

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/54678

IB/ 81958

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CÍNTIA HOTTA ORSI



**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE
SEQÜÊNCIAS DE GENES TIPO *RGA* EM ESPÉCIES DE *Coffea*
RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AO NEMATÓIDE
*Meloidogyne exigua***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CÍNTIA HOTTA ORSI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular na área
de Genética Vegetal e Melhoramento

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to the advisor, Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho.

Orientador: Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho

UNIDADE	IB/81
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	0281
V	EX
TOMBO BC/	54678
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/07/03
Nº CPD	

952

11512, 296157

CH00186343-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Q8i Orsi, Cíntia Hotta
Identificação e análise da expressão de seqüências de genes tipo
RGA em espécies de *Coffea* resistentes e susceptíveis ao nematóide
Meloidogyne exigua / Cíntia Hotta Orsi. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Herculano Penna Medina Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Cafe 2. Genes – expressão. 3. Nematodeos. I. Medina Filho,
Herculano Penna . II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

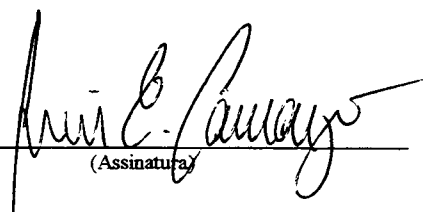
Data da Defesa: 19 de março de 2003

Banca Examinadora

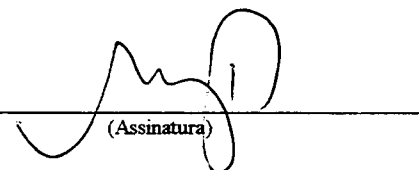
Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho (Orientador)


(Assinatura)

Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo


(Assinatura)

Prof. Dr. Wallace Gonçalves


(Assinatura)

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

(Assinatura)

Ao meu marido, Renato; ao meu filho, Erick; aos meus pais, Júlia e Yoshiki; aos meus novos pais, Cláudia e Antônio Carlos; enfim, a todos os familiares que apoiaram e incentivaram mais esta etapa da minha vida, com muito carinho e amor,

dedico

AGRADECIMENTOS

À tia Mimi (chefe, irmã, mãe, amiga...), ou melhor, Dra. Mirian, a quem devo não apenas ensinamentos científicos, que me ajudaram a crescer academicamente, mas também o crescimento interno, espiritual, lições de vida. Muito obrigada pela paciência, dedicação, amor com que orientou esta tese...

Ao Dr. Medina, a todo auxílio e dedicação que possibilitaram o Mestrado na UNICAMP e a realização desta tese.

Ao Dr. Wallace, pelos ensinamentos e apoio quanto a parte de nematóides em café e pela participação em banca.

Aos professores que participaram da pré-banca, Dr. Celso Benedetti, Dr. Michel Vincentz.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela participação em pré-banca e banca.

À Karla Yotoko, pela indicação do programam Mega e a todo apoio e auxílio para construção da árvore filogenética.

Às meninas do laboratório: Carol, Cris, Denise, Gisa, Marina, Miki, Nicoli e Vanessa, que além de companheiras são amigas, professoras e alunas, que contribuíram muito para o meu crescimento científico e pessoal.

Aos amigos (não cito para não cometer a injustiça de esquecer alguém) que tanto perto quanto longe, bem longe, me incentivaram e apoiaram em todas as circunstâncias.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente com a realização desta tese.

Centros de Pesquisa

Ao Centro de Análise e Pesquisa Tecnológico do Agronegócio do Café "Alcides Carvalho", Instituto Agrônômico, e seus representantes, Fazuoli, Medina, Rita, Guerreiro, Mako, Bernadette, Thomaziello, Flávia, Wallace, Mirian. À secretaria, Rita, Silvia e Aletéia. À Celinha e Edna.

Agradecimento especial a Marlene e Elvis que colaboraram na elaboração e manutenção da casa de vegetação para proliferação e experimentos de nematóide. E a Dona Ivone pela coleta de frutos de café.

Ao Laboratório de Microorganismos e à Dra. Laura, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP, e ao aluno de doutorado Rogério, pela realização de parte dos experimentos e apoio técnico e afetivo dos integrantes deste laboratório.

Ao Centro de Genética, Biologia Molecular e Fitoquímica e ao Dr. Carlos Colombo, pela realização de parte dos experimentos e apoio técnico. À todos os integrantes deste Centro com quem compartilhei grande parte de minha tese, em especial a Andréa.

À Secretaria de pós-graduação do Instituto de Biologia e à Secretaria de pós-graduação da Genética.

ÍNDICE

RESUMO	x
SUMMARY	xi
INTRODUÇÃO	1
1. Café	1
2. Mecanismos de resistência em plantas	2
3. Genes de resistência (genes R)	3
4. Patogenicidade e Resistência a Nematóides em Plantas	6
4.1. Características e importância econômica de fitonematóides.....	6
4.2. Ciclo de vida dos nematóides	7
4.3. Resistência natural do hospedeiro (HPR – host plant resistance) e obtenção de resistência	9
4.3.1. Respostas moleculares do hospedeiro	9
4.3.2. Resistência natural do hospedeiro (HPR)	11
4.4. Nematóide e o café – enfoque ao <i>M. exigua</i>	12
4.5. Genes de resistência a nematóides	14
5. Programa de melhoramento do cafeeiro	15
OBJETIVOS	17
Capítulo 1. Amplificação e identificação de análogos de genes de resistência em espécies do gênero <i>Coffea</i>	18
1.1. Introdução	19
1.2. Material e Métodos	20
1.3. Resultados e Discussão	24
Capítulo 2. Análise da expressão de RGAs em genótipos resistentes e susceptíveis ao nematóide <i>Meloidogyne exigua</i>.....	42
2.1. Introdução	43
2.2. Material e Métodos	44
2.3. Resultados e Discussão	51
CONCLUSÕES	65

CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
APÊNDICE	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ARTIGO 1 (submetido para Genome)	79

ÍNDICE DAS FIGURAS

INTRODUÇÃO

1. Representação das estruturas protéicas deduzidas dos genes R e um modelo de reconhecimento de produtos Avr para a ativação da defesa da planta	5
2. Representação esquemática dos RGAs apresentando os domínios protéicos conservados e os <i>primers</i> desenhados a partir desses domínios.....	6
3. Estrutura protéica provável de genes de resistência a nematóides.....	15

Capítulo 1 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Testes de amplificação por PCR.....	25
1.3.2. Fragmentos amplificados por KIN/EGF e KIN/MHD para clonagem e sequenciamento	26
1.3.3. Alinhamento de seqüências de café com seqüências do banco de dados	28
1.3.4. Seqüências amplificadas em a partir de <i>primers</i> heterólogos de RGAs	29
1.3.5. Árvore gênica das seqüências nucleotídicas de RGAs em café obtida pelo índice de Neighbor-joining com distância-p	33
1.3.6. Possível origem da seqüência híbrida de Icatu Vermelho.....	33
1.3.7. (A) Amplificação de fragmentos de RGA utilizando os <i>primers</i> KIN e MHD2 para posterior purificação e digestão dos fragmentos com enzimas de restrição. (B) Padrão obtido a partir da digestão dos fragmentos de (A).....	39
1.3.8. Análise de <i>Southern blot</i> de DNA total de <i>C. arabica</i> (MN) e <i>C. canephora</i> (AP) utilizando sonda radioativa de fragmento correspondente a RGA.....	41

Capítulo 2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Origem da linhagem CH4782 de Icatu Vermelho	44
2.2.2. Preparação de mudas para avaliação da resistência e susceptibilidade ao nematóide <i>Meloidogyne exigua</i>	46
2.2.3. Cultivo de nematóides e inoculação para avaliação da resistência	47
2.2.4. Padrões de resistência e susceptibilidade ao nematóide <i>M. exigua</i>	48

Capítulo 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Amplificação de RGAs expressos em AP e MN por diferentes pares de <i>primers</i>	51
2.3.2. Seqüências de cDNA identificadas como RGA.....	52
2.3.3. Porcentagem de plantas com IG menor ou igual a 2 e reações do cafeeiro (resistente/ susceptível) aos 120 dias após a inoculação com 5.000 ovos de uma população de <i>M. exigua</i>	53
2.3.4. Avaliação da expressão de RGAs por RT-PCR, ao longo do tempo após a inoculação de ovos de nematóides em plantas resistentes e susceptíveis.....	55
2.3.5. Análise da expressão de RGAs por RT-PCR em progênies irmãs de Icatu Vermelho, resistentes e	

susceptíveis a <i>M. exigua</i>	57
2.3.6. Digestão com a enzima de restrição <i>MseI</i> dos fragmentos amplificados por PCR a partir do DNA total de AP, e por RT-PCR a partir do cDNA de AP 10 dias pós-infecção.....	58
2.3.7. Paralelo entre ciclo de vida do nematóide e padrão de expressão de RGAs em café.....	63
2.3.8. Representação esquemática de um possível modelo para a participação de RGAs na resistência a nematóides. Modelo baseado no padrão de expressão obtido pela amplificação de cDNAs de progênies segregantes de Icatu Vermelho.....	64

ÍNDICE DAS TABELAS

INTRODUÇÃO

1. Classes dos Genes R caracterizados	4
2. Ciclo biológico de <i>M. exigua</i> em cafeeiro Mundo Novo	9

Capítulo 1 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Classificação para resistência aos principais patógenos do gênero <i>Coffea</i> nos genótipos analisados	37
1.3.2. Fragmentos de restrição gerados pela enzima <i>MseI</i> para as seqüências de RGA.....	38

Capítulo 2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Genótipos utilizados para a análise da expressão de RGAs	45
2.2.2. Índice de galhas (IG) para avaliação de resistência e susceptibilidade a nematóides	48

Capítulo 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Índice de galhas (IG) para avaliação de resistência e susceptibilidade a nematóides.....	53
---	----

RESUMO

O café é um dos produtos agrícolas de maior interesse econômico nacional. Apesar do Brasil ser o principal exportador e produtor de café, vem sendo observado, nos últimos anos, um declínio da produtividade, sendo uma parcela decorrente de fatores climáticos e fitossanitários, como pragas e doenças. Portanto, o estudo dos mecanismos de resistência a patógenos é de extrema importância para o melhoramento do cafeeiro. Até o momento, existem poucos estudos moleculares de interação patógeno-planta em café, sendo assim imprescindível a identificação e caracterização de genes envolvidos nesse processo.

A identificação de análogos de genes de resistência, RGAs, tem sido feita baseada na homologia dos domínios protéicos de sítio de ligação a nucleotídeos e região rica em leucina (NBS-LRR) que permite a amplificação destas regiões em diferentes genomas vegetais. Através desta metodologia, foram identificadas duas famílias distintas de RGAs em diferentes espécies de *Coffea*, incluindo espécies resistentes a diferentes patógenos e a espécie altamente susceptível *C. arabica*. Dentre as seqüências identificadas, foi encontrada baixa diversidade, sendo que a variabilidade existente foi caracterizada principalmente por mutações pontuais e pequenas deleções/inserções de nucleotídeos.

Em outra etapa, visando o estudo dos mecanismos de resistência a nematóides, foi avaliada a expressão de RGAs em plantas de café resistentes e susceptíveis, na presença e ausência do nematóide *Meloidogyne exigua*. Como resultado desta avaliação foi observada a expressão basal de RGAs em raízes não-inoculadas. Além disso, verificou-se que plantas resistentes e susceptíveis apresentaram padrões distintos de expressão de RGAs, observados ao longo do tempo após a inoculação de *M. exigua*.

O desenvolvimento desta tese representa o primeiro passo para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência de café a nematóides. Estudos de regulação gênica assim como de transdução de sinal são os próximos passos para a elucidação deste mecanismo de resistência da planta.

SUMMARY

Coffee is one of the most important crops of Brazilian agriculture. Productivity decrease has been observed during last years, mainly due to climate factors and pathogen infections. Therefore, studies that help to elucidate pathogen resistance mechanisms are extremely important for coffee breeding programs. At this moment, there are few analyses focusing on coffee plant-pathogen molecular interaction. Therefore, for an understanding of this interaction it is necessary the identification and characterization of genes involved in this process. Identification of resistance genes analogs, RGAs, has been made based on the homology of protein domains of nucleotide binding site and leucine rich region (NBS-LRR), which permits the amplification of these regions in different plant genomes. Through this methodology, two distinct RGA families have been identified in different species of the genera *Coffea*, including pathogen resistant and susceptible species. Among the identified sequences, a low diversity was observed and the variability available was characterized by punctual mutation and small deletion/insertions of nucleotides.

In other study aiming the characterization of RGA in defense mechanisms in coffee, RGAs expression in resistant and susceptible coffee plants, in the presence and absence of nematode *M. exigua*, was investigated. RGAs basal expression was observed in non-inoculated roots of both resistant and susceptible plants. Besides, it was verified that resistant and susceptible plants present distinct RGAs expression pattern, observed during *M. exigua* root infection.

This dissertation represents the first step to the understanding of molecular mechanisms involved in coffee plant resistance to pathogens. Gene regulation and signal transduction studies are the next steps for a complete elucidation of resistance mechanism in this species.

INTRODUÇÃO

1. Café

O café é considerado um dos principais produtos agrícolas no mercado internacional, cuja produção, comercialização e consumo envolvem vários países. Sua popularidade deve-se ao efeito estimulante de sua bebida, obtida dos grãos torrados das duas principais espécies cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* e *C. canephora*. Apesar da grande importância econômica, a produção e a exportação brasileira e mundial do café tem sofrido queda. Essa redução é atribuída não só ao aumento verificado no percentual total das exportações mundiais, como também a outros fatores que têm contribuído para oscilações na sua produção total. Dentre esses fatores destacam-se os climáticos, como secas e geadas, e os fitossanitários, dentre os quais evidenciam-se os nematóides (Gonçalves, 1999).

O café comercializado mundialmente é representado em 70% por *C. arabica* L. e em 30% por *C. canephora* Pierre ex Froehner. Apesar de somente duas espécies terem importância econômica, as espécies selvagens têm grande importância do ponto de vista adaptativo. Algumas encerram características altamente vantajosas como resistência a doenças e pragas, tolerância à seca e outras variações do ambiente, bem como características das plantas (sistema radicular, folhas, flores, frutos, etc.). *C. arabica* é a espécie nobre de café, possuindo boa qualidade de bebida. Esta espécie é nativa de uma região restrita, marginal às demais espécies e localizada no sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia (Chevalier, 1947; Fazuoli *et al.*, 1999). A espécie *C. canephora* é altamente comercializada, mesmo possuindo alto teor de cafeína e de sólidos solúveis que propiciam uma bebida de qualidade inferior quando comparado ao café arábica. Esta espécie possui distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo nas regiões ocidental e central tropical e subtropical do continente africano, compreendendo a República de Guiné, Libéria, Sudão e Uganda (Chevalier, 1947). A variabilidade existente dentro dessa espécie é muito grande, principalmente em relação ao tamanho e forma da planta, folhas, frutos e sementes. Além disso, possui variabilidade quanto à resistência a patógenos. Um exemplo desta variabilidade genética é a variedade Apotã (IAC 2258) de *C. canephora*, utilizada como porta-enxerto de *C. arabica* devido à resistência a

nematóides (Fazuoli, 1981). As outras espécies de café não são cultivadas economicamente, mas ocorrem de forma silvestre e possuem variabilidade elevada para muitas características, principalmente resistência a doenças, pragas e nematóides (Fazuoli *et al.*, 1999). A espécie *C. racemosa*, além de resistência a patógenos, possui resistência ao bicho mineiro (Guerreiro Filho *et al.*, 1999), resistência à seca e folhas decíduas.

Quanto à biologia da reprodução, *C. arabica* é tetraplóide com $2n=44$ cromossomos, autocompatível e multiplica-se predominantemente por autofecundação, que ocorre em aproximadamente 90% das flores. Por outro lado, *C. canephora* e as outras espécies conhecidas do gênero *Coffea* são diplóides, possuindo $2n=22$ cromossomos. Estas são autoincompatíveis e multiplicam-se exclusivamente por fecundação cruzada (Fazuoli *et al.*, 1999; Berthaud, 1980).

A obtenção de híbridos de interesse comercial é um dos principais objetivos do melhoramento do cafeeiro. Um dos híbridos de café mais comercializado, cujos progenitores são *C. arabica* e *C. canephora*, é a variedade Icatu Vermelho de *C. arabica*. Esta variedade híbrida possui resistência a *Hemileia vastatrix*, causador da ferrugem, um dos principais patógenos que atacam o cafeeiro (Carvalho & Fazuoli, 1993). Trata-se de um exemplo significativo do aproveitamento de uma espécie diplóide no melhoramento do cafeeiro *C. arabica*.

Atualmente, os avanços das técnicas moleculares permitem uma manipulação mais eficiente das características encontradas em espécies selvagens. Um exemplo desta aplicação biotecnológica foi a transformação de espécies de café, *C. canephora* e *C. arabica*, utilizando o gene *cryIAc* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência ao bicho mineiro e a outros insetos em café (Leroy *et al.*, 2000). Até este momento, a obtenção de variedades resistentes a doenças e pragas em café tem sido feita através de métodos tradicionais de melhoramento, onde genes de interesse são introduzidos através de cruzamentos.

2. Mecanismos de resistência em plantas

As plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa contra patógenos. Os mecanismos das interações entre planta-patógeno já são bem conhecidos, porém, pouco se sabe em nível molecular/genético sobre estas interações (Cordeiro & Sá, 2000). Dois tipos de interações são observados, a interação compatível (planta susceptível) e a interação

incompatível (planta resistente). Estas diferem-se basicamente pela presença ou ausência de um gene de resistência na planta (gene R) e de um gene de avirulência no patógeno (gene Avr). O reconhecimento do produto do gene avr pela proteína produzida pelo gene R da planta, seja por interação direta ou indireta dos produtos (Hulbert *et al.*, 2001) permite a ativação rápida do processo de defesa. Relacionados com a interação incompatível, dois mecanismos de defesa estão envolvidos, a resposta por hipersensibilidade (HR) e a resistência sistêmica adquirida (SAR). A HR é caracterizada por uma resposta rápida em que é induzida morte celular na região de infecção pelo patógeno. Neste processo, ocorre produção de compostos antimicrobianos, formação de lignina, explosão oxidativa e aumento da expressão de genes relacionados a patogenicidade. Estas respostas limitam a posterior multiplicação do patógeno nas células infectadas (Jia *et al.*, 2000). A SAR se manifesta através da ativação coordenada de genes de defesa (genes SAR), em sítios distantes ao da infecção, proporcionando um estado de imunização temporária da planta a uma subsequente infecção patogênica (Cordeiro & Sá, 2000). Acredita-se que os genes R estejam envolvidos no desencadeamento desses mecanismos de defesa.

3. Genes de resistência (Genes R)

A maioria dos genes de resistência foi caracterizada pela genética clássica como tendo herança monogênica. Isso facilitou a aplicação de estratégias genéticas para a clonagem de genes R. A partir da década de 80 muitos genes foram clonados através das técnicas de *transposon tagging* e clonagem baseada em mapa. Dessa forma, já foram identificados genes envolvidos na defesa a patógenos diversos em várias espécies, tais como o gene *Rps2* de *Arabidopsis thaliana* (Bent *et al.*, 1994); o gene *Ha2* de cevada (*Hordeum vulgare*) e o *Cre3* de trigo (*Triticum aestivum*), que confere resistência a nematóides dos cistos (Krestschmer *et al.*, 1997; Lagudah *et al.*, 1997). Análises de seqüências destes genes demonstraram que alguns compartilhavam domínios conservados mesmo em espécies diferentes (Staskawicz, 2001). A presença destes domínios protéicos deduzidos possibilitou a divisão dos genes em classes, apresentadas na tabela 1 e esquematizadas na figura 1.

Tabela 1: Classes dos Genes R caracterizados (adaptado de Hulbert *et al.*, 2001).

