espécie x Nematóide	1	7,809	7,809	298,796	<0,001
Resíduo	8	0,209	0,0261		
Total	11	158,850	14,441		

Tabela 2. Comparação múltipla da Área Foliar entre os grupos na espécie *Psidium guajava* cv ‘Paluma’ e *Psidium friedrichstalianum* aos 26 DAI (método Student-Newman-Keuls). DM – Diferença da média.

Comparação por fator: Espécie					
Comparação	DM	Q	P	P<0,050	
<i>P. guajava</i> x <i>P. friedrichstalianum</i>	7,037	106,622	<0,001	Sim	
Comparação por fator: Nematóide					
Comparação	DM	Q	P	P<0,050	
Inoculado x Não Inoculado	0,873	13,233	<0,001	Sim	
Comparação por fator: Nematóide em <i>P. guajava</i>					
Comparação	DM	Q	P	P<0,05	
Inoculado x Não Inoculado	2,487	26,643	<0,001	Sim	
Comparação por fator: Nematóide em <i>P. friedrichstalianum</i>					
Comparação	DM	Q	P	P<0,05	
Não Inoculado x Inoculado	0,740	7,929	<0,001	Sim	
Comparação por fator: Espécie em Inoculado					
Comparação	DM	Q	P	P<0,05	
<i>P. guajava</i> x <i>P. friedrichstalianum</i>	8,650	92,679	<0,001	Sim	
Comparação por fator: Espécie em Não Inoculado					
Comparação	DM	Q	P	P<0,05	
<i>P. guajava</i> x <i>P. friedrichstalianum</i>	5,423	58,107	<0,001	Sim	

Tabela 3. Resultado da Análise de Variância (ANOVA) da Área Foliar entre a espécie *Psidium friedrichstalianum* aos 26 DAI. GL – Grau de Liberdade; SQ – Soma dos quadrados; MQ – Média dos Quadrados; F – estatística F.

Fonte de Variação	GL	SQ	MQ	F	P
Entre os Grupos	1	0,827	0,827	36,843	0,004
Resíduo	4	0,090	0,022		
Total	5	0,916			

Tabela 4. Comparação múltipla da Área Foliar entre os grupos na espécie *Psidium friedrichstalianum* aos 26 DAI (método Student-Newman-Keuls). DM – Diferença da média.

Comparação por fator: Nematóide				
Comparação	DM	q	P	P<0,050
Não Inoculado x Inoculado	0,742	8,584	0,004	Sim

ANEXO II

Tabela 1. Determinação da concentração de proteínas solúveis totais de folhas de *Psidium* spp. pelo método de Bradford. ACR – Araçazeiro da Costa Rica; Pal – cv ‘Paluma’; I – Inoculado; NI – Não Inoculado; S – Semente; E – Estaca; MF – Massa Fresca.

Amostras	mg PROT/mL de extrato bruto	mg PROT/g MF
	(M dosagem - M branco)/0,5311	[(M dosagem - M branco)/0,5311]*4,8
ACR.I.1.1	0,305	1,464
ACR.I.1.2	0,296	1,421
ACR.I.1.3	0,353	1,694
ACR.NI.1.1	0,256	1,229
ACR.NI.1.2	0,339	1,627
ACR.NI.1.3	0,375	1,800
Pal.I.1.1	0,532	2,554
Pal.I.1.2	0,198	0,950
Pal.I.1.3	0,145	0,696
Pal.NI.1.1	0,081	0,389
Pal.NI.1.2	0,121	0,581
Pal.NI.1.3	0,194	0,931

Tabela 2. Determinação da concentração de proteínas solúveis totais de raiz de *Psidium* spp. pelo método de Bradford. ACR – Araçazeiro da Costa Rica; Pal – cv ‘Paluma’; Hib – Híbrido Carlos Antônio; I – Inoculado; NI – Não Inoculado; MF – Massa Fresca.

Amostras	mg PROT/mL de extrato bruto	mg PROT/g MF
	(M dosagem - M branco)/0,5311	[(M dosagem - M branco)/0,5311]*4,8
ACR.I.1.1	0,119	0,571
ACR.I.1.2	0,112	0,538
ACR.I.1.3	0,091	0,437
ACR.NI.1.1	0,168	0,806
ACR.NI.1.2	0,080	0,384
ACR.NI.1.3	0,114	0,547
Pal.I.1.1	0,347	1,666
Pal.I.1.2	0,198	0,950
Pal.I.1.3	0,118	0,566
Pal.NI.1.1	0,389	1,867
Pal.NI.1.2	0,274	1,315
Pal.NI.1.3	0,216	1,037

ANEXO III

Tabela 1. Lista das proteínas utilizadas para a análise do interactoma em *A. thaliana*. Para cada uma das proteínas temos o Gene ID, o símbolo do gene, nome “popular” (nem todas contem) e o endereço de acesso. Legenda GO dos processos biológicos ($p\text{-value} \leq 5.04\text{e-}10$): 1 – *Defense response*; 2 – *Response to stress*; 3 – *Response to stimulus*; 4 – *Regulation of MAPK cascade*; 5 – *Regulation of intracellular signal transduction*; 6 – *MAPK cascade*; 7 – *Intracellular signal transduction*; 8 – *Regulation of MAP kinase activity*; 9 – *Regulation of protein kinase activity*; 10 – *Positive regulation of response to stimulus*; 11 – *Positive regulation of MAPK cascade*; 12 – *Activation of protein kinase activity*; 13 – *Regulation of response to stimulus*; 14 – *Phosphorylation*; 15 – *Immune system process*.

