Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79
on line
ISSN 1808-9968
Dezembro, 2010

Cistatinas e Atividade de Polifenoloxidases em Plantas de Amendoim Inoculadas com *Meloidogyne mayaguensis*

Embrapa

ISSN 1808-9968

Dezembro, 2010

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 79

Cistatinas e Atividade de Polifenoloxidases em Plantas de Amendoim Inoculadas com *Meloidogyne mayaguensis*

Juliana Martins Ribeiro
José Mauro da Cunha e Castro
Natoniel Franklin de Melo
Débora Costa Bastos
Kátia Valevski Sales Fernandes
Márcio dos Santos Teixeira Pinto
Eduardo Alves Gamosa de Oliveira

Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2010

Esta publicação está disponibilizada no endereço: www.cpatsa.embrapa.br
Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:
Embrapa Semiárido
BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3862-1711 Fax: (87) 3862-1744
sac@cpatsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Auxiliadora Coêlho de Lima
Secretário-Executivo: Josir Laine Aparecida Veschi
Membros: Daniel Terao
Tony Jarbas Ferreira Cunha
Magna Soelma Beserra de Moura
Lúcia Helena Piedade Kiill
Marcos Brandão Braga
Gislene Feitosa Brito Gama
Mizael Félix da Silva Neto

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva
Revisor de texto: Sidinei Anunciação Silva
Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva
Tratamento de ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos
Foto(s) da capa: Juliana Martins Ribeiro
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2010): formato digital

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).
É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.
CIP. Brasil. Catalogação na publicação.
Embrapa Semiárido

Cistatinas e atividade de polifenoloxidases em plantas de amendoim inoculadas com Meloidogyne mayaguensis / Juliana Martins Ribeiro [et al.]. - Petrolina; Embrapa Semiárido, 2010.

16 p.: il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 79).

ISSN 1808-9968.

1. Propagação de planta. 2. Muda. 3. *Arachis Hypogea.* I. Título.

CDD 634.421
© Embrapa 2010

Sumário

Resumo 4
Abstract.....6
Introdução 7
Material e Métodos 9
Resultados e Discussão 11
Conclusões..... 23
Agradecimentos 23
Referências 23

Cistatinas e Atividade de Polifenoloxidases em Plantas de Amendoim Inoculadas com *Meloidogyne mayaguensis*

Juliana Martins Ribeiro[1]
José Mauro da Cunha e Castro[2]
Natoniel Franklin de Melo[3]
Débora Costa Bastos[4]
Kátia Valevski Sales Fernandes[5]
Márcio dos Santos Teixeira Pinto[6]
Eduardo Alves Gamosa de Oliveira[7]

Resumo

A busca por fatores de resistência à *Meloidogyne mayaguensis* em plantas imunes ao mesmo é de grande importância para a área de biotecnologia visando a obtenção de imunidade em plantas suscetíveis. Neste contexto, o objetivo da presente pesquisa foi a busca de fatores relacionados com a resistência à *M. mayaguensis* em plantas de amendoim, por meio da análise da atividade das polifenoloxidases e cistatinas em plantas inoculadas e não inoculadas com o referido patógeno. Para isso, foram realizados ensaios com ambas as enzimas, que estão diretamente envolvidas na defesa das plantas contra o ataque de patógenos. Os

[1]Bióloga, D.Sc. em Produção em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br
[2]Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. jose.mauro@cpatsa.embrapa.br
[3]Biólogo, D.Sc. em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. natoniel@cpatsa.embrapa.br
[4]Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Semiárido. débora@cpatsa.embrapa.br
[5]Bióloga, Ph.D. em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. cowpkat@uenf.br
[6]Biólogo, bolsista DCR FACEPE/CNPq, Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. marciostp@yahoo.com.br
[7]Biólogo, bolsista BFT FACEPE, Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. eduardobio@yahoo.com.br

resultados evidenciaram aumento significativo na atividade das polifenoloxidases nas raízes quando comparadas com a mesma nos caules, não havendo, entretanto, diferenças significativas na atividade destas entre plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide. Foi observada a presença de cistatinas em raízes e caules de plantas de amendoim não inoculadas e inoculadas com o nematoide, havendo, entretanto, aumento significativo desta proteína nas raízes que foram inoculadas com o patógeno.

Termos para indexação: expressão proteica, atividade enzimática, fatores de resistência a nematoides, *Arachis hypogaea* L.