Classe	Gene	Estrutura protéica deduzida
1	<i>L, M, N, P, RPP1, RPP5, RPS4</i>	TIR-NBS-LRR
	<i>Bs2, Dm3, Gpa2/Rx1, I2, Mi, Mla, Pib, Pi-ta, Prf, Rpl, RPM1, RPP8/HRT, RPP13, RPS2, RPS5, Rx2, Sw-5, Xa1</i>	NBS-LRR
2	<i>Cf-2/5, Cf-4/9</i>	LRR-TM
3	<i>Pto</i>	Proteína quinase
4	<i>Xa21</i>	LRR-TM-kinase

A maioria dos genes isolados até o momento pertencem à Classe 1, que apresenta genes com estrutura molecular semelhante. Esta estrutura inclui um sítio de ligação de nucleotídios, ou NBS (*nucleotide-binding site*) e um domínio de repetição de leucinas, ou LRR (*leucine-rich repeat*) (Baker *et al.*, 1997; Staskawicz, 2001). Devido a essas semelhanças, bioquímicas e estruturais, uma nova estratégia tem sido utilizada para a identificação desses genes através da sua amplificação direta de genomas. Esta estratégia está baseada no estabelecimento de oligonucleotídeos degenerados, obtidos a partir do alinhamento de seqüências de diversos genes, já identificados e caracterizados, contendo seqüências que codificam para os domínios NBS e LRR (Altschul *et al.*, 1990; Staskawicz, 2001). Isso é possível devido à presença de regiões conservadas principalmente dentro do domínio NBS (Figura 2). Estes genes, identificados através desta estratégia, têm sido genericamente chamados de análogos de genes de resistência (RGA - *resistance gene analogs*). A identificação de RGAs por amplificação utilizando-se de *primers* heterólogos já foi realizada em trigo e cevada (Seah *et al.*, 1998), em soja (Yu *et al.*, 1996), em tomate (Leister *et al.*, 1996), em arroz (Mago *et al.*, 1999), em milho (Collins *et al.*, 1998) entre outros. Até o presente mais de 500 seqüências foram identificadas como RGAs em diferentes espécies de plantas (Staskawicz, 2001). Em *C. arabica* e *C. canephora*, algumas famílias de RGAs do tipo NBS-LRR foram identificadas por esta estratégia de amplificação direta (Noir *et al.*, 2001)

O interesse na comprovação da participação desses genes na interação patógeno-planta vem crescendo cada vez mais (Fernandez *et al.*, 2001). Estudos teóricos sugerem que o produto destes locos esteja relacionado com a regulação da expressão de outros genes de defesa. Assim, a presença do domínio protéico NBS sugere que a ligação de ATP ou GTP seja necessária para a função desses genes, indicando uma possível função de fosforilação de proteínas (Milligan *et*

al., 1998). Também, o domínio LRR sugere interações proteína-proteína como acontece em diferentes organismos (Milligan *et al.*, 1998). Os RGAs do tipo NBS-LRR representam uma classe de genes de resistência que formam uma superfamília gênica, organizadas em *clusters* ao longo do genoma (Kanazin *et al.*, 1996; Leister *et al.*, 1998; Williamson, 1998; Graham *et al.*, 2000). A denominação de superfamília é dada pelo fato dos genes serem subdivididos em famílias, caracterizadas pelos grupos de ampliações e/ou grupos de hibridações formados (Spielmeyer *et al.*, 1998).

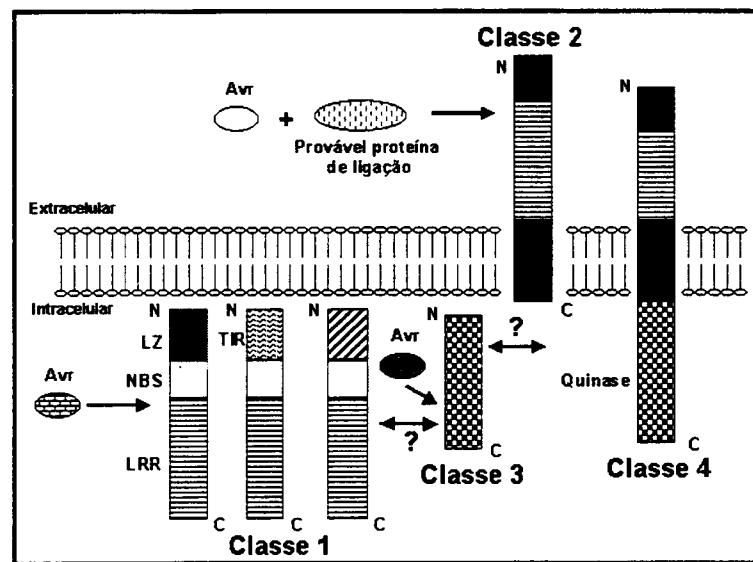


Figura 1: Representação das estruturas proteicas deduzidas dos genes R e um modelo de reconhecimento de produtos Avr para a ativação da defesa da planta (adaptado de Hammond-Kosack & Jones, 1997). Abreviações: LZ, provável região zíper de leucina; TIR, região com homologia ao domínio citoplasmático dos receptores Toll de drosófila e interlucina-1 de humanos; LRR, domínio de repetição rica em leucina; NBS, domínio de ligação a nucleotídeos; N, extremidade amino; C, extremidade carboxil. Os genes correspondentes às classes 1, 2, 3 e 4 estão apresentados na tabela 1.

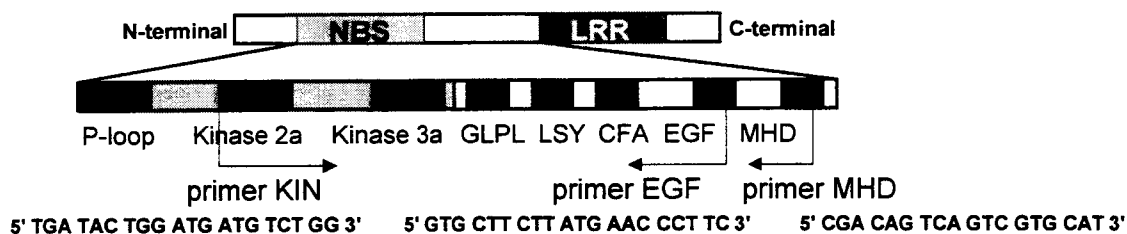


Figura 2: Representação esquemática dos RGAs apresentando os domínios proteicos conservados e os *primers* desenhados a partir desses domínios.

4. Patogenicidade e Resistência a Nematóides em Plantas

4.1. Características e importância econômica de fitonematóides

Os nematóides parasitas de plantas pertencem ao Filo Nematoda e são parasitas obrigatórios que se alimentam apenas do citoplasma de células vivas de plantas (Williamson & Hussey, 1996). Estes podem ser divididos em ectoparasitas e endoparasitas. Os ectoparasitas vivem fora do hospedeiro, onde o nematóide consegue completar o ciclo de vida, causando grandes danos na raiz e podendo ser importantes vetores de vírus (Brown *et al.*, 1995). Dentre os endoparasitas encontram-se os migratórios e os sedentários. Apesar dos endoparasitas migratórios ocasionarem necrose massiva devido à movimentação através da raiz, são os endoparasitas sedentários da família Heteroderidae que causam os principais danos na agricultura mundial (Williamson & Hussey, 1996).

A família Heteroderidae pode ser dividida em dois grupos: os nematóides dos cistos, que incluem os gêneros *Heterodera* e *Globodera*; e os nematóides formadores de galha, gênero *Meloidogyne*. Os nematóides dos cistos são parasitas comuns de plantas cultivadas em clima temperado e seus hospedeiros se restringem a algumas famílias relacionadas entre si. Em contraste, os nematóides formadores de galha são mais freqüentes em áreas de climas amenos e quentes e a amplitude de hospedeiros que eles atingem é extremamente grande. A espécie *M. incognita* é responsável pela maior parte dos danos causados à agricultura. Estes são capazes de reproduzir-se em mais de 2000 espécies de plantas descritas até o momento (Jung & Wyss, 1999).

Os fitonematóides são responsáveis por ações traumáticas, espoliadoras e tóxicas nas plantas hospedeiras, sendo o dano causado variável com a espécie, nível populacional,

hospedeiro, condições ambientais e outros fatores. Muitos dos processos fisiológicos da planta hospedeira como respiração, fotossíntese, absorção e translocação de água e nutrientes, balanço hormonal, assim como, deformações morfológicas e anatômicas podem ser afetados direta ou indiretamente pelo parasitismo do nematóide (Gonçalves & Silvarolla, 2001). Dentre os sintomas da planta hospedeira estão baixa produção de frutos, redução de crescimento, e susceptibilidade a outros patógenos (Williamson, 1998).

4.2. Ciclo de vida dos nematóides

Os nematóides dos cistos e formadores de galhas passam a maior parte do tempo de sua vida ativa do interior das raízes da planta hospedeira. As larvas ou juvenis de segundo estágio (J2) são atraídas para a zona de alongamento, onde penetram na raiz e então, migram intercelularmente, separando células na lamela média no tecido cortical. Este processo parece incluir tanto força mecânica quanto a participação de secreções enzimáticas do nematóide (Williamson & Hussey, 1996). Em *Arabidopsis*, a larva infestante migra em direção a ponta da raiz e então retorna para a região do meristema apical causando grandes danos celulares. Posteriormente, migra de volta para o cilindro vascular em diferenciação até alcançar a zona onde o protoxilema começa a se desenvolver. Nesta etapa, o nematóide inicia elaboradas mudanças morfológicas e de desenvolvimento nas células da raiz do hospedeiro. Embora os sítios de alimentação de nematóides dos cistos e formadores de galhas sejam parecidos, ambos são formados por células multinucleadas, muito grandes e metabolicamente ativas, a indução para o desenvolvimento desses sítios parece envolver mecanismos diferentes. Enquanto que a dissolução da parede celular seguida da fusão celular origina um sítio de alimentação sincicial de nematóides dos cistos, a expansão celular e a divisão nuclear originam as células gigantes na infecção por nematóides formadores de galhas (Williamson & Hussey, 1996).

Em nematóides formadores de galha, *Meloidogyne*, células parenquimatosas do xilema são selecionadas para se desenvolver em células gigantes (Sijmons, 1993; Milligan *et al.*, 1998), embora a indução de células gigantes a partir de células do periciclo, córtex e mesmo de células epiteliais tenha sido observada (Bird, 1996). Cada célula gigante é desenvolvida a partir da injeção de secreções salivares, através de uma estrutura do nematóide denominada estilete. Nesta etapa, as secreções se originam da glândula esofágica dorsal (Hussey, 1989) e

são de origem diferente das secreções secretadas durante a migração. Estas secreções iniciam grandes respostas celulares tais como o sincronismo da divisão nuclear sem citocinese, invaginação da parede celular e hipertrofia dos tecidos parenquimatosos. Células corticais e do periciclo ao redor de células gigantes se expandem e se dividem, resultando na formação de uma galha ou nódulo, que deforma e compromete funcionalmente as raízes. É importante salientar que a célula gigante é consequência primária na interação de parasitismo enquanto a galha é resposta secundária neste processo (Bird & Koltai, 2000). O modo como os nematóides alteram o desenvolvimento celular para a produção e manutenção de células gigantes é uma questão de grande interesse e que ainda não foi solucionada.

A maioria das espécies do gênero *Meloidogyne* reproduz-se por partenogênese, embora machos sejam encontrados em condições de estresse nutricional. As fêmeas produzem centenas de ovos que são depositados em uma massa constituída de uma matriz gelatinosa. No caso de *M. exigua*, em cafeeiro, as massas de ovos são depositadas no interior do tecido radicular da planta, diferentemente de *M. incognita* que deposita os ovos em contato com o solo na superfície da raiz (Gonçalves & Silvarolla, 2001). O ciclo de vida inclui seis estádios: o ovo, quatro estádios juvenis e um estágio adulto. No interior do ovo desenvolve-se um juvenil de primeiro estágio. Pode ocorrer, então a primeira ecdise originando o J2 que, com ajuda do estilete, perfura a casca do ovo e o abandona. O J2 penetra nas raízes das plantas, passando por mais três ecdises e finalmente atinge o estágio adulto (Gonçalves & Silvarolla, 2001). As fêmeas sedentárias, em formato de bulbo, começam a depositar os ovos por volta da quarta semana após a infecção à temperatura de 30°C. O tempo para a oviposição depende das espécies tanto do nematóide quanto da planta e das condições ambientais.

Na interação de *M. exigua* com raízes de café susceptíveis a ele ocorre a formação de células gigantes bem desenvolvidas, sem a presença de necrose ao seu redor e agrupadas em número de duas a cinco no centro do cilindro central (Mendes *et al.*, 1977). Os efeitos histopatológicos provocados por *M. exigua* foram evidenciados pelo colapso dos feixes vasculares, dilaceração dos tecidos corticais pela migração dos juvenis, massas de ovos e expansão do corpo da fêmea durante seu desenvolvimento (Mendes *et al.*, 1977). A formação de células gigantes em cafeeiros de diversos acessos de *C. arabica* da Etiópia inoculados com *M. incognita* foi estudada por Anzueto e colaboradores (2001). Os autores constataram que,

em cafeeiros susceptíveis, estas estruturas eram bem desenvolvidas, enquanto nas plantas resistentes as mesmas apresentavam-se reduzidas e com formação anormal.

A duração do ciclo biológico de *M. exigua* em cafeeiro de Mundo Novo está apresentada na tabela 2. Taylor e Sasser (1978) descrevem que para *M. naasi* em plântulas de trigo a penetração da maior parte de J2 acontece 24 horas após a inoculação de larvas, e tornam-se sedentárias de 2-3 dias e a diferenciação sexual é visível depois de 12 dias.

Tabela 2: Ciclo biológico de *M. exigua* em cafeeiro Mundo Novo (Lima e Ferraz, 1985a, b).

Fases		Duração (dias)
Fase embriogênica (25-30°C)	Ovo a juvenil do 2º estágio (J2)	11 - 15
Fase pós-embriogênica (28°C)	2º estágio juvenil (infestante)	9 - 11
	3º e 4º estágio juvenil	4 - 5
	Pré-oviposição da fêmea	8 - 11
	TOTAL	32 - 42

O sistema ecológico em que vive o fitonematóide é uma complexa inter-relação entre parasito, planta hospedeira, condições ambientais e propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Gonçalves & Silvarolla, 2001). Portanto, a duração de cada estágio do ciclo e a intensidade dos danos causados não podem ser padronizadas, porém, podem ser comparadas em um mesmo ensaio para avaliação de resistência.

4.3. Resistência natural do hospedeiro (HPR – host plant resistance) e obtenção de resistência

4.3.1. Respostas moleculares do hospedeiro

As plantas hospedeiras apresentam diferentes graus de resistência. Quando a reprodução do nematóide é normal, isto é, uma grande porcentagem de juvenis que penetram ou se alimentam de suas raízes, se desenvolvem e produzem muitos ovos, a planta hospedeira é altamente susceptível. Do ponto de vista parasitológico ou nematológico, a resistência a nematóides se caracteriza na planta como uma inibição à reprodução dos nematóides, variando desde moderada a absoluta, conforme os efeitos na reprodução normal do nematóide em

relação à penetração, desenvolvimento e produção de ovos (Taylor & Sasser, 1978). Já o conceito fitopatológico considera não apenas a reprodução como também o dano causado à planta como um todo, desde a raiz até a parte aérea (Gonçalves & Silvarolla, 2001).

Nas plantas altamente susceptíveis, os nematóides multiplicam-se rapidamente e uma pequena infestação inicial em curto espaço de tempo resulta em intensa infestação e severos danos à produção (Taylor e Sasser, 1978). A atração, penetração e migração dos nematóides até as células do cilindro central da raiz ocorrem de maneira similar tanto em plantas susceptíveis quanto em plantas resistentes. Contudo, nas plantas resistentes pode não ocorrer o desenvolvimento das células gigantes, mas sim, necrose ou resposta por hipersensibilidade (HR) no local ou próximo ao sítio de alimentação (Milligan *et al.*, 1998). Em outros casos, o desenvolvimento é reduzido e com formação anormal, como foi observado em infecção de cafeeiros por *M. incognita* (Anzueto *et al.*, 2001). Na ausência da fonte de alimentação, os nematóides morrem ou deixam as raízes.

As complexas alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem durante o estabelecimento dos sítios de alimentação são consequência da alteração da expressão gênica no hospedeiro (Sijmons, 1993; Sijmons *et al.*, 1994). As respostas moleculares são resultado tanto dos mecanismos de defesa da planta quanto dos mecanismos para o estabelecimento e manutenção dos sítios de alimentação. A interpretação da regulação da expressão gênica no hospedeiro é uma tarefa complicada, já que muitos dos genes identificados na resposta são membros de famílias multigênicas com regulação complexa (Williamson & Hussey, 1996). Além disso, os níveis de fitormônios também estão acima do normal em raízes infectadas por nematóides formadores de galhas, mostrando que a resposta à infecção por nematóide é um sistema muito mais complexo (Bird & Koltai, 2000). A indução de proteínas relacionadas a patogenicidade (PR) em folhas de batata após a inoculação por nematóides dos cistos (Hammond-Kosack *et al.*, 1989), assim como a indução de genes de defesa, incluindo peroxidases, quitinases, lipoxigenases e inibidores de proteinases, em raízes de tomate após a infecção com nematóides do gênero *Meloidogyne* (Williamson & Hussey, 1996), são algumas das respostas moleculares de defesa não específica observadas na infecção de nematóides em plantas resistentes a estes patógenos.

Morfologicamente, as transformações que ocorrem para o desenvolvimento da célula gigante podem ser comparadas àquelas observadas no desenvolvimento do xilema, tais como

densidade citoplasmática elevada com aumento no número de organelas, redução do tonoplasto, endorrepliação cromossômica, e deposição secundária da parede celular. Com isso, Bird (1996) propõe que os precursores para o desenvolvimento da célula gigante recebem inicialmente uma sinalização para a diferenciação em xilema. Tal sinalização poderia ser proveniente diretamente do parasita, como um análogo de um regulador normal do crescimento da planta, ou seja, hormônio, ou de uma molécula ativa da via de sinalização de hormônios. Porém, os mecanismos de indução da célula gigante ainda permanecem obscuros.

4.3.2. Resistência natural do hospedeiro (HPR)

Os danos causados pela invasão e multiplicação dos nematóides estão relacionados com a perda de produção das variedades e com o custo de controle dos mesmos, tanto do ponto de vista econômico quanto ecológico. Dentre as estratégias de controle deste patógeno, a HPR é a mais segura, barata e ecologicamente correta, portanto, até o momento, o melhor recurso a ser utilizado (Bird & Koltai, 2000).

O potencial da *HPR* é enorme devido ao aumento da disponibilidade e acesso aos germoplasmas de plantas que contêm genes para a resistência, e ao rápido avanço da engenharia genética. Segundo Roberts (1992), *HPR* acaba sendo priorizada pelas seguintes razões: primeiro, porque em países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais a utilização de variedades resistentes torna-se a única alternativa viável economicamente comparada aos gastos com outros tipos de manejo; segundo, porque em sistemas de produção de alta tecnologia de países desenvolvidos em que o uso de nematicidas foi restrito, a *HPR* deve ser utilizada como uma opção de controle primário, seja atuando isoladamente ou como elemento chave em programas de manejo integrado.

Os mecanismos de resistência a nematóides são complexos e de natureza diversificada e as plantas podem apresentar dois tipos de resistência, a passiva ou pré-infeccional e a resistência ativa ou pós-infeccional (Wallace, 1973). A resistência pré-infeccional está geralmente presente em plantas imunes ao patógeno, pois não existe nenhum tipo de interação patógeno-planta envolvido. Essa resistência é condicionada por barreiras anatômicas, fisiológicas e químicas que podem impedir a invasão do nematóide (Gonçalves & Silvarolla, 2001). A resistência ativa é decorrente da interação estabelecida entre o nematóide e o

hospedeiro. A indução de genes relacionados com a resistência da planta ao nematóide, incluindo os genes análogos de resistência (RGA) em estudo nesta dissertação, é característica da resistência ativa, e pode envolver tanto a HR quanto a SAR.