Gene ID	Símbolo do gene	Outros nomes	GO processos biológicos*	
815364	ATMG00730	COX3	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ATMG00730
844748	ArthCp035	PETA	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/844748
814573	ArthMp015	COX2	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/814573
814620	ArthMp109	COX1	14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/814620
837559	AT1G10210	MPK1	3, 6, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/837559
838159	AT1G15890	F7H2.22	1, 2, 3	AT1G15890, CC-NBS-LRR class disease resistance protein
838470	AT1G18890	CDPK1	3, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/838470
841591	AT1G51660	MKK4	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/841591
841704	AT1G52710	F6D8.4	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=AT1G52710
841771	AT1G53350	F12M16.35	1, 2, 3	AT1G53350, putative disease resistance RPP8-like protein
842139	AT1G57630	T8L23.10	-	AT1G57630, Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
842208	AT1G58390	-	1, 2, 3	AT1G58390, CC-NBS-LRR class disease resistance protein
842210	AT1G58410	F9K23.6	1, 2, 3	AT1G58410 - Necrosis- and ethylene-inducing peptide effect on dicots
842225	AT1G58807	-	1, 2, 3	AT1G58807, putative disease resistance protein RDL5
842232	AT1G59124.1	T4M14.5	-	AT1G59124, putative disease resistance protein (multiple annotations exist)
842411	AT1G61180	F11P17.10	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/842411
842.412	AT1G61190	F11P17.9	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/842412
842.424	AT1G61300	T1F9.21	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/842424
842425	AT1G61310	T1F9.20	1, 2, 3	AT1G61310 - Selenate effect on shoots

842560	AT1G62630	T3P18.19	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/842560
842642	AT1G63360	F2K11.26	1, 2, 3	AT1G63360 - MicroRNA miR159a overexpression effect on flower
842679	AT1G63750	F24D7.6	-	AT1G63750, TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
843516	AT1G71860	PTP1	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/843516
843621	AT1G72900	F3N23.10	-	AT1G72900, Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
843623	AT1G72920	F3N23.12	-	AT1G72920, Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein
843626	AT1G72950	F3N23.15	-	AT1G72950, TIR-NBS class of disease resistance protein
844363	AT1G80230	F18B13.29	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/844363
815364	AT2G07687.1	T17H1.13	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=AT2G07687
815400	AT2G07727	cob	14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/815400
815893	AT2G14080	T22C12.1	-	AT2G14080, TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
816210	AT2G17050	F6P23.20	-	AT2G17050, TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
818058	AT2G34930	F19I3.16	-	AT2G34930, disease resistance family protein / LRR family protein
818429	AT2G38470	WRKY33	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/818429
818982	AT2G43790	MPK6	1, 2, 3, 6, 7, 10, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/818982
820033	AT3G01830	F28J7.16	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/820033
821084	M.; REIS	MPPBETA	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821084
819576	AT3G04210	T6K12.17	-	AT3G04210, TIR-NBS class disease resistance protein
819784	AT3G06110	MKP2	2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 13	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/819784
820235	AT3G10660	CPK2	3, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/820235
820670	AT3G14470	-	1, 2, 3	AT3G14470, NB-ARC domain-containing disease resistance protein
820806	AT3G15640	-	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/820806
821036	AT3G17690	CNGC19	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821036
821400	AT3G18690	MKS1	1, 2, 3, 10, 13, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821400
821463	AT3G19290	ABF4	3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821463
821586	AT3G20410	CPK9	3, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821586
821.676	AT3G21220	MKK5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821676
821717	AT3G21630	CERK1	1, 2, 3, 7, 10, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821717

821824	AT3G22530	-	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/821824
822252	AT3G26470	-	-	AT3G26470, RPW8 domain-containing powdery mildew resistance protein
822343	AT3G27240	-	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/822343
823565	AT3G44400	-	-	AT3G44400, TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
823589	AT3G44630	-	-	AT3G44630, TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
823706	AT3G45640	MPK3	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/823706
823824	AT3G46710	-	1, 2, 3	AT3G46710, putative disease resistance RPP13-like protein 2
823963	AT3G48080	-	1, 2, 3	AT3G48080 - Red light effect on the root
823964	AT3G48090	EDS1	1, 2, 3, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/823964
824348	AT3G51850	CPK13	3, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/824348
824408	AT3G52430	PAD4	1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/824408
824693	AT3G55270	MKP1	1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 13	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/824693
824920	AT3G57530	CPK32	2, 3, 7, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/824920
828151	AT4G01370	MPK4	1, 2, 3, 6, 7, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/828151
827996	AT4G03280	PETC	1, 2, 3	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/13374535
826409	AT4G08500	MEKK1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/826409
826674	AT4G10780	T12H20.8	1, 2, 3	AT4G10780, putative disease resistance protein
827140	AT4G14830	HSP1 DL4510C;	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/827140
827404	AT4G16960	FCAALL.317	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/26200457
828713	AT4G26070	MEK1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/828713
828.830	AT4G27220	M4I22.30	1, 2, 3	AT4G27220, NB-ARC domain-containing disease resistance protein
829103	AT4G29810	MKK2	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/829103
829382	AT4G32470	-	14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/829382
829771	AT4G36140	F23E13.30	-	AT4G36140, putative TIR-NBS-LRR class disease resistance protein
829939	AT4G37830	-	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/829939
831184	AT5G13430	T22N19.80	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/831184

831185	AT5G13440	T22N19.90	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/831185
831345	AT5G14930	SAG101	1, 2, 3, 10, 13	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/831345
832619	AT5G25450	F18G18.190	14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/832619
834081	AT5G40810	MHK7.4	-	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/834081
835759	AT5G56580	MKK6	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/835759

* *p-value* < 1e-10