Cystatins and Polyphenoloxidases Activity in plants Peanut Inoculated with *Meloidogyne mayaguensis*

Abstract

The search for resistance factors to *Meloidogyne mayaguensis* in immune plants is of great importance to biotechnology area seeking the immunity in susceptible plants. In this context, the objective of the present research was the search of factors related with the resistance to *M. mayaguensis* in peanut plants by means of the analysis of the activity of the polyphenoloxidases and presence of cystatins in plants inoculated and not inoculated with the patogen. For this, assays with polyphenoloxidases and cystatins were accomplished, because these proteins are directly involved in the defense of the plants against the patogens attack. The results evidenced a significant increase in the activity of the polyphenoloxidases in the roots when compared with the same in the stems, not having, however, significant differences in the activity of these between plants inoculated and not inoculated with the nematode. Presence of cystatins was observed in roots and stems of plants of peanut not inoculated and inoculated with the nematode, having, however, a significant increase of this protein in roots that were inoculated with the pathogen.

Index terms: proteic expression, enzymatic activity, nematode resistance factors, *Arachis hypogaea* L..

Introdução

No Estado de Pernambuco, foram produzidas 102.671 toneladas de goiaba em 3.824 hectares, no ano de 2006 (INSTITUTO FNP, 2009). No ano seguinte, a produção foi de 103.108 toneladas em 3.874 hectares; produção superior à do Estado de São Paulo que neste mesmo ano produziu 102.965 toneladas em 4.236 hectares (INSTITUTO FNP, 2010). Entretanto, na última década, problemas fitossanitários têm assolado a cultura da goiabeira no Submédio do Vale do São Francisco. Dentre estes, destaca-se a meloidoginese (*Meloidogyne mayaguensis*) que tem prejudicado a produção da cultura, inviabilizando a exploração econômica de várias áreas produtoras de goiaba (FLORI; CASTRO, 2009).

Produtos químicos avaliados experimentalmente não têm sido eficientes no controle de *M. mayaguensis* (WILLERS, 1997) e, além disso, não existem nematicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para utilização na cultura da goiabeira. Frente às dificuldades encontradas para o manejo do nematóide-de-galhas desta cultura, há necessidade de pesquisas para buscar novas alternativas para o controle desta praga.

Entre as plantas que apresentam potencial biotecnológico para o estudo de fatores relacionados com a resistência a *M. mayaguensis* encontra-se o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), que é uma dicotiledônea utilizada para manejo de áreas contaminadas pelo nematoide por causa da imunidade que apresenta a este patógeno. Guimarães et al. (2005) desenvolveram marcadores moleculares para análogos a genes de resistência a nematoides em amendoim *Arachis* spp. silvestres e Garcia et al. (1996) identificaram marcadores moleculares ligados a genes de resistência a nematoides em *Arachis cardenasii e A. hypogaea.*

A resistência a vários patógenos por parte de algumas plantas, incluindo nematoides, pode ser geneticamente mediada por um único gene dominante de resistência, denominado gene *R* (POCH et al., 2006; CHEN et al., 2007) ou pode ser atribuída a atividades de enzimas específicas expressas durante a infecção (AGRIOS, 1997). As polifenoloxidases são enzimas que geralmente se apresentam elevadas em tecidos infectados, promovendo a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da lesão provocada pelo patógeno, resultando no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas

(AGRIOS, 1997). Campos et al. (2004) constataram que há correlação positiva entre as atividades da peroxidase e da polifenoloxidase, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose em plantas de feijão. Melo et al. (2006) observaram que a atividade das polifenoloxidases, juntamente com outros compostos fenólicos presentes na planta, está diretamente ligada com a resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem nas plantas de café.

Cistatinas são proteínas com capacidade de inibir especificamente as enzimas cisteíno proteases. São encontradas em uma ampla variedade de organismos, incluindo plantas e seres humanos. Nas plantas, estas proteínas compõem um sistema de defesa do organismo contra a invasão por patógenos, inibindo a atividade de suas cisteíno proteases, combatendo a invasão. Nos insetos, as cistatinas inibem proteases intestinais que, uma vez inibidas, não realizam a clivagem proteolítica, inibindo a nutrição do inseto resultando em morte do mesmo por inanição (FRANCO et al., 1999). A atividade biopesticida das cistatinas de plantas contra diferentes tipos de insetos já foi comprovada contra pragas do feijão (MELO et al., 2003; AMIRHUSIN et al., 2004; AGUIAR et al., 2006), da batata (CLOUTIER, 2000; BRUNELLE et al., 2005), entre outras.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a atividade de polifenoloxidases e da presença de cistatinas em plantas de amendoim inoculadas e não inoculadas com o nematoide *Meloidogyne mayaguensis*, visando determinar o envolvimento destas enzimas na resistência ao patógeno em questão.