Muitos parâmetros têm sido utilizados para estimar a eficiência do hospedeiro na reprodução dos nematóides. Dentre estes, pode-se citar o índice de massas de ovos e ou galhas, número de fêmeas, número de ovos e juvenis por sistema radicular e o fator de reprodução (população final/população inicial) (Gonçalves & Silvarolla, 2001). Segundo Moura (1997) para uma completa avaliação da resposta das plantas a nematóides, deve ser mensurado, além da eficiência hospedeira (conceituação parasitológica), o dano provocado pelo parasita à planta (conceituação fitopatológica). A eficiência hospedeira pode não estar correlacionada com o dano, pois um baixo nível de dano pode ser devido ao alto nível de resistência do hospedeiro ou à baixa capacidade parasítica do nematóide (Gonçalves & Silvarolla, 2001).

4.4. Nematóide e o café – enfoque ao *M. exigua*

Os nematóides associados ao cafeeiro compreendem um grupo numeroso de espécies, destacando-se as do gênero *Meloidogyne*, que são as mais disseminadas e que vêm causando maiores danos à cafeicultura brasileira (Gonçalves *et al.*, 1998). Das 14 espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro nas diversas regiões produtoras de café do mundo, sete ocorrem no Brasil (Santos, 1997). As espécies de maior importância econômica são *M. exigua*, *M. coffeicola*, *M. incognita* e *M. paranaensis*. A destruição do sistema radicular do cafeeiro arábico é o sintoma primário. Diversos fatores fazem dos nematóides do gênero *Meloidogyne* um problema econômico e fitossanitário importante. Têm ampla distribuição geográfica, alta persistência no solo, o controle químico tem baixa eficiência e ocorrem em diversas raças fisiológicas (*M. incognita*). Esses nematóides se constituem fator limitante, tanto na implantação de novos cafezais onde eles ocorrem, bem como na manutenção daqueles já contaminados (Gonçalves, 1999).

A espécie *M. exigua* foi a primeira a ser identificada e posteriormente descrita como parasita do cafeeiro. Apesar de não ser a espécie mais patogênica ao cafeeiro, *M. exigua* provavelmente é a espécie que causa maiores danos na cafeicultura. Estimativas da redução no

crescimento de plantas em viveiro e no campo e de perdas na produção pelo ataque deste patógeno mostraram ser bastante significativas (Gonçalves & Silvarolla, 2001). No entanto, os efeitos danosos de *M. exigua* parecem ser mais drásticos em solos arenosos ou em argilosos que têm deficiência hídrica para o cafeeiro (Fazuoli *et al.*, 1977). Quanto à distribuição, *M. exigua* encontra-se amplamente disseminada na cafeicultura brasileira, ocorrendo nas regiões mais tradicionais, como a Mogiana em São Paulo, Sul de Minas e Zona da Mata, assim como nas regiões emergentes e promissoras, como o Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba em Minas Gerais. As demais espécies concentram-se nos Estados de São Paulo e Paraná (Gonçalves *et al.*, 1998).

A erradicação de uma área contaminada por estes parasitas é praticamente impossível (Gonçalves *et al.*, 1998). Por ser perene, a permanência do cafeeiro por longo período de tempo no solo propicia um alto nível populacional de fitonematóides causando grande redução na produção (Campos, 1992b). Gonçalves e colaboradores (1998) sugerem o controle através do manejo integrado, com medidas que reduzem e mantêm as populações de nematóides em níveis populacionais baixos que não chegam a causar dano econômico. Entre estas estratégias, deve-se, primeiramente, evitar o aumento da área contaminada e, nos cafezais contaminados, associar métodos de manejo cultural, genético, biológico e químico dos nematóides (Gonçalves *et al.*, 1998). As pesquisas visando o controle desta doença têm sido relacionadas, principalmente, com a introdução de métodos de controle biológico (Herrera & Marban-Mendoza, 1999), controle químico (Villain *et al.*, 2000), caracterização de populações de nematóides (Carneiro *et al.*, 1996) e obtenção de variedades resistentes a esses patógenos (Bertrand *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 1991).

Os prejuízos causados são diversos e podem inviabilizar a utilização de áreas extensas, tornar antieconômica a exploração de determinadas culturas e colocar em risco a produção de mudas em geral (Campos, 1992a). Por exemplo, incidência de *M. incognita* em cafezais do norte do Paraná e oeste de São Paulo fez com que propriedades anteriormente plantadas com café dessem lugar a outras atividades, principalmente pastagens, devido à impossibilidade de se conduzirem cafezais produtivos em áreas infestadas por estes patógenos (Gonçalves, 1999).

A utilização de variedades resistentes a esses patógenos é a alternativa preferencialmente utilizada para o controle de nematóides (Carvalho *et al.*, 1991; Bertrand *et al.*, 2000). Entretanto, até o momento, no Brasil, apenas a variedade Apoatã (*C. canephora*) apresenta

resistência a nematóides para ser utilizado como porta-enxerto para as variedades de *C. arabica*, os quais são extremamente susceptíveis.

Uma vez que esses mecanismos não são bem conhecidos ao nível biológico, a dificuldade de se identificar precisamente os genes envolvidos é elevada. Uma abordagem adotada para a identificação destes genes em outras espécies vegetais tem sido a utilização de similaridades moleculares entre estes. Assim, genes de resistência têm sido clonados a partir de indivíduos naturalmente resistentes (Seah *et al.*, 1998).

4.5. Genes de resistência a nematóides

Genes de resistência natural contra nematóides dos cistos e formadores de galhas têm sido clonados em determinadas espécies de plantas. Estes estudos permitem o estudo mais detalhado da função destes genes, ainda não esclarecida. O primeiro gene R de nematóides clonado foi o gene *Hs1^{pro-1}* de *Beta procumbens*, um parente selvagem da beterraba, *B. vulgaris* (Cai *et al.*, 1997). O produto deste gene confere resistência ao nematóide do cisto *Heterodera schachtii*. O gene foi isolado por clonagem baseada em mapa (*positional cloning*). Em experimentos de transformação foram obtidas plantas de beterraba transgênicas portando o gene sob controle do promotor constitutivo CaMV35S com o mesmo nível de resistência de seus parentes selvagens (Jung & Wyss, 1999).

O segundo gene clonado foi *Mi*, que confere resistência a *Meloidogyne* spp. de tomate (*Lycopersicon esculentum*). O gene foi originado da espécie selvagem *L. peruvianum* (Milligan *et al.*, 1998) e além de conferir resistência aos nematóides *Meloidogyne* spp., confere resistência ao afídeo de batata *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi *et al.*, 1998). O gene *Mi* é um clássico exemplo de utilização da resistência genética do hospedeiro e tem sido incorporado em muitas variedades de tomates (Medina-Filho & Tanksley, 1983). O gene *Mi* também foi isolado por clonagem baseada em mapa e dois alelos, *Mi-1.1* e *Mi-1.2*, foram identificados (Milligan *et al.*, 1998). Porém, apenas *Mi-1.2* confere resistência a *M. javanica* (Milligan *et al.*, 1998). A descoberta de que a resistência é devido a polimorfismo do locus *Mi* traz fortes evidências de que a resistência a *M. exigua* tenha as mesmas características. Estudos de expressão transiente de genes quiméricos com *Mi-1.1* e *Mi-1.2* sugerem que a morte celular está envolvida no mecanismo de resistência para este gene (Hwang *et al.*, 2000).

O terceiro gene e último até o momento, também isolado por clonagem baseada em mapa, é o *Gpa2*, que confere resistência ao nematóide cístico de batata *Globodera pallida* (Roupe van der Voort *et al.*, 1999). A figura 4 apresenta de forma esquemática a estrutura provável das proteínas codificadas pelos três genes de resistência a nematóides isolados até o momento.

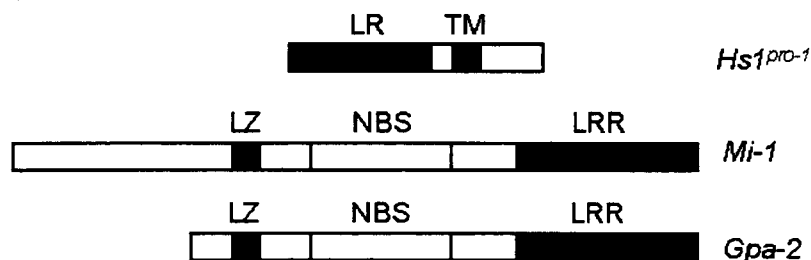


Figura 3: Estrutura proteica provável de genes de resistência a nematóides. LR indica a posição da região rica em leucina e TM um possível domínio transmembrana. LZ indica um possível zíper de leucina; NBS, uma região conservada que possui um sítio de ligação a nucleotídeos, e LRR, região de repetição rica em leucina (adaptado de Williamson, 1999).

O domínio LRR está presente nos genes *Hs1^{pro-1}*, *Mi* e *Gpa*, apesar de *Hs1^{pro-1}* pertencer a um grupo diferente e compartilhar pouca homologia de sequência com *Mi* e *Gpa*. O primeiro possui uma região transmembrana que sugere uma localização na membrana plasmática onde reconhecerá elicitores do patógeno, além de estar presente em cópia simples no genoma. O segundo e terceiro pertencem a Classe 1 (Figura 1, Tabela 1), grupo dos RGAs, localizados citoplasmicamente e com os domínios proteicos NBS e LRR. O gene *Mi* possui alta similaridade com o gene *Prf* de tomate e *Rpml* de *Arabidopsis*, que conferem resistência a *Pseudomonas syringae*. A sequência NBS-LRR também foi identificada no loco *Cre3* em trigo, que confere resistência ao nematóide cístico *H. avenae* (Lagudah *et al.*, 1997).

5. Programa de melhoramento do cafeeiro

O atual programa de melhoramento genético desenvolvido no IAC, é realizado através dos métodos tradicionais de cruzamentos e seleção de progênies. O processo de seleção envolve exaustivos testes de avaliações de progênies de plântulas, propagação daquelas

resistentes e subseqüentes avaliações em campo. Este processo de seleção pode ter sua eficiência em muito melhorada com a utilização de metodologias de genética molecular. Entre estas é bastante utilizada a identificação de marcadores moleculares associados à características agronômicas de interesse. No entanto, os resultados obtidos até o momento nem sempre têm se mostrado promissores. Avaliações feitas em variedades comerciais de café utilizando marcadores moleculares de RAPD, AFLP e microssatélites apresentaram baixa variabilidade genética entre as variedades (ainda não publicado) o que dificulta a utilização destes tipos de marcadores na seleção assistida. Nesta dissertação, um outro tipo de estratégia foi avaliada. Genes envolvidos com o mecanismo de resistência foram identificados e subseqüentemente foi feita a análise molecular dos mesmos. Nessa análise foi avaliada a variabilidade genotípica para locos identificados, assim como o seu padrão de expressão em resposta ao ataque (infecção) por nematóide. Tais polimorfismos alélicos poderão então ser utilizados como marcadores diretos em programas de seleção. Inicialmente foram avaliados os mecanismos de resistência do cafeeiro a *M. exigua*. Foi escolhido este nematóide uma vez que a resistência a *M. exigua* foi inicialmente caracterizada, como tendo padrão característico de herança monogênica (Fazuoli, 1981). No entanto, o número de genes e o tipo de herança relacionado com a resistência a *M. incognita*, presentes na variedade Apoatã de *C. canephora*, porta-enxerto resistente, ainda é assunto de investigações (Carvalho *et al.*, 1991).

Até o momento, no Brasil, não foram desenvolvidas variedades de *C. arabica* resistentes a nematóides do gênero *Meloidogyne*. Alguns acessos da Etiópia são resistentes, porém, apresentam produção e adaptação bem inferiores às do Mundo Novo e Catuaí, altamente susceptíveis (Gonçalves *et al.*, 1998).

A obtenção de variedades resistentes a doenças e pragas em café tem sido feita através dos métodos tradicionais de melhoramento, onde genes de interesse são introduzidos através de cruzamentos. Este processo é longo e de custo elevado devido ao longo ciclo de vida do cafeeiro. Assim, a utilização das técnicas de Engenharia Genética representa uma alternativa na qual a obtenção de variedades, com características específicas, poderia ser realizada sem necessidade de cruzamentos de maneira rápida e econômica. Para uma ampla utilização das modernas tecnologias, no entanto, é imprescindível a identificação e a caracterização de genes de interesse agrônômico.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Identificação e clonagem de seqüências gênicas tipo RGA em espécies do gênero *Coffea* e avaliação da expressão gênica de seqüências de RGA em progênies resistentes e susceptíveis ao nematóide *Meloidogyne exigua*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1: Amplificação e identificação de análogos de genes de resistência em espécies do gênero *Coffea*.

- Amplificação de RGAs em café a partir de *primers* heterólogos;
- Clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados;
- Identificação das seqüências por comparação com seqüências do *GenBank*;
- Caracterização dos RGAs em café.

Capítulo 2: Análise da expressão de RGAs em genótipos resistentes e susceptíveis ao nematóide *Meloidogyne exigua* na presença e ausência do patógeno.

- Amplificação por RT-PCR de RGAs expressos;
- Clonagem e sequenciamento dos cDNAs amplificados para confirmação das seqüências;
- Análise do padrão de expressão de plantas resistentes e susceptíveis ao nematóide ao longo do tempo após a inoculação do patógeno.

**AMPLIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA EM
ESPÉCIES DO GÊNERO *Coffea***

1.1. INTRODUÇÃO

A identificação de genes relacionados com a resistência a pragas e doenças em plantas é de grande importância para o entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos. Atualmente, alguns desses genes identificados em diferentes espécies vegetais já foram caracterizados em nível molecular e apresentam domínios protéicos conservados (Baker *et al.*, 1997). Com base na homologia dessas seqüências gênicas, análogos de genes de resistência (RGA) têm sido isolados em espécies diversas. Em café, apesar de já estarem disponíveis comercialmente variedades resistentes a doenças e pragas, nenhum gene diretamente envolvido na resistência foi identificado e caracterizado molecularmente.

Nesta etapa, através da utilização de seqüências homólogas de RGAs conhecidos, foram construídos *primers* heterólogos que permitiram a amplificação, clonagem e sequenciamento de RGAs em café. Desta forma, foi possível identificar alguns RGAs em diferentes espécies de café. As seqüências identificadas estão agrupadas em duas famílias distintas, confirmando-se a multigenicidade da classe NBS-LRR. Além disso, estão presentes em várias cópias no genoma e são conservados mesmo em espécies diferentes de café. A análise das seqüências permitiu não só a identificação destes genes em café como também a visualização das relações de parentesco entre os genótipos analisados.

A identificação de possíveis genes R é o primeiro passo para o entendimento dos mecanismos de resistência a pragas e doenças em plantas. A partir desta identificação será possível a clonagem dos genes e a verificação de sua participação em situações de patogenicidade, experimentos favorecidos pelo surgimento de técnicas moleculares cada vez mais avançadas.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Material Vegetal

Folhas jovens de *C. arabica* var. Mundo Novo, material susceptível a nematóides, bicho-mineiro e ferrugem; *C. arabica* var. Icatu Vermelho, resistente à ferrugem; *C. canephora* var. Apoatã e *C. racemosa*, resistentes a nematóides, bicho-mineiro e ferrugem, pertencentes ao Programa de Melhoramento e ao Banco de Germoplasma de Coffea do IAC foram coletadas e mantidas em nitrogênio líquido até o momento da extração.

1.2.2. Extração de DNA de café

Para a padronização da extração de DNA de café, foram testados dois protocolos. O primeiro protocolo testado foi retirado de Orozco-Castillo e colaboradores (1996) em que 1g de folhas jovens foram lavadas com etanol 70% e macerados em N₂ líquido na presença de 400mg de carvão ativado. O tecido macerado foi ressuspensionado cuidadosamente em 10ml de Tampão de Extração (2% de MATAB, 0,10M Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 0,1% DTT), pré-aquecido a 65°C. Após 30 min. de incubação a 65°C, adicionou-se 7,5ml de clorofórmio, misturando até que a emulsão estivesse formada. A solução foi centrifugada por 5 min. a 1000g a 4°C e ao sobrenadante, após filtração em Miracloth, acrescentou-se 1 volume de isopropanol. Após incubação a temperatura ambiente por 15 min., a solução foi centrifugada a 10.000g por 15 min. e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 200µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) acrescido de 20µl de RnaseA 10mg/ml e incubado a 65°C por 15 min. A solução foi centrifugada a 8.000g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 0,1 volume de 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após centrifugação a 10.000g por 15min. a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspensionado em 100µl de TE.

O segundo protocolo testado foi retirado de Paillard e colaboradores (1996). Neste protocolo, 1g de folhas frescas foram lavadas em etanol 70% e maceradas em N₂. O pó obtido foi ressuspensionado em 7ml de Tampão de Extração (0,35 M de Sorbitol, 0,10 M de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 1,5% β - mercaptoetanol) e centrifugado a 1000g, por 20 min.

a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 2,5 ml de Tampão de Extração. A essa solução acrescentou-se 3,5 ml de Tampão de Lise (0,2 M Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 2 M NaCl, 2% (w/v) MATAB) e 0,7 ml de SDS 10%. Após incubação da mistura a 65°C por 30 min. adicionou-se 7 ml da solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), misturando até que a mistura ficasse homogênea. Depois de centrifugação a 1000g, por 15 min. a 4°C foi feita a transferência da fase aquosa superior para um novo tubo. O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto gelado. A solução foi centrifugada a 10.000g por 15min. e o sobrenadante descartado. Após a evaporação do etanol do precipitado, ressuspendeu-se o DNA em 1 ml de TE (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA pH 8,0) com RNase a 200µg/ml. Após incubação por 30min. a 37°C, adicionou-se 1 ml de solução fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 8.000g, por 10 min. a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo para outra precipitação do DNA (adicionando-se 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto gelado). A solução foi centrifugada a 10.000g por 15 min., o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensionado em 200µl de TE, após a evaporação do etanol. O material foi quantificado em gel de agarose 0.8% em TAE 1X utilizando como parâmetro pGEM a 20ng/ml.

1.2.3. Amplificação e identificação de seqüências homólogas

Em uma primeira etapa foram desenhados *primers* (Figura 2), baseados em alinhamento de seqüências de genes heterólogos, tais como *Mi* (AF091048), *Cre3* (AF052641), *rpm1* (AF114171), obtidas em banco de dados (*GenBank*). Os *primers* amplificaram regiões de genes que contém o domínio NBS e região intermediária NBS-LRR de proteínas de resistência.

Foram testadas cinco condições de reação diferentes para a obtenção de bandas resultantes da amplificação do DNA a partir dos *primers* degenerados:

Reação Condições	1	2	3	4	5
DNA	250ng e 500ng	250ng e 500ng	100ng e 250ng	250ng e 500ng	250ng
Primers	KIN1 x EGF1 a 0,5 e 1 pmol/μl	KIN1 x EGF1 a 0,5 pmol/μl	KIN1 x EGF1; KIN1 x MHD1 a 0,5 pmol/μl	KIN1 x EGF1; KIN1 x MHD1 a 0,5 pmol/μl	KIN1 x EGF1; KIN1 x MHD1 a 0,5 pmol/μl
Tampão	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	1 e 2mM	1 e 2mM	2mM	2mM	2mM
dNTP	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Taq Polimerase	2,5 U	2,5 U	2,5 U	2,5 U	2,5 U
Água	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.	q.s.p.
Volume total	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Condições do termociclador	1x 95°C por 5min. 30x 95°C por 1'; 55°C por 1,5'; 72°C por 2'. 1x 72°C por 10'	1x 95°C por 5min. 30x 95°C por 1'; 50°C por 1,5'; 72°C por 2'. 1x 72°C por 10'	1x 95°C por 5min. 30x 95°C por 1'; 48°C por 1,5'; 72°C por 2'. 1x 72°C por 10'	1x 95°C por 5min. 30x 95°C por 1'; 52°C por 1,5'; 72°C por 2'. 1x 72°C por 10'	1x 95°C por 5min. 30x 95°C por 1'; 50°C por 1,5'; 72°C por 2'. 1x 72°C por 10'

As melhores condições foram estabelecidas na reação 5 (ver Resultados e Discussão). Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando-se o kit de purificação de bandas em gel GFXTM (Amersham Pharmacia Biotech).