Material e Métodos

De maneira a constituir culturas-estoque para a extração de proteínas e posterior análise de polifenoloxidases e cistatinas, duas sementes de amendoim (*Arachis hypogea* L.) foram semeadas em sacos plásticos contendo 5 kg de solo autoclavado. Após a germinação, a planta menos vigorosa foi eliminada de modo a se conduzir uma planta em cada saco plástico. Treze dias após a semeadura, 20 plantas de amendoim foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. mayaguensis* e 20 plantas não foram inoculadas de maneira a se obter um controle. Trinta dias depois, as plantas inoculadas e não inoculadas foram individualmente colhidas. Os caules e as raízes foram separados e liofilizados.

As plantas oriundas das culturas-estoque citadas anteriormente foram utilizadas para montar o experimento. O mesmo foi conduzido em delineamento inteiramente cazualisado com dois tratamentos (plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide), uma planta por unidade experimental e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste Tukey a 5%.

As amostras liofilizadas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Foram pesadas 100 mg das amostras maceradas e a elas foi adicionado o tampão de extração (Tris HCL 0,1M pH 8,0; NaCl 0,5M; PVPP 10% e PMSF 2mM) na proporção de 1:10. Os tubos contendo a extração proteica foram colocados em agitador magnético no interior da geladeira durante 4 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada durante 20 minutos a 2.000 g em temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento foi descartado. As proteínas totais extraídas de caules e raízes das plantas de amendoim foram quantificadas, segundo o método de Bradford (1976).

Para o ensaio de atividade das polifenoloxidases foram utilizados 2 μL de cada amostra, 898 μL de tampão citrato-fosfato (pH 6,0; 100 mM) e 100 μL de M-catecol (100mM). A solução de M-catecol foi preparada na hora do ensaio por ser perecível; mantido no gelo e adicionado aos tubos apenas no momento da leitura. Após a adição do M-catecol, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm. Realizou-se uma leitura inicial e uma final decorrido 1 minuto e o valor inicial foi subtraído do valor final. Procedeu-se o cálculo da atividade enzimática das PPOs nas raízes e caules de plantas de amendoim.Considerou-se a variação de 0,01 de absorbância por minuto como uma unidade de atividade (1 UA).

O ensaio para a detecção de cistatinas foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Michaud et al. (1994). Primeiramente, foi preparada uma curva de papaína para averiguar a atividade desta enzima e determinar qual concentração apresentaria densidade ótica com valores de aproximadamente, 0,5 de absorbância. Foram testadas as concentrações de 1 μg, 2 μg, 4 μg, 8 μg e 16 μg de papaína. A densidade óptica das amostras da curva foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 440 nm. Os valores das amostras da curva foram subtraídos dos seus respectivos brancos e, ao final do experimento, constatou-se que a concentração de 16 μg de papaína foi responsável por uma leitura com 0,5 de absorbância.

Determinada a concentração de papaína responsável por uma leitura com 0,5 de absorbância, procedeu-se o início do ensaio de detecção de cistatinas nas amostras. O ensaio foi efetuado em tubos de polipropileno de 1,5 mL; 8μl solução estoque de papaína (2mg/ mL); 20 uL de extrato protéico; 40 uL de tampão citrato-fosfato (100mM de citrato e fosfato de sódio) pH 5,0, Triton X-100 0,1% e DTT 1,5mM, e 80 uL azocaseína 1% (apenas nas amostras). Após a adição das soluções citadas acima, as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C em banho-maria. Decorrido esse período foram adicionados 300μL de TCA 10% em todas as amostras e azocaseína só nos brancos. Realizou-se uma centrifugação durante 5 minutos a 20000g a 4°C, 300 uL do sobrenadante foi recolhido e a ele foram adicionados 300μL de NaOH 1M. Finalmente, a densidade óptica das amostras foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 440nm. Os valores das amostras foram subtraídos dos seus respectivos brancos. Considerou-se a redução de 0,01 de absorbância como uma unidade de inibição (1 UI).

Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças significativas na atividade das polifenoloxidases entre as plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide, tanto em extratos proteicos dos caules (Figura 1), quanto naqueles das raízes (Figura 2). Entretanto, a atividade de polifenoloxidases nas raízes foi 15 vezes maior quando comparadas com a mesma nos caules.

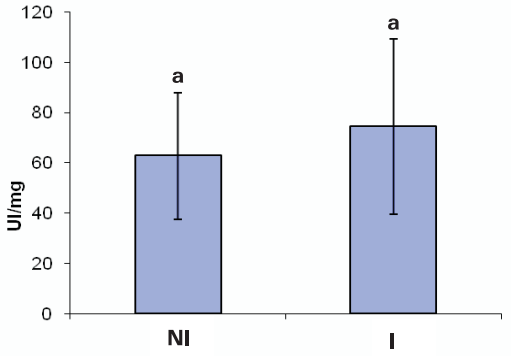

Figura 1: Atividade de polifenoloxidases em caules de plantas de amendoim não inoculados (NI) e inoculados (I) com *Meloidogyne mayaguensis*. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

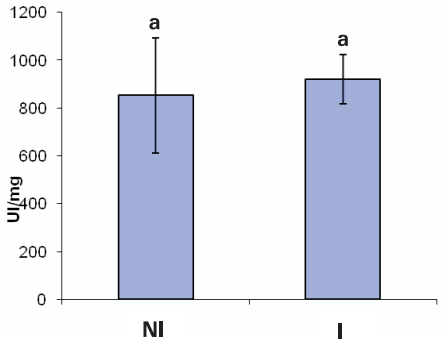

Figura 2: Atividade de polifenoloxidases em raízes de plantas de amendoim não inoculadas (NI) e inoculadas (I) com *Meloidogyne mayaguensis*. Médias acompanhados pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar de vários autores terem constatado relação entre o aumento da atividade das polifenoloxidases e a resistência a determinados insetos e doenças (CAMPOS et al., 2004; RAHMAN e PUNJA, 2005; WUYTS et al., 2006), neste trabalho não foi observada diferença na atividade desta enzima entre as plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide *Meloidogyne mayaguensis*, havendo aumento na sua atividade em raízes, quando comparadas com os caules.

Resultados semelhantes aos verificados neste trabalho foram observados por Komarova e Davidovich (1997), os quais não encontraram diferença na atividade das polifenoloxidases entre plantas de arroz com e sem infecção de ferrugem, independente do grau de resistência das cultivares avaliadas. Da mesma forma, Li et al. (1991) não observaram relação entre a atividade desta enzima e a resistência de cultivares de amendoim à ferrugem.

Melo et al. (2006) observaram a expressão constitutiva de polifenoloxidases em folhas de café, porém, não relacionaram a atividade desta enzima com a resistência das plantas de café a fungos e insetos. Os resultados obtidos indicaram que o processo de resistência poderia estar relacionado não apenas com a atividade constitutiva das PPOs, mas, também, com o potencial oxidativo e a composição de compostos fenólicos do tecido lesionado.

Diferenças significativas entre o nível de atividade das polifenoloxidases foram observadas apenas entre os tecidos da planta analisados neste trabalho, apresentando-se mais elevados nas raízes, indicando ser esta proteína, expressa de forma constitutiva neste tecido das plantas de amendoim. Em vista dos resultados obtidos, não se pode afirmar que a atividade das polifenoloxidases estaria direta e unicamente relacionada com o mecanismo de defesa das plantas de amendoim. Entretanto, a possibilidade da atuação desta enzima como um componente constitutivo de defesa não pode ser descartada, levando-se em consideração a alta concentração da mesma neste tecido. O papel de defesa das PPOs contra nematoides só poderia ser constatado com base em ensaios biológicos realizados com o patógeno (KOSUGE, 1969; VAUGHN et al., 1988).

Observa-se a atividade de inibidores cisteínicos de proteinases (cistatinas) em caules (Figura 3) e em raízes (Figura 4) de plantas de amendoim não inoculadas e inoculadas com o nematoide. Observou-se aumento de aproximadamente 50% nos níveis de tais proteínas nas raízes e caules que foram inoculadas com o patógeno (45% em raiz e 54% em caule).