1.2.4. Clonagem e análise de produtos de PCR

A clonagem dos fragmentos foi feita utilizando-se o kit comercial: *pMOSBlue blunt ended cloning kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Para o par KIN/EGF foram clonados fragmentos amplificados de *C. arabica* var. Mundo Novo e *C. canephora* var. Apoatã. Para o par KIN/MHD foram clonados além dos genótipos anteriores, *C. arabica* var. Icatu Vermelho e *C. racemosa*.

Pelo menos 40 clones de cada indivíduo foram sequenciados pelo método de dideoxi (Sanger *et al.*, 1977), utilizando um kit de sequenciamento do tipo *ABI-PRISM Dye Terminator*. Os programas utilizados para a análise das seqüências foram: *ClustalW* (<http://bio.lundberg.gu.se/edu/msf2.html>), *Molecular* *Toolkit* (<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/index.html>), e *Blast* (Altschul *et al.*, 1990).

A verificação da frequência de RGAs foi feita através da técnica de *Southern blotting* (Sambrook & Hussell, 2001). A marcação da sonda para a hibridação radioativa foi feita a partir de clones de RGA sequenciados e confirmados como RGA com o kit *Megaprime DNA Labeling System RPN* (Amersham Pharmacia Biotech) e a remoção de nucleotídeos incorporados foi realizada com o kit *ProbeQuantTM G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia Biotech). As condições de hibridação e lavagem seguiram os protocolos de Sambrook e Hussell (2001).

1.2.5. Árvore filogenética

Para a inferência filogenética, foi utilizado o método de agrupamento Neighbor-joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com distância-p para o cálculo de distância genética. A construção da árvore NJ e os testes de *bootstrap* com 5.000 replicações foram realizados utilizando-se o programa computacional MEGA2 (Kumar *et al.*, 1993).

Apesar da distância-p não levar em consideração substituições múltiplas, ela ainda é eficaz quando a distância média entre as espécies é menor do que 0,20 (Russo *et al.*, 2001; Nei, 1991). Na verdade, na faixa de 0 a 0,20, não existe muita diferença na média da distância estimada pelos diferentes métodos para cálculo da distância. Portanto, a mais recomendada, nesse caso, seria a p, já que sua variância é menor (Russo *et al.*, 2001; Nei, 1987, 1991; Russo, 1997).

1.2.6. Mapa de restrição – verificação de seqüências

Através do programa *WEBCutter*, disponível em rede pelo site: <http://www.bionet//hypermail/METHDS-REAGNTS/methods.199811/0054.html>, foi construído o mapa de restrição para todas as seqüências obtidas. Comparando-se os mapas observou-se que a enzima de restrição *MseI* possui sítios de restrição informativos para visualização em gel de agarose, com fragmentos de tamanhos definidos e de fácil distinção. Portanto, a enzima *MseI* foi escolhida para a confirmação das seqüências gênicas. Após amplificação das seqüências por PCR, elas foram isoladas e purificadas para posterior digestão com *MseI*. A separação dos fragmentos digeridos foi feita em gel de agarose 2%.

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1. Extração de DNA

Para que a análise da variabilidade de RGAs não se restringisse apenas a genótipos resistentes a nematóides, foram testados diferentes espécies de *Coffea*, que foram escolhidos com base na menor ou maior susceptibilidade a patógenos. Assim, foram coletadas folhas das espécies *C. arabica* var. Mundo Novo, altamente susceptível, *C. arabica* var. Icatu Vermelho, resistente a ferrugem, e *C. canephora* var. Apoatã, resistente a nematóide e *C. racemosa*, resistente a ferrugem, bicho-mineiro e nematóide.

Devido à presença de muitos compostos fenólicos em café que levam a uma rápida oxidação dos tecidos, o DNA foi extraído do material recém-coletado e ainda fresco. Ambos os protocolos testados, descritos no item Materiais e Métodos, foram satisfatórios para a extração de DNA em café. Portanto, o segundo protocolo (Paillard *et al.*, 1996), mais rápido e prático, foi adotado.

1.3.2. Testes de amplificação de RGA

A utilização de *primers* heterólogos exige que as condições experimentais de PCR, principalmente a temperatura de anelamento, sejam testadas, a fim de se identificar aquelas que permitam uma amplificação específica do gene desejado.

Os resultados obtidos com as diferentes condições de PCR testadas são mostrados na figura 1.3.1. Diferentes concentrações de DNA, $MgCl_2$ e *primer*, assim como diferentes temperaturas de anelamento foram testadas. As melhores condições foram estabelecidas na reação 5, com 250ng de DNA, 2mM de $MgCl_2$, 0,5 pmol/ μ l de *primer* e 50 °C de temperatura de anelamento (Figura 1.3.1E). Com temperaturas de anelamento de 52 e 55°C não houve amplificação de fragmentos (Figuras 1.3.1D e A). Procurando manter a maior estringência possível, descartou-se a amplificação a 48°C, uma vez que outras bandas, de tamanhos variados, foram amplificadas na PCR (Figura 1.3.1C).

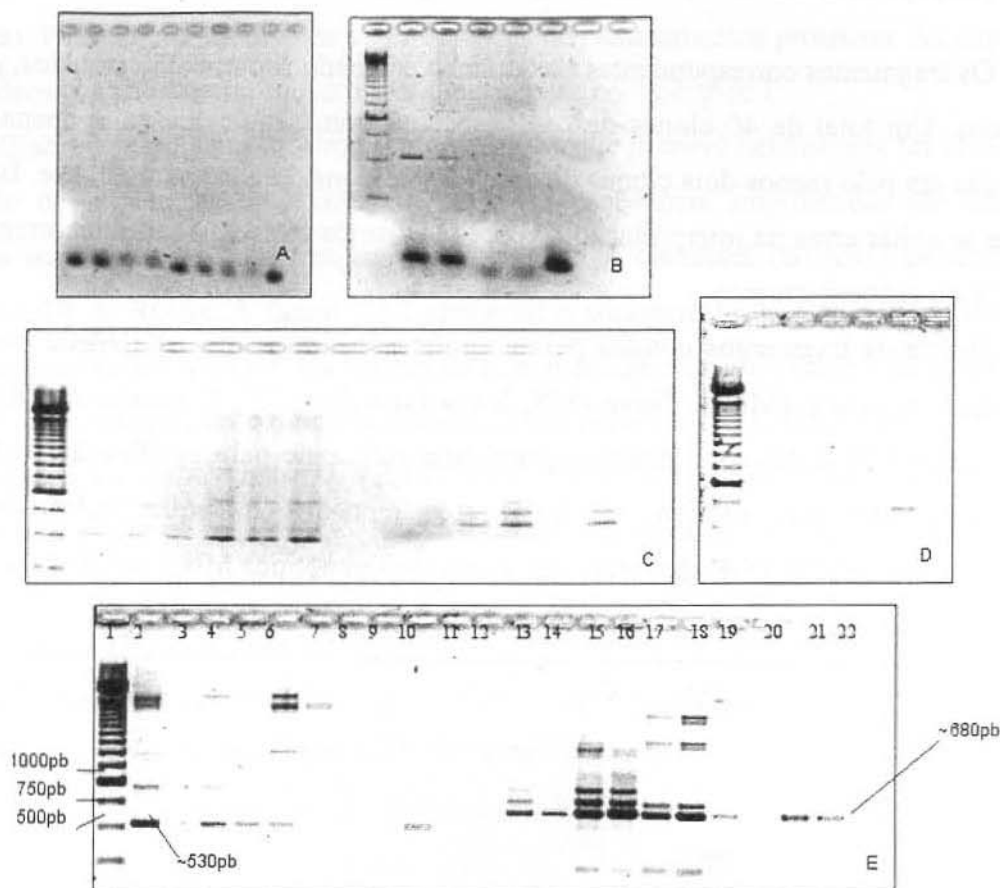


Figura 1.3.1: Testes de amplificação por PCR. (A) Reação 1, temperatura de anelamento a 55°C; (B) Reação 2, temperatura de anelamento a 50°C; (C) Reação 3, temperatura de anelamento a 48°C; (D) Reação 4, temperatura de anelamento a 52°C; (E) Reação 5, temperatura de anelamento padronizada a 50°C; canaleta 1, PM 250pb; de 2 a 10, primers KIN1 x EGF1; de 13 a 22, primers KIN1 x MHD1.

Dentre as bandas obtidas por PCR, foram selecionadas bandas monomórficas e que coincidisse com o tamanho esperado para cada par de *primers*. De acordo com Seah e colaboradores (1998) o par KIN1/EGF1 amplifica, em trigo e cevada, um fragmento de aproximadamente 530pb que foi identificado como possível RGA. Já para o par KIN1/MHD1, o fragmento obtido teria entre 590 a 690pb, considerando os RGAs descritos por Collins e colaboradores (1998) em milho (*Zea mays*). O par de KIN/MHD1 foi o que gerou bandas mais fortes e definidas, ou seja, teve melhor amplificação, fragmentos com 680pb (Figura 1.3.1E).

1.3.3. Amplificação de RGA para clonagem e sequenciamento

Os fragmentos correspondentes ao tamanho esperado foram então isolados, purificados e clonados. Um total de 40 clones de cada espécie foram sequenciados, e apenas seqüências repetidas em pelo menos dois clones distintos foram consideradas para análise. Isto foi feito a fim de se evitar erros na interpretação dos polimorfismos em seqüências decorrentes de falhas de PCR ou sequenciamento.

Dentre os fragmentos obtidos pela amplificação dos *primers* KIN/EGF para os quatro genótipos em estudo (Mundo Novo -MN, Icatu Vermelho - IV, *C. racemosa* - RA e Apoatã - AP), apenas MN e AP apresentaram quantidade suficiente para purificação e clonagem dos fragmentos. Por este motivo, os fragmentos clonados e sequenciados resultantes da amplificação por KIN/EGF são referentes apenas aos genótipos MN e AP (Figura 1.3.2).

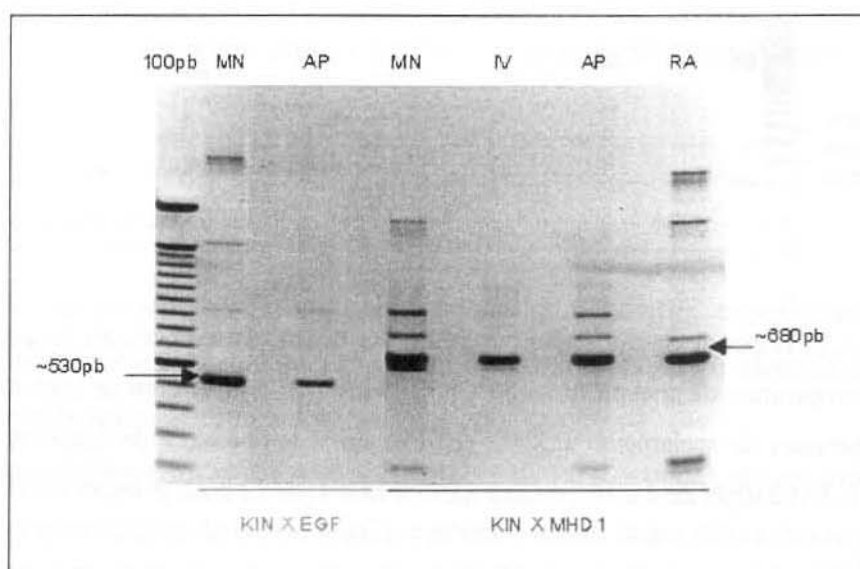


Figura 1.3.2: Fragmentos amplificados por KIN/EGF e KIN/MHD para clonagem e sequenciamento.

1.3.4. Identificação de RGA em café

Após o sequenciamento, as seqüências foram analisadas utilizando-se programas disponíveis *on-line* para alinhamento e conversão protéica de seqüências nucleotídicas. Devido à presença de regiões protéicas conservadas em RGAs já descritos, o alinhamento de seqüências

protéicas deduzidas torna-se mais informativo em relação ao alinhamento de seqüências nucleotídicas. Portanto, as discussões serão baseadas nos alinhamentos protéicos. As seqüências de nucleotídeos dos RGAs amplificados são apresentadas no Apêndice 1.

A análise das seqüências mostrou que a utilização de *primers* heterólogos foi eficiente na amplificação de seqüências de RGAs em café. As seqüências amplificadas são altamente similares às seqüências de outras espécies depositadas no *GenBank* (BLAST) pertencentes a classe NBS-LRR de RGAs. A figura 1.3.3 apresenta o alinhamento de algumas seqüências de café com seqüências do *GenBank*. Os valores de E, porcentagem de identidade e de positivos são consistentes com a identificação destas seqüências como pertencentes a classe NBS-LRR.

As regiões kinase2a, kinase3a, GLPL, LSY, CFA, EGF e MHD são notadamente as mais conservadas dentre os RGAs. Porém, pode-se considerar, levando-se em conta a distância genética entre as espécies alinhadas (Figura 1.3.3) – *Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* e espécies do gênero *Coffea* -, que as seqüências, em toda extensão, são altamente conservadas. As seqüências obtidas pela amplificação por KIN/EGF (Figura 1.3.3a) apresentaram-se mais conservadas do que aquelas obtidas por KIN/MHD (Figura 1.3.3b). Estas últimas apresentaram sinais de possíveis deleções ou inserções, que apesar de conservadas entre as seqüências do café (Figura 1.3.4), são diferentes das seqüências de outras espécies avaliadas. Tais deleções/inserções, até o momento específicas em café, podem caracterizar um evento importante na evolução dessa família gênica em estudos de filogenia de grupos vegetais.

As seqüências amplificadas por KIN/EGF são muito similares ao gene *Mi-1.2*, que confere resistência a nematóides formadores de galha e afídeos (Milligan *et al.*, 1998) e ao gene *Prf*, que confere resistência a *Pseudomonas syringae* (Salmeron *et al.*, 1996). Estes dois RGAs, são genes cuja participação na resistência aos respectivos patógenos já foi comprovada.

Não há evidências de que a utilização de *primers* degenerados para diferentes domínios isole um novo grupo de seqüência, contudo, as seqüências identificadas neste trabalho representam apenas pequena parcela do total previsto para um genoma. Em *Arabidopsis* existem aproximadamente 200 genes contendo o domínio NBS, representando por volta de 1% de todos os genes (Meyers *et al.*, 1999). Portanto, para se isolar um maior número de seqüências, seriam necessárias diferentes combinações de *primers* (Meyers *et al.*, 1999) ou, no caso do café, buscar as seqüências expressas de RGAs disponibilizadas pelo Genoma Café.

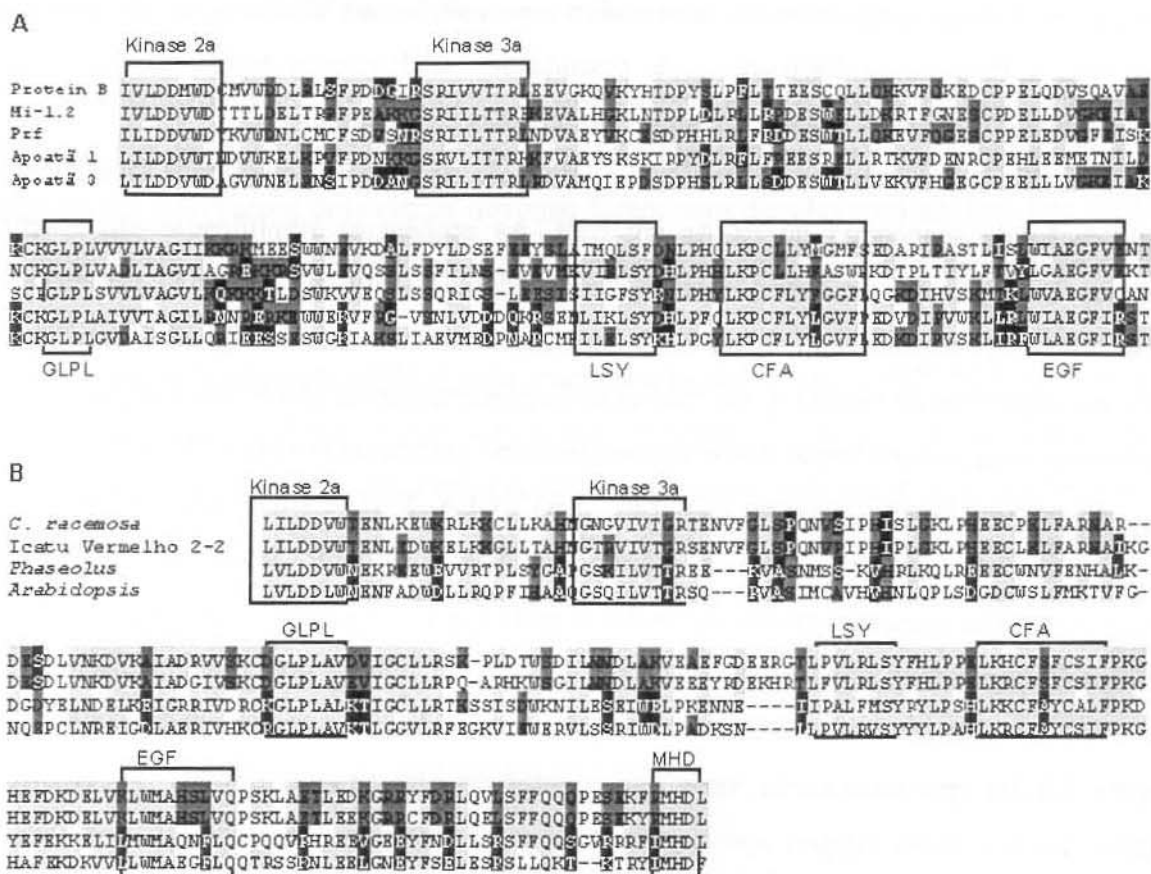


Figura 1.3.3 : Alinhamento de seqüências de café com seqüências de RGAs do banco de dados. (A) *Primers* : KIN e EGF (Figura 1). (B) *Primers* : KIN e MHD (Figura 1). *Tospovirus resistance protein B* - *Lycopersicon esculentum* (AAG31014) com Apoatã 1: valor de E $5e-37$, identidade 42 %, positivos 66 %. *Prf-Lycopersicon pimpinellifolium* (AAF76308) com Apoatã 3: valor de E $1e-45$, identidade 49 %, positivos 70 %. *NBS-LRR resistance-like protein J71* - *Phaseolus vulgaris* (AAK61317) com *C. racemosa*: valor de E $5e-37$, identidade 38 %, positivos 57 %. *Disease resistance protein, putative* - *Arabidopsis thaliana* (NP188065) com Icatu Vermelho 2-2: valor de E $1e-35$, identidade 37 %, positivos 59 %. *Root-knot nematode resistance protein* - *Lycopersicon esculentum* (AF039682) com Apoatã3: valor de E $3e-35$, identidade 41%, positivos 61%. Em cinza claro estão os aminoácidos que possuem a mesma propriedade bioquímica em todas as seqüências alinhadas. Em cinza escuro e preto estão os aminoácidos que possuem a mesma propriedade bioquímica em pelo menos duas seqüências. Dentro dos retângulos estão as regiões conservadas nos RGAs.

1.3.5. Presença de RGAs no genoma de todas as espécies

Todos os genótipos avaliados de café amplificaram fragmentos de RGA, incluindo a espécie altamente susceptível *C. arabica* (var. Mundo Novo). Essas observações sugerem que as seqüências amplificadas podem representar diferentes alelos, mutantes regulatórios ou genes não funcionais (pseudogenes) para a resistência a patógenos. A possibilidade da presença de pseudogenes não é descartada, já que foi reportada tanto no loco *Cre3* de trigo (Lagudah *et al.*, 1997) quanto no loco *Mi* de tomate (Milligan *et al.*, 1998).