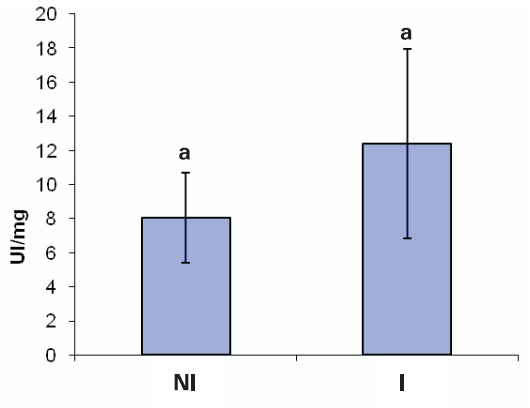

Figura 3. Inibição cisteínica de amostras proteicas de caule de amendoim inoculados (I) e não inoculados (NI) com o nematoide. Médias acompanhados pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Figura 3, não houve diferença estatística na atividade de inibidores cisteínicos de proteinases (cistatinas) em caules de plantas de amendoim inoculadas e não inoculadas com o nematoide. Isso indica ser essa uma resposta não sistêmica, uma vez que houve diferença estatística na atividade de inibidores cisteínicos de proteinases apenas nas raízes das plantas de amendoim inoculadas (Figura 4). Assim como no presente trabalho, Atkinson et al. (1996) observaram aumento na concentração das cistatinas no local de infecção por nematoides. Além disso, os autores também observaram que as cistatinas estavam atuando de forma negativa no crescimento, na fecundidade e na frequência com a qual as fêmeas dos nematoides parasitavam as raízes de plantas.

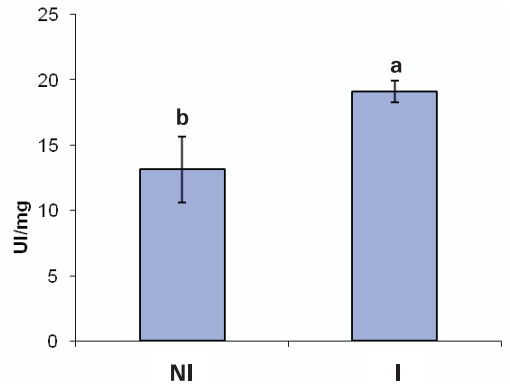

Figura 4. Inibição cisteínica de amostras proteicas de raízes de amendoim inoculadas (I) e não inoculadas (NI) com o nematoide. Médias acompanhados pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade biopesticida das cistatinas contra nematoides também foi relatada por Cowgill et al. (2002), os quais transformaram geneticamente plantas de batata com um gene codificador de uma proteína inibidora de proteinase e observaram que a expressão da cistatina nos tecidos da raiz promoveu resistência ao nematoide *Globodera rostochiensis* pelas plantas de batata transgênica. Da mesma forma, Urwin et al. (1997) transformaram geneticamente *Arabidopsis thaliana* com uma cistatina de arroz modificada e constataram que a expressão desta proteína nas plantas transgênicas reduziu o tamanho e a fecundidade das fêmeas de *Heterodera schachtii* e *Meloidogyne incognita*, impedindo que as mesmas atingissem a idade necessária para produção de ovos.

Michaud et al. (1996) avaliaram o desenvolvimento in vitro de larvas de *Meloidogyne hapla, M. incognita* e *M. javanica* na presença de duas classes de cistatinas de arroz (OCI e OCII) e constataram inibição das proteinases do trato gastrintestinal das larvas pelas cistatinas presentes no ensaio. Da mesma forma, Silva et al. (2004) realizaram testes *in vitro* utilizando uma cistatina purificada de *E.coli* recombinante e observaram alta inibição da atividade de proteinases do trato gastrintestinal de fêmeas de *M. incognita* na presença da cistatina.

Conclusões

— Polifenoloxidase e cistatinas, proteínas classicamente relacionadas com a defesa vegetal contra nematoides, estão presentes em raízes de plantas de *Arachis hypogaea* L. inoculadas e não inoculadas com o nematoide.
— A atividade das polifenoloxidases é mais elevada nas raízes em comparação aos caules das plantas de amendoim, independentemente do fato de as mesmas estarem inoculadas com *M. mayaguensis.*
— O nivel de cistatinas aumenta em raízes e caule de plantas de amendoim quando inoculadas com *M. mayaguensis*.

Agradecimentos

À Embrapa Semiárido, à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, à FACEPE e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

AGUIAR, J. M.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; BLOCH JÚNIOR, C.; MONTEIRO, A. C.; FLORES, V. M.; JACINTO, T.; XAVIER FILHO, J.; OLIVEIRA, A. E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FERNANDES, K. V. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean burchid pests. **Proteins**, New York, v. 63, n. 3, p. 662-670, 2006.

AMIRHUSIN, B.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MURDOCK, L. L.; ZHU-SALZMAN, K. Soycystatin N inhibits proteolysis of wheat alpha-amylase inhibitor and potentiates toxicity against cowpea weevil. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, n. 6, p. 2095-2100, 2004.