1.3.6. Conservação em outras espécies

A similaridade entre as seqüências de café é muito alta, sendo que a principal fonte de polimorfismo são mutações pontuais. Já foi observado que membros de uma mesma família gênica diferem apenas por substituições simples de aminoácidos (Lagudah *et al.*, 1997), assim como os alelos resistentes e susceptíveis do gene *Pi-ta* (Bryan *et al.*, 2000). Além disso, estudos recentes demonstraram que a substituição de um único aminoácido no domínio NBS de um gene R do tipo TIR-NBS-LRR de *Arabidopsis* caracterizou um mutante com elevada resistência a bactérias, quando comparado à planta silvestre (Shirano *et al.*, 2002). Isto indica que a conservação da região NBS é importante para a manutenção da função dos RGAs.

A ocorrência de mutações neutras também é freqüente e a alteração de aminoácidos de diferentes propriedades bioquímicas nas regiões conservadas são mostrados na figura 1.3.4. Estas alterações podem ter papel importante na conformação protéica atribuindo funções diferentes para as diferentes seqüências. Além das regiões conservadas já descritas para RGAs (Figura 1), o gênero *Coffea* apresentou seqüências particularmente similares e altamente conservadas entre as diferentes espécies avaliadas (Figura 1.3.4). A conservação destas regiões pode ser atribuída a eventos de sinalização específicas em café, importantes no mecanismo de defesa.

1.3.7. Características das seqüências de RGA

1.3.7.1. Ausência de introns

Um mRNA de aproximadamente 4kb correspondente a *Mi* está presente em raízes e folhas de tomates resistentes (Milligan *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1998) sendo que o transcrito primário contém dois introns, um anterior e outro posterior ao sítio de início de tradução (Williamson, 1998). No entanto, nenhum íntron está presente na região NBS e inter NBS-LRR, região amplificada neste trabalho. Estudos de amplificação de RGA por *primers* degenerados observaram a ausência de introns nestas regiões, confirmadas com a obtenção dos domínios protéicos conservados em uma mesma fase de leitura (Seah *et al.*, 1998; Kanazin *et al.*, 1996; Leister *et al.*, 1996). Portanto, toda a seqüência amplificada está sendo traduzida, permitindo a utilização de seqüências de aminoácidos para melhor comparação.

1.3.7.2. Duas famílias distintas

Para uma análise mais apurada das seqüências nucleotídicas foi construída uma árvore filogenética utilizando o método de agrupamento de *Neighbor-Joining* com distância-p para o cálculo de distância. Os dois pares de *primers* utilizados amplificaram, coincidentemente, seqüências localizadas em dois grupos distintos na árvore gênica (Figura 1.3.5), caracterizando duas famílias distintas de RGA, nomeadas família EGF e família MHD. A proporção de diferenças nucleotídicas calculada pela distância p ($0.25 < p < 0.30$), os valores do nível de confiança dados pelo *bootstrap* (BCL) e a presença de um RGA externo (*Arabidopsis*) incluído em uma das famílias dão consistência à distinção das duas famílias.

A divisão das seqüência em duas famílias também é consistente com a ramificação, valor de bootstrap de 100%, que separa as famílias em dois grupos (Figura 1.3.5). O enraizamento da árvore com um grupo externo não foi possível, pois, até o momento, não foi identificada nenhuma seqüência ancestral às duas famílias. Portanto, os grupos externos utilizados foram RGAs de outras espécies pertencentes à família MHD (AB028617) e à família EGF (AF039682 e AF320848) (Figura 1.3.5).

Comparando-se as regiões conservadas kinase3a, LSY, CFA e EGF entre as seqüências amplificadas pelas duas famílias, observam-se aminoácidos distintos, mas que são conservados dentro de cada família (comparação entre as figuras 1.3.4A e 1.3.4B). Estes

aminoácidos possuem as mesmas propriedades bioquímicas, possivelmente mantendo a característica estrutural do peptídeo. Isso comprova que as duas famílias pertencem à superfamília NBS-LRR, incluídos na classe non-TIR de NBS (Meyers *et al.*, 1999), distintos, portanto, dos genes *N*, *RPP5*, *L6*, *M* que são do tipo NBS-TIR.

A presença da mesma sequência na família amplificada por KIN/EGF entre os cultivares Mundo Novo e Apoatã (Figura 1.3.5) pode evidenciar genes homólogos provenientes de *C. canephora*, considerado um dos possíveis pais de *C. arabica* (Lashermes *et al.*, 1999). Mesmo sendo um alotetraplóide, $2n=44$, originado do cruzamento de *C. eugenioides* X *C. canephora* seguido de duplicação cromossômica, *C. arabica* apresentou um único alelo, enquanto *C. canephora*, $2n=22$, apresentou três sequências bem distintas para essa família de RGA. Uma possível explicação para esta observação está na própria biologia do café. Enquanto *C. canephora* é alógama, com incompatibilidade gamética, *C. arabica* é autógama. Este tipo de reprodução leva à restrição da variabilidade genética em *C. arabica*, através da fixação de alelos. Em *C. canephora* ocorre o oposto e a obtenção de novas sequências é resultado da recombinação de diferentes genótipos. Além disso, o tempo de diversificação alélica é bem maior para *C. canephora* (espécie mais antiga) do que para *C. arabica*, possibilitando o acúmulo de mutações.

As sequências da família MHD podem ser divididas em dois grupos, grupo A e B, sustentados pelos valores de *bootstrap* (Figura 1.3.5) e pelo alinhamento apresentado na figura 1.3.4. A sequência de Icatu Vermelho 2-2, apesar de estar localizada no grupo A é uma sequência híbrida destes dois grupos, como mostra a figura 1.3.4B. Enquanto no domínio GLPL a sequência apresenta o aminoácido L do grupo A, no domínio CFA apresenta o aminoácido R do grupo B. Este é um forte indicio da ocorrência de recombinação intragênica no cruzamento de *C. arabica* e *C. canephora* que resultou no híbrido Icatu Vermelho. A provável origem desta sequência está esquematizada na figura 1.3.6.

A evolução independente entre as duas famílias (Figura 1.3.5) demonstra que não há interação por recombinação, ou seja, estão localizados em locos diferentes, ou estão dispostas em posições invertidas no genoma (Hulbert *et al.*, 2001).

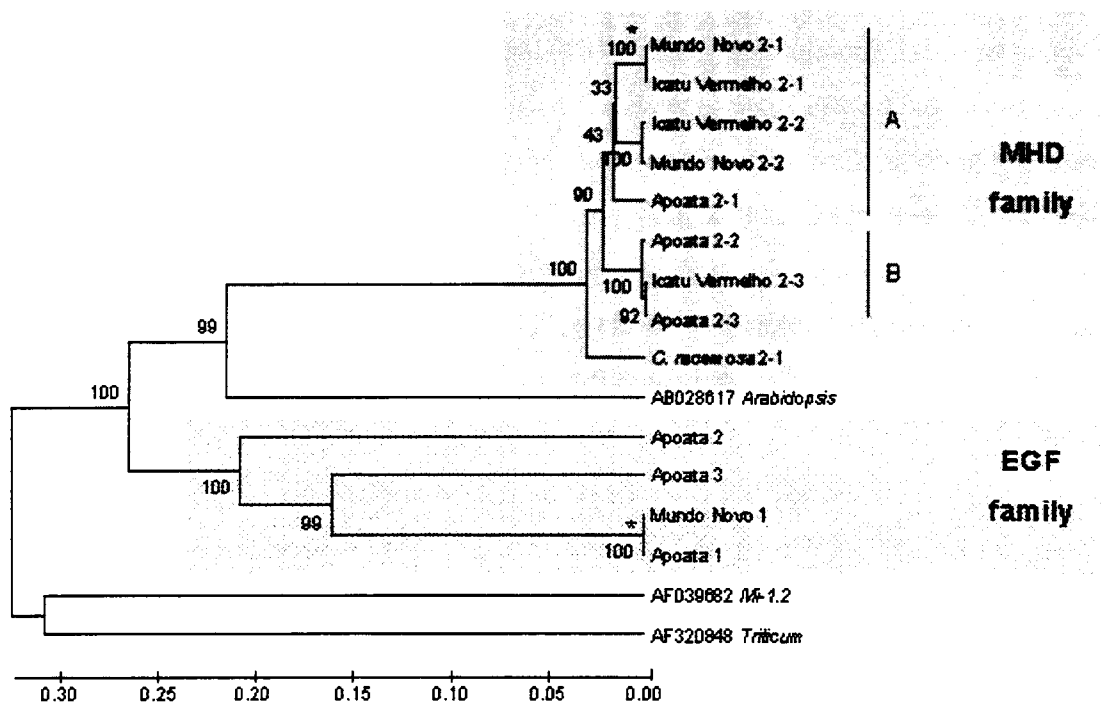


Figura 1.3.5: Árvore gênica das seqüências nucleotídicas de RGAs em café obtida pelo índice de Neighbor-joining com distância-p. Os níveis de confiança de *bootstrap* (BCL) a partir de 5.000 replicações está apresentado em cada nó. Todas as seqüências de um mesmo genótipo pertencem a um único indivíduo e são as mesmas seqüências de nucleotídeo que foram traduzidas para as figuras 1.3.3 e 1.3.4 de alinhamento de peptídeos. O sinal de * nas ramificações apresentam seqüências idênticas e que, portanto, apresentam valor esperado de *bootstrap* de 100%.

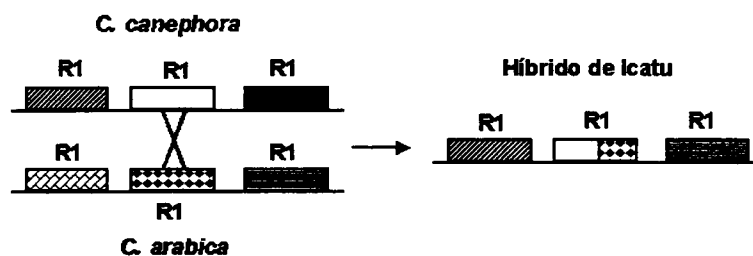


Figura 1.3.6: Possível origem da seqüência híbrida de Icatu Vermelho.

A observação de que ocorre maior similaridade entre seqüências de diferentes espécies dentro da mesma família do que entre as diferentes famílias sugere que as duas famílias estudadas neste trabalho são parálogas entre si. Genes parálogos são aqueles que surgiram a partir de eventos de duplicação e que possuem evolução independente se não interagirem por recombinação (Hulbert *et al.*, 2001). Por outro lado, dentro de uma mesma família, genes que se derivaram de um ancestral comum e que ocupam posições idênticas em uma família gênica são denominados de genes ortólogos. Neste trabalho não existe a possibilidade de inferência de quais genes seriam ortólogos entre si.

A evolução independente entre as famílias também é suportada pelo fato de que enquanto a família MHD apresentou alta divergência de seqüências, a família EGF apresentou baixa divergência. A alta divergência é caracterizada pelo longo comprimento dos ramos e nós muito próximos na árvore filogenética, enquanto a baixa divergência é caracterizada pelos nós mais distanciados (Figura 2.3.5).

1.3.7.3. Multigenicidade

Um grupo de seqüências é considerado como pertencente a uma família multigênica, quando genes de um único indivíduo são gerados por duplicação gênica a partir de uma seqüência ancestral. Isto é, para uma espécie diplóide, pelo menos três seqüências distintas, identificadas como um mesmo gene, caracterizam uma família multigênica. No caso de locos simples, a presença de três alelos só seria possível em plantas triplóides. As seqüências apresentadas nas figuras 1.3.3 e 1.3.4 pertencem a um único indivíduo de cada espécie, sugerindo que os RGAs em café pertencem a uma família multigênica. Isso é observado pela obtenção de duas famílias gênicas a partir de grupos de amplificações diferentes, sendo que o esperado seria a amplificação de uma mesma seqüência, apenas maior quando amplificada com o *primer* MHD, que é localizado mais adiante de EGF (Figura 1). Além disso, Apoatã apresentou três alelos distintos para a família EGF, mesmo sendo diplóide (Figura 1.3.4A). Portanto, estas seqüências representam claramente uma família multigênica que é característica dos genes de resistência que compartilham os domínios NBS-LRR.

1.3.8. A divisão das famílias EGF e MHD ocorreu antes da especiação do café

C. racemosa é uma espécie silvestre de café que não possui parentesco direto com nenhuma outra em estudo, ou seja, é a mais distante geneticamente. Com isso, podemos comparar a diversificação das espécies de café avaliadas nesta tese, com a separação dos RGAs nas duas famílias distintas, EGF e MHD. Neste caso, se a divisão entre estas duas famílias fosse anterior à especiação do café, a sequência de *C. racemosa* deveria estar localizada como um grupo externo para ambas as famílias, o que não ocorreu. A sequência única de *C. racemosa* pertence à família MHD e mesmo sem a amplificação de sequências da família EGF, este enraizamento poderia ser observado. Até o momento, nenhuma sequência pertencente a família MHD foi encontrada para monocotiledôneas no *GenBank*. A ausência da família MHD em monocotiledôneas pode ser indício de que a separação entre estas duas famílias ocorreu provavelmente durante a diversificação dos grupos de dicotiledôneas.

A família MHD, apesar de apresentar maior número de sequências diferentes em um mesmo genótipo, possui menor proporção de diferenças nucleotídicas, menos de 5% de diferenças nucleotídicas distinguem as sequências desta família. Provavelmente o tempo de diversificação ainda não foi suficiente para maiores diferenças nucleotídicas como ocorre em EGF que chega de 15 a 20%. Convém lembrar que estas sequências são de regiões conservadas e que o gene também possui regiões altamente variáveis, como o domínio LRR portanto esses genes estariam sujeitos a um tipo de seleção divergente (McDowell *et al.*, 1998; Michelmore & Meyers, 1998). Para estudos mais detalhados sobre a evolução dos RGAs em café, genes que estão sob seleção divergente, deve-se analisar o gene inteiro, já que apenas parte dele não é significativa para inferir sobre as taxas evolutivas.

1.3.9. Origem dos genótipos em estudo

A árvore gênica (Figura 1.3.5), obtida para as sequências de RGAs amplificadas em café nesse estudo, corrobora a história evolutiva do café. *C. arabica*, representada pelo cultivar Mundo Novo (MN), originou-se do cruzamento interespecífico natural entre *C. canephora* e *C. eugenioides* seguido de duplicação cromossômica. Portanto, trata-se de um alotetraplóide $2n=44$, enquanto que as espécies selvagens são diplóides $2n=22$. Devido a esta característica tetraplóide, esperar-se-ia maior variabilidade genética em *C. arabica* comparado as outras espécies. Porém, a reprodução por autogamia restringiu esta variabilidade que foi mantida

devido a sucessivos ciclos de melhoramento. Este fato pode ser comprovado pelos estudos de caracterização molecular dos cultivares de *C. arabica*, que apresentaram baixíssima variabilidade genética (Anthony *et al.*, 2001; Anthony *et al.*, 2002). *C. canephora*, representado pelo cultivar Apoatã (AP), apresentou maior número de diferenças nucleotídicas e de aminoácidos (Figura 1.3.4). É importante ressaltar que este cultivar é resistente a diferentes patógenos, sendo, inclusive, utilizado como porta-enxerto para cultivares de *C. arabica*. Já a espécie *C. arabica* é altamente susceptível a pragas e doenças, porém de maior interesse econômico devido a sua melhor qualidade de bebida.

Agrupamentos entre seqüências de AP e MN já eram esperados devido à relação de parentesco direto entre os genótipos. Estes agrupamentos podem ser observados tanto na família EGF quanto na família MHD. Na família EGF, as seqüências Mundo Novo 1 e Apoatã 1 são idênticas e provavelmente possuem a mesma origem. Na família MHD a seqüência AP 2-1 está agrupada com MN 2-1 e MN 2-2 (Figura 1.3.5), separada das outras seqüências MHD com 90% de valor de *bootstrap*.

A variedade Icatu Vermelho (IV) de *C. arabica*, é proveniente do cruzamento artificial entre *C. arabica* e *C. canephora* e subsequentes retrocruzamentos com *C. arabica*. Portanto, é considerado uma variedade de *C. arabica*, sendo tetraplóide e possuindo resistência a ferrugem. As seqüências obtidas de IV variam entre as originadas a partir de *C. canephora* e *C. arabica*, visualizadas através dos agrupamentos de seqüências destes três genótipos (Figura 1.3.5).

C. racemosa é o único genótipo em estudo que não possui relação de parentesco direto com nenhum dos outros genótipos. A árvore gênica mostra esta distância em relação às outras seqüências. Enquanto as seqüências para IV, MN e AP formaram um grupo dentro da família MHD, *C. racemosa* ficou como grupo externo para esta família.

1.3.10. Variabilidade das seqüências

A variabilidade de seqüências existente nos genótipos resistentes pode estar relacionada com a resistência a diferentes patógenos. A tabela 1.3.1 apresenta a relação de resistência aos principais patógenos de café dos genótipos analisados. A espécie *C. racemosa*, no entanto, apesar de altamente resistente, amplificou apenas uma seqüência, indicando que

provavelmente outros mecanismos além de polimorfismo alélico podem estar envolvidos com a resistência a patógenos. Entre estes, pode-se citar a expressão diferencial de alelos, o polimorfismo em nível de promotor e a variabilidade em regiões fora da sequência amplificada, principalmente no domínio LRR, responsável pela especificidade do patógeno. É interessante salientar que apesar de *C. racemosa* apresentar um único alelo, este possui um número maior de substituições de aminoácidos quando comparado às sequências de outros genótipos (Figura 1.3.4). Este fato corrobora o distanciamento genético de *C. racemosa* em relação às outras espécies.

A maioria dos genes R que são membros de famílias multigênicas estão ordenados formando locos complexos. Tal ordenação fornece substrato para eventos de recombinação freqüentes, levando à origem de novos genes através de pareamento desigual, recombinação intra/intergênica, e duplicação gênica. Os eventos de recombinação conferem à planta vantagem seletiva face a rápida evolução das populações de patógenos (Baker *et al.*, 1997). Isto foi observado em linho a partir de eventos de recombinação intragênica no gene *L* (Hulbert *et al.*, 2001). Portanto, híbridos como o Icatu Vermelho podem ser fonte de novos genes de resistência a diferentes patógenos. O gene identificado pela sequência híbrida Icatu Vermelho 2-2, relatada anteriormente, pode ser responsável pela resistência a uma raça ou patógeno diferente da dos parentais.

Tabela 1.3.1: Classificação para resistência aos principais patógenos do gênero *Coffea* nos genótipos analisados. S - susceptível, R - resistentes, S-R - depende do genótipo planta/patógeno.

<i>Genótipos</i>	<i>Reação quanto à resistência aos patógenos:</i>		
	<i>Meloidogyne spp.</i>	<i>Leucoptera coffeella</i> (bicho mineiro)	<i>Hemileia vastatrix</i> (ferrugem)
Icatu Vermelho	S	S - R	R
Mundo Novo	S	S	S
Apoatã	S - R	R	R
<i>C. racemosa</i>	S - R	R	R (campo) - S (lab)

1.3.11. Confirmação das sequências de RGA baseada em mapa de restrição

Com a finalidade de verificar a autenticidade das seqüências de RGA obtidas, as seqüências nucleotídicas foram mapeadas por sítios de restrição utilizando-se o programa *WebCutter*. O mapa de restrição para os fragmentos sequenciados de RGA indicou *MseI* como uma enzima capaz de distinguir alguns grupos de seqüências, pois resultou em fragmentos de fácil identificação de peso molecular. Os sítios de restrição de *MseI* para cada seqüência estão apresentados na tabela 1.3.2 e o resultado da digestão dos fragmentos por esta enzima está apresentado na figura 1.3.7.

Comparando-se os sítios de restrição resultantes do mapa (tabela 1.3.2) com os fragmentos obtidos pela digestão (Figura 1.3.7) os seguintes polimorfismos são confirmados:

IV	seqüências 2-1 e 2-2 distintas de 2-3
MN	seqüências 2-1 e 2-2 distinta de 1
AP	seqüências 2-1 distinta de 2-2, 2-3, 1, 2 e 3

Tabela 1.3.2: Fragmentos de restrição gerados pela enzima *MseI* para as seqüências de RGA.

Genótipo	Seqüência	MSEI
IV	2-4 (2-2)	354 464
	2-16 (2-3)	
	2-5 (2-1)	354 464
RA	2-25 (2-1)	354
MN	2-6 (2-2)	354 464
	2-5 (2-1)	354 464
	1-10 (1)	
AP	1-2 (1)	
	1-29 (3)	
	1-14 (2)	
	2-33 (2-1)	354
	2-14 (2-3)	
	2-45 (2-2)	

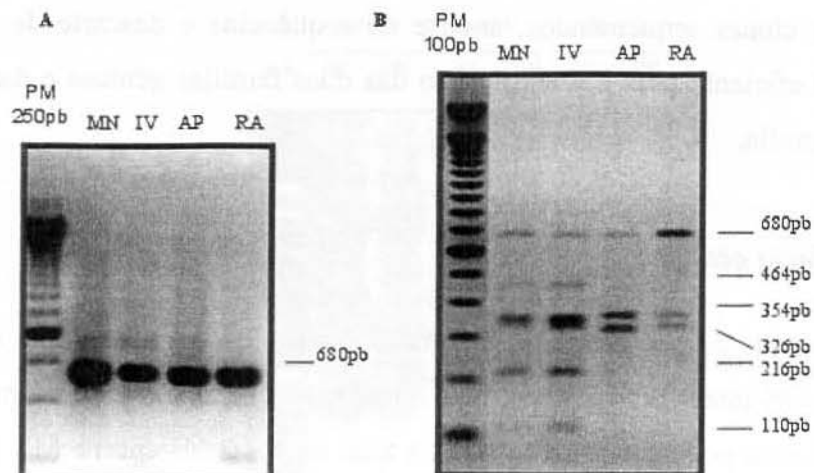


Figura 1.3.7: (A) Amplificação de fragmentos de RGA utilizando os *primers* KIN e MHD2 para posterior purificação e digestão dos fragmentos com enzimas de restrição. (B) Padrão obtido a partir da digestão dos fragmentos de (A). A enzima de restrição utilizada para verificação de seqüências foi *MseI*, resultante da análise do mapa de restrição para as seqüências de RGA deste estudo.

Contudo, a seqüência única de *C. racemosa* (RA - família MHD) possui sítio de restrição para *MseI* no nucleotídeo 354 do fragmento, que resultaria apenas nas bandas de 354pb e 326pb. Porém, uma banda de 680pb foi encontrada. Isso pode ser decorrência da dificuldade de se amplificar famílias gênicas por PCR, já que a amplificação é dependente das primeiras seqüências amplificadas complementares ao *primer*. Assim, apesar de sequenciados 40 clones de RA, todos apresentaram a mesma seqüência enquanto que na amplificação para digestão, pelo menos duas seqüências distintas foram verificadas.

Mais uma vez, a proximidade entre MN e IV é confirmada pela presença dos mesmos sítios de restrição, que caracterizam a presença dos mesmos genes em MN e IV. Estes, são originários não apenas da hibridação mas também das subseqüentes etapas de retrocruzamento com MN (Figura 2.2.1).

A utilização de enzimas de restrição para confirmação de seqüências é de grande valor quando o mapa de restrição apresenta sítios informativos. Sítios informativos, neste caso, são aqueles que fornecem fragmentos em número e tamanho distinguíveis em gel de agarose. Neste trabalho, não foi possível a obtenção de sítios informativos suficientes para distinção de todas as seqüências obtidas. Apesar disso, a distinção polimórfica resultante da digestão de *MseI* para cada genótipo deixa claro que o nível de exigência adotado neste trabalho, tanto

para número de clones sequenciados, análise de seqüências e descarte de seqüências não reproduzidas foi eficiente para a identificação das duas famílias gênicas e das seqüências de RGA em cada família.

1.3.12. Frequência gênica

Para verificação da frequência no genoma dos genes que compartilham a região clonada neste trabalho (NBS-interNBS-LRR) foi feita hibridação com sonda proveniente de seqüências de RGA amplificadas por KIN/MHD2. O DNA total de AP (resistente) e MN (susceptível) foi digerido pelas enzimas *HindIII*, *BamHI* e *XhoI* e hibridados com a sonda marcada radioativamente.

A região da sonda utilizada, não apresenta ou apresenta poucos sítios de restrição para estas enzimas (verificada no mapa de restrição). Isto significa que as várias bandas indicam a presença de mais de uma cópia do gene no genoma (Figura 1.3.8). Principalmente porque genes de cópia simples apresentam uma, duas ou três bandas dependendo da frequência do sítio de restrição da enzima utilizada. Os fragmentos obtidos apresentam alto peso molecular, nenhum sinal radioativo foi encontrado abaixo de 1.000 pb. Este também é um indicativo de que o corte destas enzimas neste genoma não é muito freqüente. Isto já era esperado, pois as enzimas *HindIII*, *BamHI* e *XhoI* são enzimas de cortes pouco freqüentes, por reconhecerem seqüências de seis nucleotídios cada.

A obtenção de apenas uma banda, mas muito bem marcada para *XhoI*, provavelmente é um indicativo de que os genes, na região de marcação da sonda não possuem sítio para esta enzima, mas que fora destas seqüências possuem sítio na mesma posição, portanto, estariam todos agrupados em uma única banda com marcação bem forte. Neste caso, *XhoI* não detectou bandas polimórficas entre AP e MN.

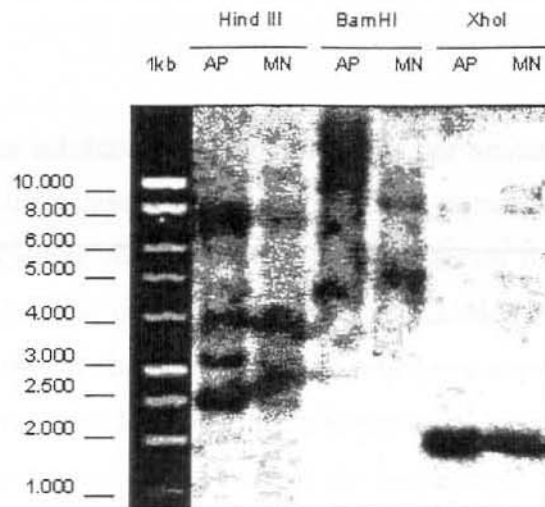


Figura 1.3.8: Análise de *Southern blot* de DNA total de *C. arabica* (MN) e *C. canephora* (AP) utilizando sonda radioativa de fragmento correspondente a RGA.

Os padrões de grande quantidade de bandas e forte marcação não caracterizam genes de cópia simples, mas sim genes que possuem mais de uma cópia no genoma. Portanto, característico de genes pertencentes a famílias multigênicas.

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RGAS
EM GENÓTIPOS RESISTENTES E
SUSCEPTÍVEIS AO NEMATÓIDE
*Meloidogyne exigua***

2.1. INTRODUÇÃO

Perdas econômicas substanciais são ocasionadas por nematóides parasitas de raízes, que obtêm seu alimento exclusivamente de células vivas. Os nematóides endoparasitas sedentários de raízes, entre eles, espécies do gênero *Meloidogyne*, foram os que alcançaram o mais alto grau de eficiência na obtenção de alimento. Estes nematóides invadem a raiz e transformam algumas células em estruturas altamente especializadas para suprir a demanda nutricional para seu desenvolvimento e reprodução. A melhor alternativa para o controle dos nematóides até o momento é a utilização da resistência natural do hospedeiro, que vêm sendo utilizada em muitas espécies vegetais de importância econômica tais como soja, tomate, batata, beterraba e café. Consequentemente, muitos trabalhos têm sido realizados visando a identificação e clonagem de possíveis genes de resistência a nematóides. Até o momento, um único estudo verificou a expressão destes genes durante a infecção por *M. incognita*, através da expressão transiente do gene de resistência (Milligan *et al.*, 1998). Porém, nenhum outro trabalho verificou se estes genes identificados ou clonados estão sendo expressos em condições naturais de resistência e susceptibilidade a nematóides.

Esta dissertação apresenta a análise da expressão de RGAs em plantas de café, resistentes e susceptíveis a nematóides, inoculadas e não-inoculadas com *M. exigua*. Apesar de ter sido observada expressão basal tanto em genótipos resistentes quanto susceptíveis, os RGAs apresentaram diferença na quantidade de RNAm expresso tanto ao longo do tempo após a inoculação quanto no padrão de expressão obtido.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

Para a análise da expressão dos genes identificados como RGAs foram avaliadas progênies irmãs de *C. arabica* var. Icatu Vermelho. Esta variedade é derivada de um híbrido interespecífico resultante do cruzamento de *C. arabica* e *C. canephora* (Figura 2.2.1). A resistência e susceptibilidade ao nematóide *M. exigua* das progênies utilizadas foi avaliada em trabalho anterior e estão apresentadas na tabela 2.2.1 (Silvarolla *et al.*, 1998).

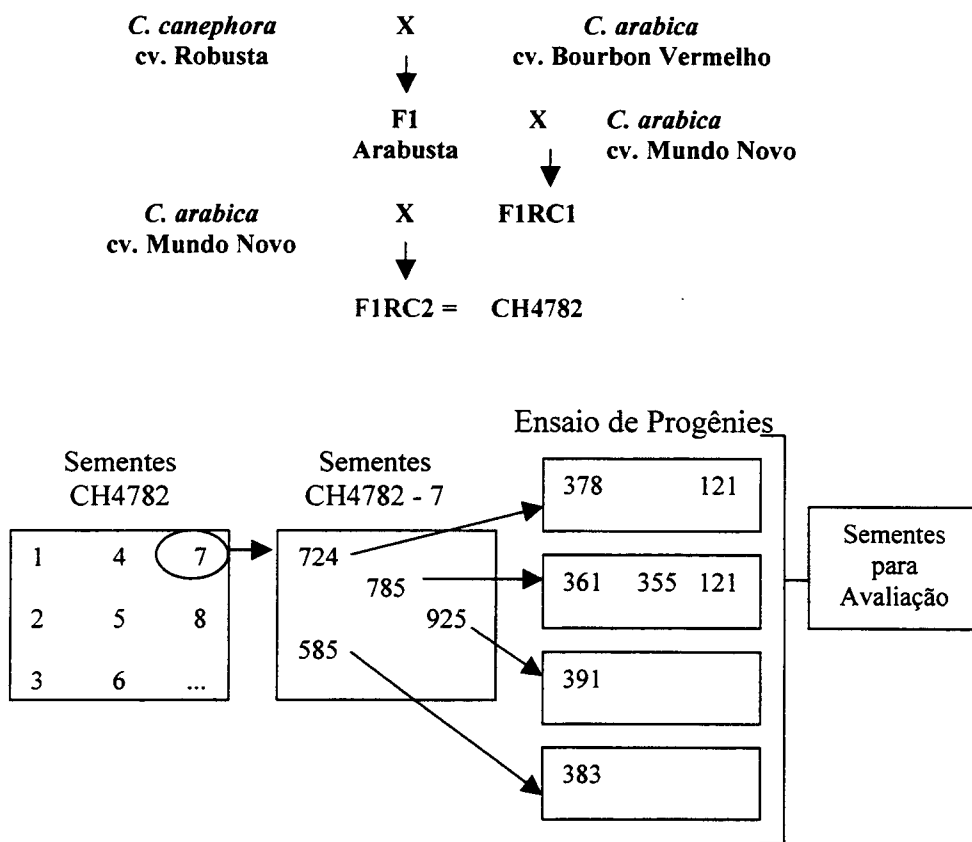


Figura 2.2.1: Origem da linhagem CH4782 de Icatu Vermelho (Fazuoli, 1991) e subsequente obtenção de linhagens para avaliação de progênies irmãs.

Tabela 2.2.1: Genótipos utilizados para análise da expressão de RGAs: Mundo Novo (*C. arabica*) como controle susceptível, Apoatã (*C. canephora*) como controle resistente e progênies segregantes de Icatu Vermelho CH4782 para o nematóide *M. exigua*, avaliados em Silvarolla e colaboradores (1998). EP: ensaio de progênie; EP e Cova referem-se a identificação/localização, das progênies em estudo, no IAC. R: resistente, S: susceptível.

Cafeeiros	EP	Cova	R/S
Mundo Novo IAC 388-17			S
Apoatã IAC 3597 Col 1 Planta A			R
IAC H4782-7-724	378	1814	R
	121	1056	R
IAC H4782-7-785	361	621	S
	355	1200	R
	121	1297	R
IAC H4782-7-925	391	670	S
IAC H4782-7-585	383	224	S

2.2.2. Preparo de mudas para o inóculo

A colheita dos frutos do café foi feita entre abril a junho de cada ano. Após colhidos, os frutos foram despulpados para obtenção das sementes. Estas passaram por processos de fermentação, lavagem e secagem. A seguir, as sementes foram plantadas em estufas de areia onde germinaram e permaneceram até o ponto de "palito de fósforo" (Figura 2.2.2) por aproximadamente 1 mês. Nesta etapa, as plântulas foram transplantadas para copos em substrato de areia-argila estéril onde permaneceram até a idade de dois pares de folhas, quando foram infectadas com nematóides.

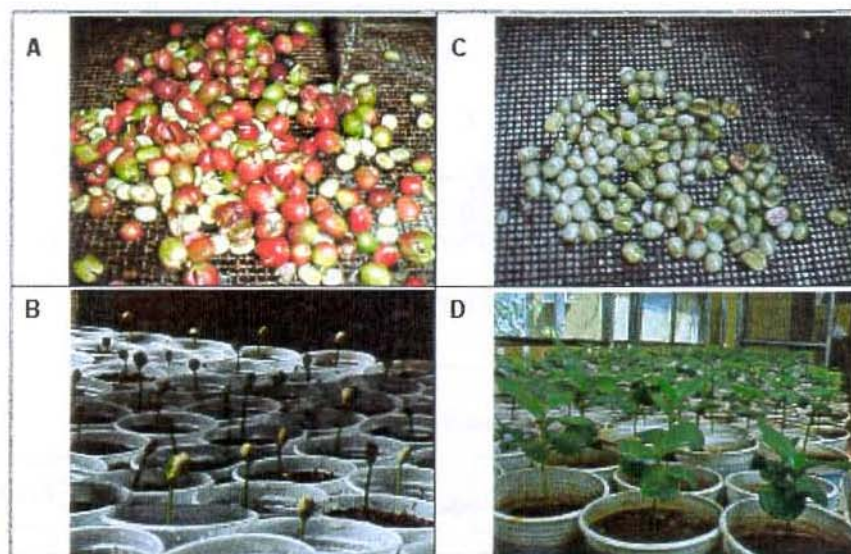


Figura 2.2.2: Preparação de mudas para avaliação da resistência e susceptibilidade ao nematóide *Meloidogyne exigua*. (A) Depolpamento dos frutos. (B) Grãos de café são mantidos sob fermentação, lavados e secos para o plantio em areia. (C) Etapa de "palito de fósforo", aproximadamente após um mês no substrato de germinação (areia); nesta etapa são transplantados para substrato de areia e argila. (D) Etapa de "dois pares de folhas", aproximadamente dois meses após o transplante, idade para a inoculação dos nematóides.

2.2.3. Cultivo e inoculação de nematóides

Inóculos provenientes de cafezais infestados por *M. exigua* foram propagados em cafeeiros, em casa de vegetação. Para a avaliação de resistência a *M. exigua*, os ovos foram extraídos batendo-se as raízes de multiplicação do patógeno em solução 1% de hipoclorito, que dissolve a mucilagem que envolve os ovos nas raízes. Esta solução foi passada por duas peneiras, a primeira de número 60 retém a raiz batida e a segunda de número 500 retém os ovos. O número de ovos por mililitro foi estimado em microscópio e cerca de 5000 ovos/copo foram inoculados em raízes de plântulas de idade de dois pares de folha, em casa de vegetação (Figura 2.2.3).

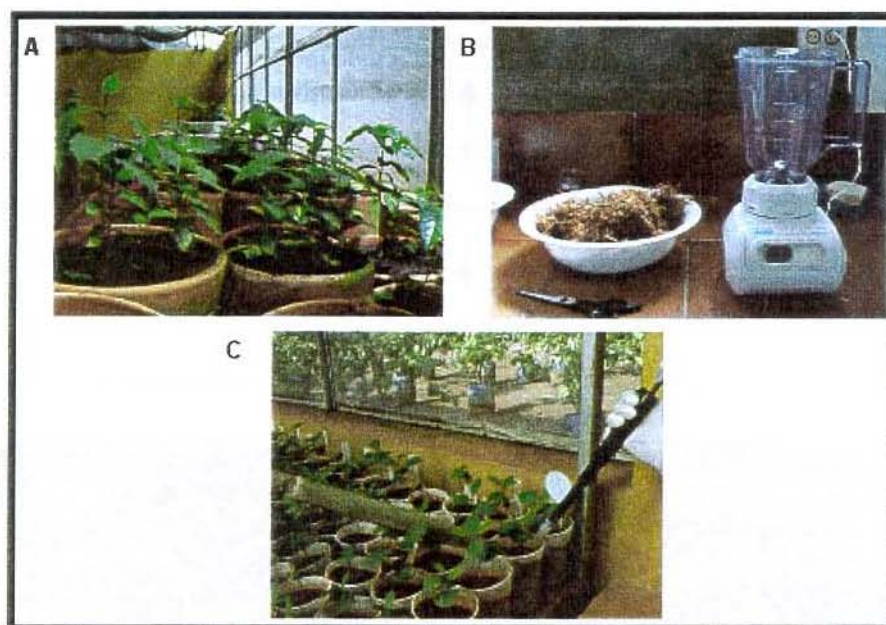


Figura 2.2.3: Cultivo de nematóides e inoculação para avaliação de resistência. (A) Vasos de *C. arabica* var. Mundo Novo para multiplicação de *M. exigua*. (B) Extração dos ovos através de liquidificador com solução 1% de hipoclorito de sódio. (C) Inoculação de cerca de 5000 ovos/copo.

2.2.4. Avaliação fenotípica de resistência dos genótipos em estudo

A reprodução dos nematóides foi avaliada pelo índice de massa de ovos e/ou galhas presentes no sistema radicular das plantas. A avaliação foi realizada aproximadamente 120 dias após a inoculação. Dez plantas provenientes de sementes de cada genótipo (Tabela 2.2.1) foram avaliadas através da atribuição de pontos em função da reprodução dos nematóides medida pela contagem do número de galhas por raiz, índice de galhas (IG) (tabela 2.2.2). Atribuídos os pontos, calculou-se a porcentagem de IG menor ou igual a dois para determinação da reação do cafeeiro ao nematóide, ou seja, resistente ou susceptível. A figura 2.2.4 apresenta uma raiz altamente susceptível, nota 5, e uma raiz altamente resistente, nota 0.

Tabela 2.2.2: Índice de galhas (IG) para avaliação de resistência e susceptibilidade a nematóides e reação do cafeeiro.