ATKINSON, H. J.; URWIN, P. E.; CLARKE, M. C.; McPHERSON, M. J. Image analisys of the growth of *Clobodera pallida* and *Meloidogyne incognita* on transgenic tomato roots expressing cystatins. **Journal of Nematology**, St. Paul, v. 28, p. 209-215, 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNELLE, F.; GIRARD, C.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 60, n. 1, p. 20-31, 2005.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p. 637-643, jul. 2004.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MOREIRA , W. A.; ALMEIDA, M. R. A.; GOMES, A. C. M. M. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 223-228, 2001.

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.

CLOUTIER, C.; JEAN, C.; FOURNIER, M.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, Leptinotarsa decemlineata compensate for nutricional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 44, n. 2, p. 69-81, 2000.

COWGILL, S. E.; WRIGHT, C.; ATKINSON, H. J. Transgenic potatoes with enhanced levels of nematode resistance do not have altered susceptibility to nontarget aphids, **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 821-827, 2002.

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: UNESP, 2009. p. 507-524.

FRANCO, O. C.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M.; GROSSI DE SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos: Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 2, p. 36-40, 1999.

GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SHROEDER, E.; KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 836-845, 1996.

GUIMARÃES, P. M.; JOSÉ, A. C. F. V.; PROITE, K.; BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análogos a genes de resistência em *Arachis* spp. silvestres. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 6, p. 663-667, 2005.

INSTITUTO FNP. **Agrianual**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2009.

_____. **Agrianual**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2010.

LI, D.; WANG, Z. Z.; LIN, K. H. Relationships between activity of several enzymes and peanut resistance to rust. **Journal of South China Agricultural University**, Guangzhou, v.12, p.1-6, 1991.

KOMAROVA, E. P.; DAVIDOVICH, L. A. Involvement of phenolcarbonic acids and phenol-oxidizing enzymes in rye defense necrotic response to leaf rust infection. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 44, p. 749-755, 1997.

KOSUGE, T. The role of phenolics in host response to infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. **7**, p. 195–222, 1969.

MELO, F. R.; MELLO, M. O.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V.; GENÚ, A. M.; SILVA FILHO, M. C.; GLEDDIE, S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Use of phage display to select novel cystatins specific for Acanthoscelides obtectus cysteine proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,** Amsterdam, v. 1651, n.1/2, p. 146-152, 2003.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 67, n. 3, p. 277-285, 2006.

MICHAUD, D.; NGUVEN-QUOC, B.; BERNIER-VADNAIS, N.; FAYNE, L.; YELLE, S. Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, p. 497-503, 1994.

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; JOUANIN, L.; VRAIN, T.C. Identification of stable plant cystatin/nematode proteinase complexes using mildly-denaturing gelatin polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, n. 8, p.1373-1379, 1996.

POCH, H. L. C.; LÓPEZ, R. H. M.; KANAYUKA, K. Functionality of resistance gene Hero, wich controls plant root-infecting potato cys nematode, in leaves of tomato. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 1372-1378, 2006.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 1103–1114, 2005.

SILVA F. B.; BATISTA, J. A. N.; MARRA, B. M.; FRAGOSO, R. F.; MONTEIRO, A. C. S; FIGUEIRA, E. L. Z.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Pro domain peptide of HGCP-Iv cysteine proteinase inhibits nematode cysteine proteinases. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 3, n.3, p. 342-355, 2004.

URWIN, P. E.; LILLEY, C. J.; MCPHERSON, M. J.; ATKINSON, H. J.; Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabdopsis* expressing a modified plant cystatin, **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p .455-461, 1997.

VAUGHN, K. C.; LAX, A. R..; DUKE, S. O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function**, Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. **72,** p .659–665, 1988.

WILLERS, P. The nematode problem of guava is controlled by the nematicide cadusafos. **Inligtingsbulletin Institut vir Tropiese en Subtrpiese Gewasse,** [S.l.], v. 293, p. 10-12, 1997.

WUYTS, N.; WAELE, D. D.; SWENNEN, R. Activity of phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in roots of banana (*Musa acuminate* AAA, cvs Grande Naine and Yangambi km5) before and after infection with *Radopholus similes*. **Nematology**, Leiden, v. 8, n. 2, p. 201-209, 2006.

Embrapa

Semiárido

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

BRASIL
UM PAÍS DE TODOS
GOVERNO FEDERAL

CGPE 9037