	Nota	IG
Resistente	0	0
	1	1 a 2
	2	3 a 10
Susceptível	3	11 a 30
	4	31 a 100
	5	> 100

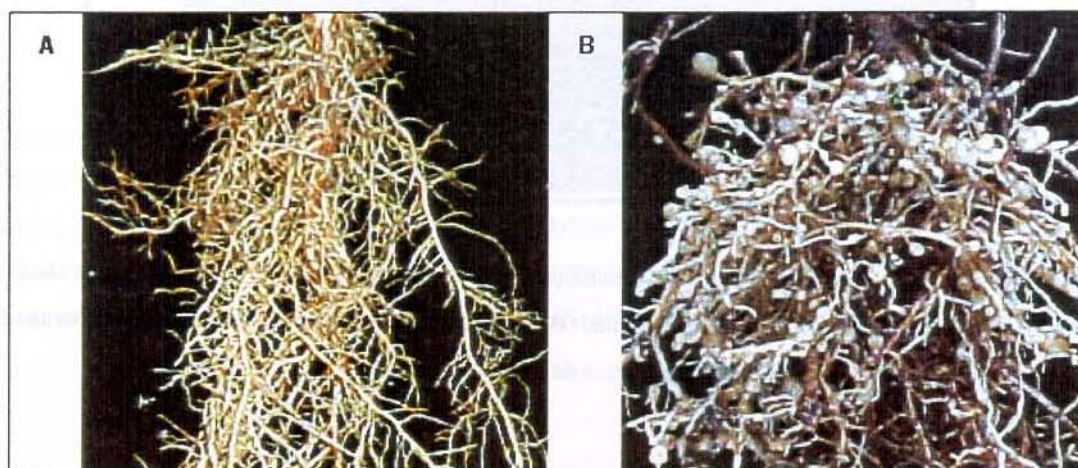


Figura 2.2.4: Padrões de resistência e susceptibilidade ao nematóide *M. exigua*. (A) Raiz de planta altamente resistente, nota de avaliação 0. (B) Raiz de planta altamente susceptível, nota 5.

2.2.5. Extração de RNA

A extração de RNA de café foi feita baseada em Maluf *et al.* (1997) e utilizando-se o mini kit *RNeasy Plant (Qiagen)*. Resumidamente, 100 a 500 mg de tecido radicular de café foi macerado em nitrogênio líquido. Ao macerado foi adicionado 5 ml de tampão de extração guanidina (8M guanidina-HCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 2% PVP PM 40000 e 50mM β -mercaptoetanol). Adicionou-se 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi misturada em vortex por 30s e centrifugada a 10,000g por 15 min. Com a fase superior foi repetida a extração com fenol: clorofórmio : álcool isoamílico mais uma vez e mais duas vezes com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A precipitação foi feita com 0,2 volumes de ácido acético 1M e 1 volumes de etanol gelado 100%. Após precipitação overnight a -20°C , centrifugou-se a 13,000g por 30min. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foram feitas duas lavagens com acetato de sódio 3M pH 5,2 e uma lavagem com etanol 70% gelado. A ressuspensão do RNA foi feita com água-DEPC ultra-pura. A verificação da qualidade do RNA total foi feita por visualização em gel após eletroforese em condições desnaturantes e amplificação de seqüência do gene da actina. O RNA total foi quantificado através da absorbância a 260nm. Todas as amostras foram tratadas com *DNase I Amplification Grade (Invitrogen)*, seguindo as instruções do fabricante.

2.2.6. Obtenção de fragmentos controle – desenho de primers para actina

Para o controle da amplificação de cDNA foram utilizados *primers* de actina desenhados especificamente para o gene de actina de café. Os *primers* são: actinF (5'-3'): GAC CTC ACA GAT CAC CTC AT e actinR (5'-3'): GTA GTC TCG TGG ATA CCA GC. O fragmento amplificado por este par de primers tem um tamanho aproximado de 290 a 300pb.

2.2.7. Análise da expressão de RGAs

Esta avaliação foi feita através da técnica de *reverse transcriptase-PCR*, RT-PCR. Para tal, foram utilizados 400ng de RNA total extraídos de plantas susceptíveis e resistentes a nematóides, como molde para amplificação, utilizando-se o kit RT-PCR: *ThermoScriptTM RT-*

PCR System (Life Technologies). Os *primers* utilizados na reação, foram desenhados a partir das seqüências amplificadas do café, obtidas em etapa anterior. O *primer forward* (KIN1) foi mantido.

Os *primers reverse* desenhados para esta etapa foram:

MHD2: 5' a 3': CGTGCATCCTGTACTTCTCT

EGF2: 5' a 3': TGCTTCTTATGAACCCTTCC

CFA1: 5' a 3': CAAGGTACAGAAAACATGGT

2.2.7.1. Teste de tempo de infecção

Um total de 18 mudas de *C. arabica* var. Mundo Novo, variedade susceptível, e 18 mudas de *C. canephora* var. Apoatã, variedade resistente, foram inoculadas com o nematóide *M. exigua*, como explicado no item 2.2.4. Para avaliar se a expressão de RGAs varia ao longo do tempo após a infecção do nematóide, 3 raízes de cada variedade foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido nos tempos 0 (não-inoculado), 24 horas, 3, 10, 21 e 30 dias.

2.2.7.2. Análise de expressão nos híbridos de Icatu Vermelho

Mudas das progênes irmãs do híbrido Icatu Vermelho (tabela 2.1) foram inoculadas com o nematóide *M. exigua*. Após 0 (não-inoculado), 3, 10 e 21 dias de inoculação, as raízes foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido para posterior análise da expressão de RGAs por RT-PCR.

2.2.8. Mapa de restrição – verificação de seqüências

Através do programa WEBCutter, disponível em rede pelo site: <http://www.bionet//hypermail/METHDS-REAGENTS/methods.199811/0054.html>, foi construído o mapa de restrição para todas as seqüências como descrito no Capítulo 1. Após amplificação das seqüências de RGAs expressos em AP, 10 dias após a inoculação do nematóide, por RT-PCR, os fragmentos foram isolados e purificados para posterior digestão com *MseI*. Após a digestão, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Escolha do par de primers para RT-PCR

A partir das seqüências de café obtidas no Capítulo 1 desta dissertação, foram desenhados *primers* específicos para o café. Em uma primeira etapa, os *primers* foram testados a partir do cDNA das variedades MN e AP após 10 dias da inoculação. Este tempo foi escolhido por ser aquele estimado para o estabelecimento do sítio de alimentação pelo nematóide. Para esta avaliação foram utilizados três pares de *primers*: KIN/MHD2, KIN/EGF2 e KIN/CFA, correspondentes a regiões conservadas de RGA. Como resultado dessas amplificações, apenas o par KIN/MHD2 apresentou diferenças no padrão de amplificação de RGAs entre os genótipos resistente (AP) e susceptível (MN) (Figura 2.3.1). Os pares de *primers* KIN/EGF2 e KIN/CFA apresentaram padrão de amplificação semelhante entre MN e AP. Isto sugere que amplificaram fragmentos de genes igualmente expressos nos duas variedades, sendo, portanto, pouco informativos para a avaliação de expressão de RGAs em resposta à infecção por nematóides. Desta forma, o par de *primers* KIN/MHD2 foi escolhido para a análise de RT-PCR e avaliação da expressão ao longo da infecção em variedade resistente e susceptível ao nematóide e em progênies segregantes.

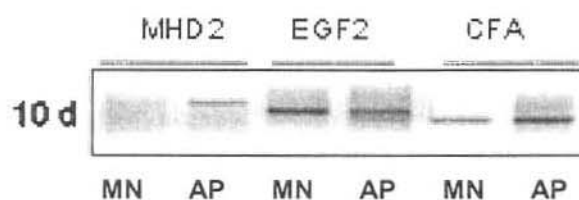


Figura 2.3.1: Amplificação de RGAs expressos em AP e MN por diferentes pares de *primers*.

2.3.2. Confirmação da identidade de RGAs expressos

Para confirmar que os fragmentos amplificados a partir do cDNA correspondem a RGAs foi feito o sequenciamento dos fragmentos de Apoatã (AP) e Mundo Novo (MN) não-inoculados. A figura 2.3.2 apresenta as seqüências obtidas a partir da amplificação de cDNAs

por KIN/MHD2, confirmando a identidade destas como sendo RGAs. As seqüências amplificadas pelos outros primers também foram confirmadas como sendo RGAs.

Família EGF	
1 MN C	ILDDVWTNDVWKEPKVFPDNNKGSRLITTRHKFVAEYSKSKIRPYDLRFLFPESR
2 AP C	ILDDVWTNDVWKEPKVFPDNNKGSRLITTRHKFVAEYSKSKIRPYDLRFLFPESR
	ELLRTKVFDENRCPEHLEEMETNILDCKGGLPLAIVVTAGILRNNRERKEWWEKVFRGVS
	ELLRTKVFDENRCPEHLEEMETNILDCKGGLPLAIVVTAGILRNNRERKEWWEKVFRGVS
	NLVDDDDQKRSEMLIKLSYDHLFPQLKPCFLYLGVPEDVDIPVWKLRLWIAEGFIRS
	NLVDDDDQKRSEMLIKLSYDHLFPQLKPCFLYLGVPEDVDIP
Família MHD	
1 AP C	KGVKAIADGIVSKCDGLPLAVEAIGCLLRNKDLYKUSDILNNDLATVEEEFRDEKHRTL
2 MN C	KDVKAIVDGIIVSKCDGLPLAVEVIGCLLRPQARHKWSGILNNDLAKVEEEYRDEKHRTL
	VLRLSYFHLPPPELKHCFSCSIFPKGHEFEKDELVKLUMAHSLVQPSKLAETLQDKGRY
	VLRLSYFHLPPPELKHCFSCSIFPKGHEFEKDELVKLUMAHSLVQPSKLAETLEEKGRRC
	FDRLQELSFQQKPESEKYRMH
	FDRLQELSFQQKPESEKYRMH

Figura 2.3.2: Seqüências de cDNA identificadas como RGA. Alinhamento das seqüências de proteínas deduzidas dos cDNAs de plantas não inoculadas resistentes e susceptíveis ao nematóide *M. exigua*. MN C - Mundo Novo (susceptível) controle, não inoculado; AP C - Apatã (resistente) controle, não inoculado.

2.3.3. Avaliação de resistência e susceptibilidade da planta ao nematóide *M. exigua*

A avaliação fenotípica de resistência e susceptibilidade ao nematóide *M. exigua* não foi feita para os mesmos indivíduos da avaliação do RT-PCR. Isto porque para a extração de RNA, toda a raiz de cada indivíduo foi coletada, não sendo possível a manutenção do mesmo indivíduo para a avaliação fenotípica que ocorre após 3 meses da inoculação do nematóide. Portanto, foi feita uma avaliação paralela para a confirmação da resistência ou susceptibilidade dos genótipos em estudo, anteriormente avaliados por Silvarolla e colaboradores (1998), com sementes irmãs das plantas infectadas para a avaliação da expressão por RT-PCR. Esta avaliação fenotípica é baseada no índice da galhas presentes 3 meses após a inoculação do nematóide. Para tal avaliação considera-se que uma planta é resistente quando ocorre

interrupção do ciclo de vida do nematóide restringindo sua multiplicação, portanto, nenhuma ou poucas galhas estão presentes nas raízes. Enquanto que em uma planta susceptível o nematóide desenvolve-se e multiplica-se rapidamente apresentando elevadas quantidades de galhas. A tabela 2.3.1 apresenta as notas do índice de galha baseadas na quantidade de galhas presentes na raízes e a atribuição de resistência ou susceptibilidade.

Tabela 2.3.1: Índice de galhas (IG) para avaliação de resistência e susceptibilidade a nematóides.

	Nota	IG
Resistente	0	0
	1	1 a 2
	2	3 a 10
Susceptível	3	11 a 30
	4	31 a 100
	5	> 100

Para cada planta foram avaliadas 10 sementes para a obtenção da porcentagem de segregação para resistência. Portanto notas individuais foram atribuídas para o cálculo da porcentagem de notas menores ou iguais a 2, ou seja, porcentagem de plantas resistentes. A tabela 2.3.2 apresenta as notas do índice de galha e a porcentagem de notas menores ou iguais a 2.

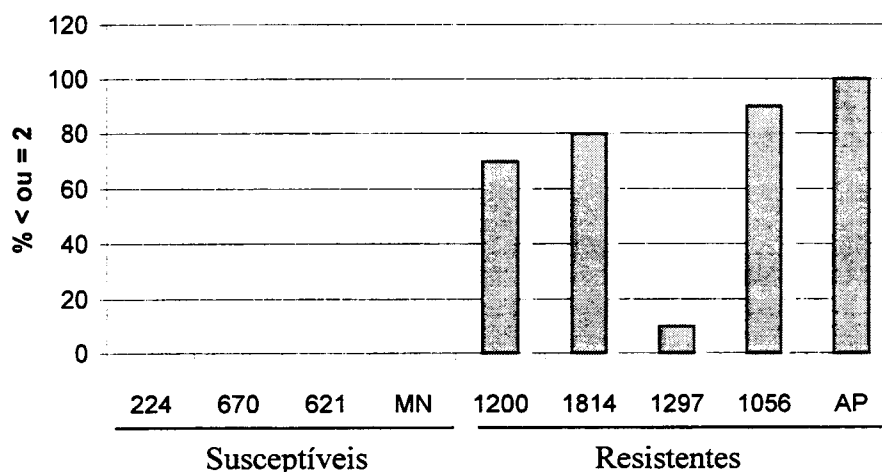


Figura 2.3.3: Porcentagem de plantas com IG menor ou igual a 2 e reações do cafeeiro (resistente/ susceptível) aos 120 dias após a inoculação com 5.000 ovos de uma população de *M. exigua*.

2.3.4. Análise de RT-PCR

2.3.4.1. Expressão de RGAs ao longo do tempo após a inoculação com o nematóide M. exigua

Para a verificação da expressão de RGAs ao longo do tempo após a inoculação do nematóide foram feitas coletas de raízes de plantas resistentes e susceptíveis nos tempos 0 (não-inoculado), 24 horas, 3, 10, 21 e 30 dias após a inoculação com ovos de *M. exigua*. Após a extração do RNA total, este foi transcrito reversamente em cDNA para a amplificação de fragmentos de RGAs com os *primers* KIN/MHD2. A expressão de RGAs foi avaliada ao longo do tempo em condições de inoculação e não-inoculação de *M. exigua* nas variedades AP, variedade resistente, e MN, variedade susceptível. A presença de fragmentos resultantes da amplificação por RT-PCR indica a ocorrência de acúmulo de RGAs expressos e, portanto, será considerado como alta expressão de RGAs. Já a ausência de fragmentos ou baixa detecção será considerada como baixa expressão de RGAs.

A figura 2.3.4 apresenta o resultado da amplificação de RGAs e do controle (actina). A variedade AP apresentou diferença no acúmulo de mRNA de RGAs ao longo do tempo pós-infecção enquanto MN apresentou queda na expressão de RGAs observada a partir de 24h. A diferença mais marcante entre os genótipos resistente e susceptível está aos 10 dias após a infecção. Enquanto os RGAs estão altamente expressos em AP, em MN quase não há expressão. Convém salientar que os experimentos foram repetidos diversas vezes obtendo-se sempre o mesmo resultado. No tempos 0, 24h, 3d, 21d e 30d não foi observada diferença marcante entre AP e MN, enquanto que aos 10 dias ocorre o acúmulo de RGAs expressos apenas em AP (variedade resistente). AP e MN não-inoculados (tempo zero) apresentam aparentemente uma diferença na expressão de RGAs, porém, em algumas repetições, AP apresentou banda referente aos RGAs, apesar de apresentar menor intensidade. Além disso, quando aumentada a quantidade de RNA total para a transcrição reversa o fragmento correspondente a RGAs foi obtido.

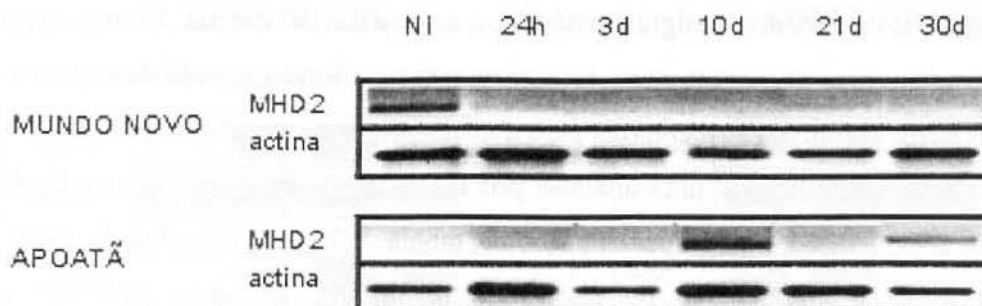


Figura 2.3.4: Avaliação da expressão de RGAs por RT-PCR, ao longo do tempo após a inoculação de ovos de nematóides em plantas resistentes e susceptíveis. NI: não-inoculado; os tempos 24h, 3d, 10d, 21d e 30d, correspondem ao tempo de coleta após a inoculação de ovos de *M. exigua*.

Este resultado, analisado em conjunto com o anterior, sugere que a alteração na expressão desses genes e a queda na expressão dos genes analisados neste trabalho é decorrente de uma regulação negativa da expressão de locos do tipo NBS/LRR em MN após 24 horas da inoculação. Além disso, o acúmulo de RNAm em AP aos 10 dias sugere a participação desses genes no mecanismo de resistência a nematóides desta variedade. Estudos da expressão gênica de células gigantes demonstraram que para otimizar a qualidade da estrutura de alimentação, os parasitas regulam negativamente alguns ou todos os promotores de genes cuja expressão não é essencial para a estrutura modificada de alimentação (Goddijn *et al.*, 1993). Isso permitiria que toda a maquinaria de síntese protéica esteja disponível para o desenvolvimento da estrutura de alimentação e para o acúmulo de um suprimento massivo de nutrientes (Sijmons, 1993). Através de construções de fusão de promotores com o gene GUS em *Arabidopsis* e tabaco, foi observado que mesmo aqueles promotores, como CaMV 35S e nopalina sintase, que ativam fortemente a expressão de genes de raiz, são completamente silenciados após alguns dias da infecção (Goddijn *et al.*, 1993).

2.3.4.2. Análise da expressão de RGA em progênies irmãs do híbrido Icatu Vermelho, resistentes e susceptíveis ao nematóide M. exigua

A obtenção de variedades resistentes a pragas e patógenos que produzam grãos com boa qualidade de bebida é um dos principais objetivos do Programa de Melhoramento do Cafeeiro do IAC. A variedade Icatu Vermelho de *C. arabica* é de grande interesse para este programa,

pois segrega para resistência a alguns patógenos, entre eles, *M. exigua*. Dentre as progênes de Icatu Vermelho que segregam para esta característica foram escolhidos quatro genótipos resistentes e três genótipos susceptíveis para a avaliação da expressão de RGAs.

Os genótipos utilizados para análises por RT-PCR, assim como sua avaliação quanto a resistência a *M. exigua*, estão apresentados na tabela 2.2.1. Os híbridos de Icatu Vermelho 1297, 1056, 1814 e 1200 são resistentes ao nematóide, enquanto 224, 621 e 670 são susceptíveis. A análise de RT-PCR foi realizada com uma progênie de cada híbrido.

O acúmulo de RNAm aos 10 dias pós-inoculação obtido com AP e MN também foi observado nos híbridos resistentes, e outro padrão de expressão aos 3 dias foi observado nos híbridos susceptíveis (Figura 2.3.5). Desta forma, o tempo de 10 dias de infecção, observado tanto nos híbridos quanto na variedade Apoatã, pode ser utilizado como marcação de resistência a *M. exigua* em café.

Apesar de provenientes de um cruzamento entre *C. canephora* e *C. arabica*, os híbridos de Icatu Vermelho não apresentaram queda contínua de expressão de RGAs após 24 horas da inoculação, como ocorre em MN. Porém, foi observado acúmulo de RGAs expressos nos híbridos susceptíveis aos 3 dias após a inoculação do nematóide, apresentando um padrão diferente de expressão de RGAs, tanto em relação a MN quanto em relação aos híbridos resistentes. Este padrão de expressão pode ser decorrente do surgimento de seqüências híbridas de RGA, tais como a seqüência IV 2-2 (Figura 1.3.4), ou de genes envolvidos na regulação deste mecanismo de defesa que levariam ao acúmulo de RGAs observado aos 3 dias após a inoculação do nematóide. A identificação de muitos genes homólogos de defesa por *Screening diferencial* de bibliotecas de cDNA de pontas de raiz, infectadas por 12 horas com nematóides formadores de galhas, mostrou que a maioria desses genes também são induzidos em plantas susceptíveis, embora se distingam na quantidade e tempo de indução (Williamson & Hussey, 1996; Williamson, 1998). Portanto, provavelmente um outro mecanismo de interação patógeno-planta, diferente daquele presente em MN, pode estar relacionado com a susceptibilidade ao nematóide observada nos híbridos.

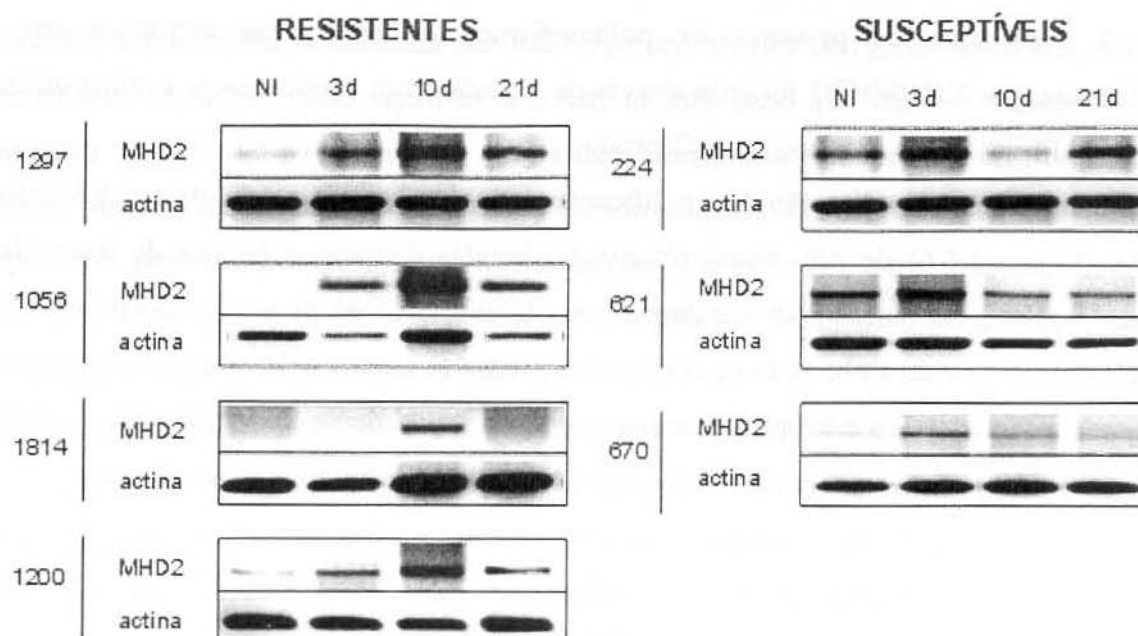


Figura 2.3.5: Análise da expressão de RGAs por RT-PCR em progênies irmãs de Icatu Vermelho, resistentes e susceptíveis a *M. exigua*. A quantidade de RGA expresso foi verificada nos tempos 0 (não inoculado – NI), 3, 10 e 21 dias após a inoculação do nematóide.

2.3.4.3. Expressão basal de RGAs

A presença de RGAs expressos tanto em híbridos resistentes quanto em híbridos susceptíveis não inoculados (Figura 2.3.5) indica que os RGAs estão sendo expressos mesmo na ausência de *M. exigua*. Este resultado não é surpreendente, pois análises de RNA blot utilizando *RPS2*, *RPM1*, *Pto*, *Cf-9* e *Cf-2* como sondas revelaram a presença de transcritos em baixa concentração em plantas sem o patógeno, indicando que pelo menos o gene *RPM1* e alguns membros de famílias multigênicas são expressos na ausência do patógeno (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Milligan e colaboradores (1998) também constataram que genes homólogos ao gene *Mi*, que confere resistência a nematóides em tomate, também estão sendo transcritos em tomates susceptíveis. Esta expressão basal já era esperada, pois os RGAs tem como provável função a de codificação de proteínas de interação com patógenos que, portanto, devem estar presentes no momento da infecção.

2.3.5. Comparação entre fragmentos resultantes da digestão de DNA e cDNA de AP

A verificação da presença de polimorfismos de seqüências expressas em AP amplificadas por KIN/MHD2 foi feita através da digestão com *MseI*, mesma enzima utilizada para a confirmação das seqüências no Capítulo 1.

Comparando-se a digestão da amplificação de DNA com a digestão da amplificação de cDNA (Figura 2.3.6) de AP, foram observadas bandas distintas e bandas de intensidades diferentes. Estas diferenças pode ser decorrentes da amplificação de seqüências polimórficas, principalmente devido a obtenção de fragmentos presentes no transcrito e ausentes no genoma (fragmentos de 464, 216 e 110pb). Portanto, com este experimento foi verificada a ocorrência de polimorfismos destes genes detectados devido a eventos de amplificações distintos.

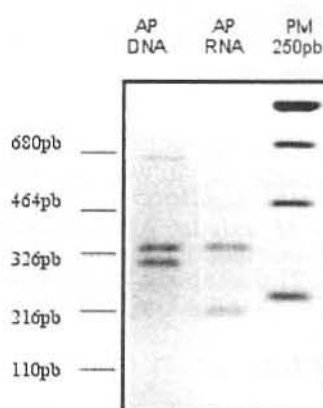


Figura 2.3.6: Digestão com a enzima de restrição *MseI* dos fragmentos amplificados por PCR a partir do DNA total de AP, e por RT-PCR a partir do cDNA de AP 10 dias pós-infecção.

2.3.6. Especificidade dos genes a determinados patógenos.

Em nível molecular, os nematóides utilizam estratégias conceitualmente similares a outros microorganismos na interação com as plantas (Bird & Koltai, 2000). O gene *Mi* de tomate, que confere resistência a *M. incognita* também confere resistência a afídios (Rossi *et al.*, 1998). Uma possível explicação é que MI é capaz de reconhecer dois ou mais elicitores ou produtos de avirulência diferentes mas que compartilham a mesma via de resposta (Williamson, 1998). Há evidências de que outros genes R respondam a mais de um elicitor. O gene *RPM1* de *Arabidopsis*, confere resistência a linhagens de *Pseudomonas syringae* que possuem genes de avirulência não relacionados, *avrRpm1* e *avrB* (Grant *et al.*, 1995).

Portanto, a resistência relacionada aos RGAs parece não ser patógeno específica, mas sim, mecanismo específica. Isso significa que um mesmo gene que confere resistência a um patógeno pode conferir resistência a outros que compartilham as mesmas vias de defesa da planta. Apesar disso, muitos dos genes R identificados até o momento são altamente específicos para biótipos particulares de nematóides. Por exemplo, tomateiros que carregam o gene *Mi* podem ser resistentes a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*, mas não ao *M. hapla* (Gilbert & McGuire, 1956).

Neste trabalho, foram testados alguns *primers* que amplificam RGAs, mas que não apresentam diferença no padrão de expressão entre variedades resistentes e susceptíveis a *M. exigua* (Figura 2.3.1), como KIN/CFA e KIN/EGF2. Apenas o par de *primers* KIN/MHD2 amplificou fragmentos de genes que têm sua expressão alterada decorrente da infecção de *M. exigua* e mesmo assim, apresentam expressão basal em todos os tempos. Isso sugere que a expressão de RGAs apresenta certa especificidade, já que diferentes níveis de expressão de RGAs foram observados a partir dos *primers* KIN/MHD2. Os outros pares de *primers*, KIN/CFA e KIN/EGF2, provavelmente amplificam RGAs que participam de outros processos celulares incluindo defesa a outros patógenos.

2.3.7. Hipóteses de atuação de RGAs na resistência ao nematóide

A função desempenhada pelas proteínas NBS-LRR ainda é desconhecida. Até o momento, os trabalhos baseiam-se na estrutura bioquímica e nas funções atribuídas aos domínio protéicos NBS e LRR para inferência do papel destas proteínas. Desta forma, as proteínas com domínios do tipo LRR e NBS parecem ter função citoplasmática, pois não apresentam domínio transmembrana (Cordeiro & Sá, 2000). Por outro lado, mesmo não apresentando esse domínio, o gene de resistência *Rpm1*, de *A. thaliana*, se constitui em uma proteína de membrana plasmática (Boyers *et al.*, 1998), o que corrobora a idéia de que os RGAs devam codificar para proteínas receptoras, sejam citoplasmáticas, sejam de membrana. Estas seriam responsáveis pela especificidade do mecanismo de reconhecimento entre a planta e o patógeno, gerando a transdução de sinal inicial, e induzindo a resposta de defesa e resistência sistêmica.

Na interação com nematóides formadores de galhas, se estas proteínas realmente reconhecem um produto específico do estágio J2, este produto deve estar presente no

citoplasma do hospedeiro. Isto porque os nematóides injetam secreções no citoplasma das células de raiz através do estilete para iniciar o desenvolvimento da estrutura de alimentação. Além disso, a HR associada com a presença do gene *Mi* ocorre próximo à cabeça de J2, cerca de 12 h após a inoculação de larvas, aproximadamente quando o nematóide injeta a secreção pelo estilete para iniciar o desenvolvimento da célula gigante (Williamson & Hussey, 1996).

Em experimentos de sistema duplo-híbrido e ensaios de ligação *in vitro*, Jia e colaboradores (2000) demonstraram que uma proteína R reconhece o respectivo elicitor no citoplasma da célula hospedeira. Neste estudo, foi demonstrado que a região C-terminal rica em leucina da proteína codificada pelo gene *Pi-ta*, responsável pela resistência ao fungo *Magnaporthe grisea* de arroz (*Oryza sativa*), funciona como domínio de ligação ao elicitor. Isso sugere que *Pi-ta* é um receptor intracelular que se liga diretamente a AVR-*Pi-ta*₁₇₆, proteína que inicia a resposta de defesa. Este foi o primeiro gene NBS em que foi observada a ligação direta com o elicitor. Apesar de não possuir o domínio LRR, possui o domínio LRD, *leucin rich domain*, de mesmo tamanho e na mesma posição que LRR, mas que não possui o mesmo padrão de repetição de leucinas.

Por outro lado, alguns estudos sugerem que os genes R atuam como sinalizadores dentro da célula. Como explicação de que *Mi* confere resistência tanto para nematóides formadores de galhas quanto afídeos, Williamson (1998) considera possível que MI não atue diretamente no reconhecimento do patógeno para ambos os patógenos, mas atue como um componente citoplasmático envolvido na cascata de transdução de sinal entre os receptores primários e a resposta de resistência. Neste caso, haveriam receptores específicos que provocam a mesma cascata de transdução de sinal via MI. Outra evidência de que as proteínas NBS-LRR atuam na sinalização é o fato que tomates transformados para a superexpressão do gene *Prf*, que além de ativar as vias de transdução de *Pto* e *Fen*, iniciou a ativação da resposta sistêmica adquirida (SAR), desencadeando uma resposta de defesa não específica na planta (Oldroyd & Staskawicz, 1998).

Sabe-se que o domínio LRR, não só participa no reconhecimento ao patógeno, mas também na sinalização da morte celular localizada (Hwang *et al.*, 2000). Ele está presente em interações proteína-proteína em vários organismos (Jones & Jones, 1996; Kobe & Deisenhofer, 1994) e para os genes de resistência, há indícios de que este domínio determine a especificidade do patógeno (Ellis *et al.*, 1999). A região NBS assemelha-se a um domínio ATPase presente

em proteínas que têm função regulatória chave na apoptose e morte celular programada (Aravind *et al.*, 1999 ; van der Biezen & Jones, 1998). Esse domínio parece mediar a oligomerização dessas proteínas regulatórias, que são requeridas para a ativação de proteases apoptóticas (Yang *et al.*, 1998).

A obtenção de diferentes seqüências expressas, inclusive de famílias distintas (Figura 2.3.2), demonstra que a atuação dos RGAs na defesa da planta pode ser mais complexa do que se imagina. Baseados em evidências de ligação entre locos que controlam resistência monogênica e locos quantitativos de resistência a doenças, Gebdhardt e Valkonen (2001) propõe que não apenas os fatores monogênicos, mas também fatores genéticos que controlam a resistência quantitativa são codificados pela mesma classe de genes NBS-LRR. Nesta hipótese, o receptor biologicamente ativo que interage com o fator de avirulência pode ser uma proteína dimérica ou um complexo protéico. Desta forma, a ligação específica ao fator de avirulência, a eficiência e cinética da transdução de sinal e a reação de defesa seriam resultantes da interação de duas ou mais subunidades de genes NBS-LRR. Isto pode ser confirmado pelo fato de que diferentes seqüências foram obtidas a partir de reações com os *primers* KIN/MHD2, apesar de não estar confirmada quais destas seqüências estão envolvidas neste processo e se realmente ocorre a interação entre estas proteínas para a formação de complexos protéicos.

É muito provável que as proteínas NBS-LRR desempenhem vários papéis na defesa a doenças em plantas. Dentre estes papéis estariam inclusos o de receptor citoplasmático e de sinalizador tanto em processos de transdução de sinal celular quanto sistêmica. Atribuindo-se estas funções para os RGAs algumas inferências sobre a atuação destes genes com base nos resultados obtidos serão tomadas.

2.3.8. Hipóteses quanto ao padrão de expressão observado – paralelo com ciclo de vida do nematóide.

As alterações mais marcantes na expressão dos RGAs, de 3 e de 10 dias, observadas no híbridos, coincidem com a fase de penetração do nematóide na raiz e com o estabelecimento da fase sedentária do nematóide, respectivamente. Enquanto plantas susceptíveis apresentaram alta expressão de RGAs no tempo de 3 dias, e baixa expressão no tempo de 10 dias, plantas

resistentes apresentaram o padrão oposto. Portanto, aproximadamente após o estabelecimento do sítio de alimentação, estimado aos 10 dias após a infecção, os RGAs estão altamente expressos nas plantas resistentes e praticamente ausentes nas plantas susceptíveis. Se por um lado em plantas susceptíveis a ausência da expressão do gene pode favorecer o estabelecimento do sítio, por outro lado, em plantas resistentes, a expressão do gene pode conferir resistência à planta.

Em acessos de *C. arabica* da Etiópia resistentes ao nematóide foi observado que *M. incognita* induziu a formação de células gigantes anormais e sub-desenvolvidas (Anzueto *et al.*, 2001). Desta forma, provavelmente a interação dos genes R ocorreu com substâncias secretadas pelo nematóide, específicas para o estabelecimento do sedentarismo, e não substâncias secretadas em momento anterior, específicas para formação do sítio de alimentação. Apesar da natureza e do número de proteínas localizadas nas glândulas secretoras, assim como alterações temporais de proteínas produzidas durante o ciclo parasítico do nematóide ainda ser assunto de investigações, foi observado que alterações morfológicas nas células da glândula esofágica estão correlacionadas com as fases de desenvolvimento no ciclo de vida dos nematóides (Hussey, 1989; Davis *et al.*, 2000). As células subventrais da glândula (duas) são mais ativas na fase infestante J2, enquanto que a célula dorsal é estimulada com o aumento da produção de grânulos secretórios e torna-se predominante nos estágios sedentários (Davis *et al.*, 2000).

Apesar de incerta a etapa do ciclo de vida em que se encontra o nematóide em cada tempo analisado, a maioria dos nematóides encontram-se nas fases do ciclo descritas na figura 2.3.7 a partir da inoculação de ovos. Portanto, fazendo um paralelo entre o ciclo de vida do nematóide e os padrões de expressão de RGAs observados nas plantas em estudo, observa-se que o período de maior expressão dos RGAs nos híbridos susceptíveis é durante a penetração de larvas J2 e nas plantas resistentes, incluindo AP, durante o estabelecimento do sítio de alimentação, ou seja, para a formação da célula gigante.

A hipótese proposta é de que as secreções produzidas na fase infestante para o estabelecimento do sítio de alimentação induziriam a expressão de RGAs nas plantas resistentes, e o acúmulo destes RGAs, observado aos 10 dias pós-infecção, conferiria a resistência. Assim, a interação dos RGAs seria com produtos da secreção de estágios sedentários e não de estágios infectivos para o desencadeamento dos mecanismos de defesa.

Esta interação com proteínas do nematóide pode ser direta, com produtos de genes R, sejam proteínas simples, dímeros ou complexos multiprotéicos; ou indireta, mediada por proteínas citoplasmáticas da planta. A representação esquemática deste processo está apresentada na figura 2.3.8.

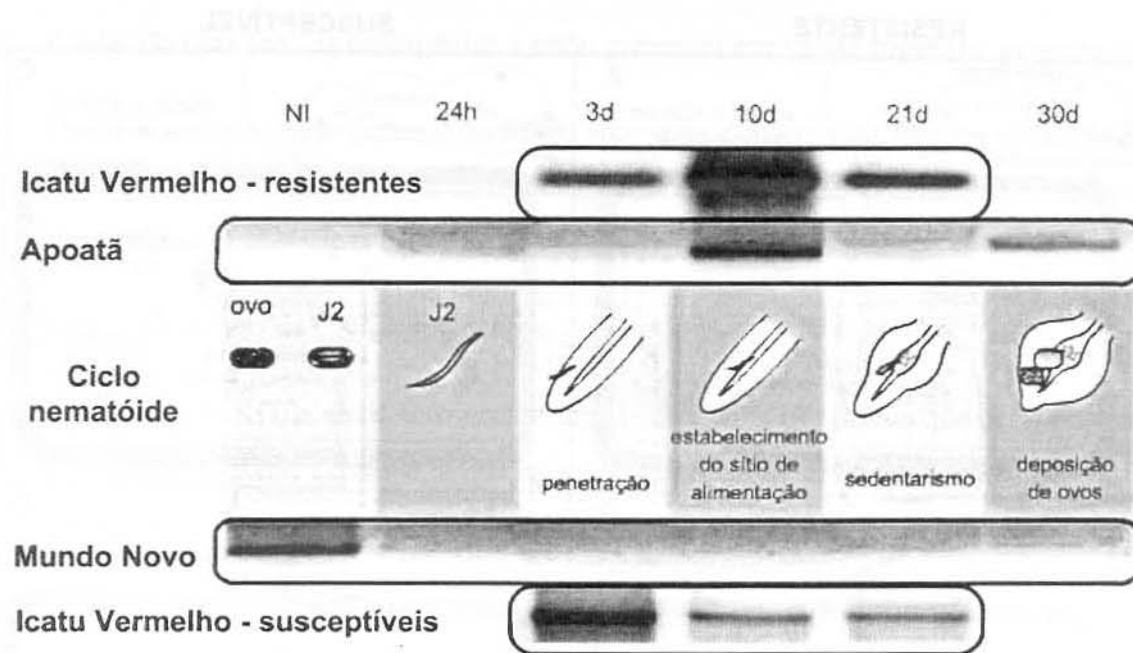


Figura 2.3.7.: Paralelo entre ciclo de vida do nematóide e padrão de expressão de RGAs em café.

Nos híbridos susceptíveis, as secreções produzidas na fase infestante não induzem a expressão de RGAs e portanto não promovem o acúmulo de RGAs aos 10 dias pós-infecção. A presença de banda de menor intensidade aos 10 e 21 dias após a infecção sugere a presença de RGAs não envolvidos nesta resistência. Por outro lado, o acúmulo de RGAs expressos acontece durante a penetração do nematóide (3 dias) e depois é suprimida. Provavelmente, a regulação da expressão desses RGAs está alterada nas plantas susceptíveis. Esta alteração no padrão de regulação pode ser decorrente da hibridação interespecífica que originou Icatu Vermelho, pois a planta susceptível *C. arabica*, que deu origem a este híbrido, não possui este padrão de expressão de RGA encontrado nos híbridos. No caso de MN (*C. arabica*), a expressão de RGAs é totalmente suprimida. Sendo esta uma variedade susceptível e observando que a variedade resistente, AP, apresenta expressão destes genes, sugere-se que a

expressão dos RGAs é necessária para o desencadeamento dos mecanismos de defesa a *M. exigua*. Outros tipos de estudos, envolvendo promotor, controle de transcrição destes genes e estudos de tradução e ativação protéica podem auxiliar na elucidação deste processo.

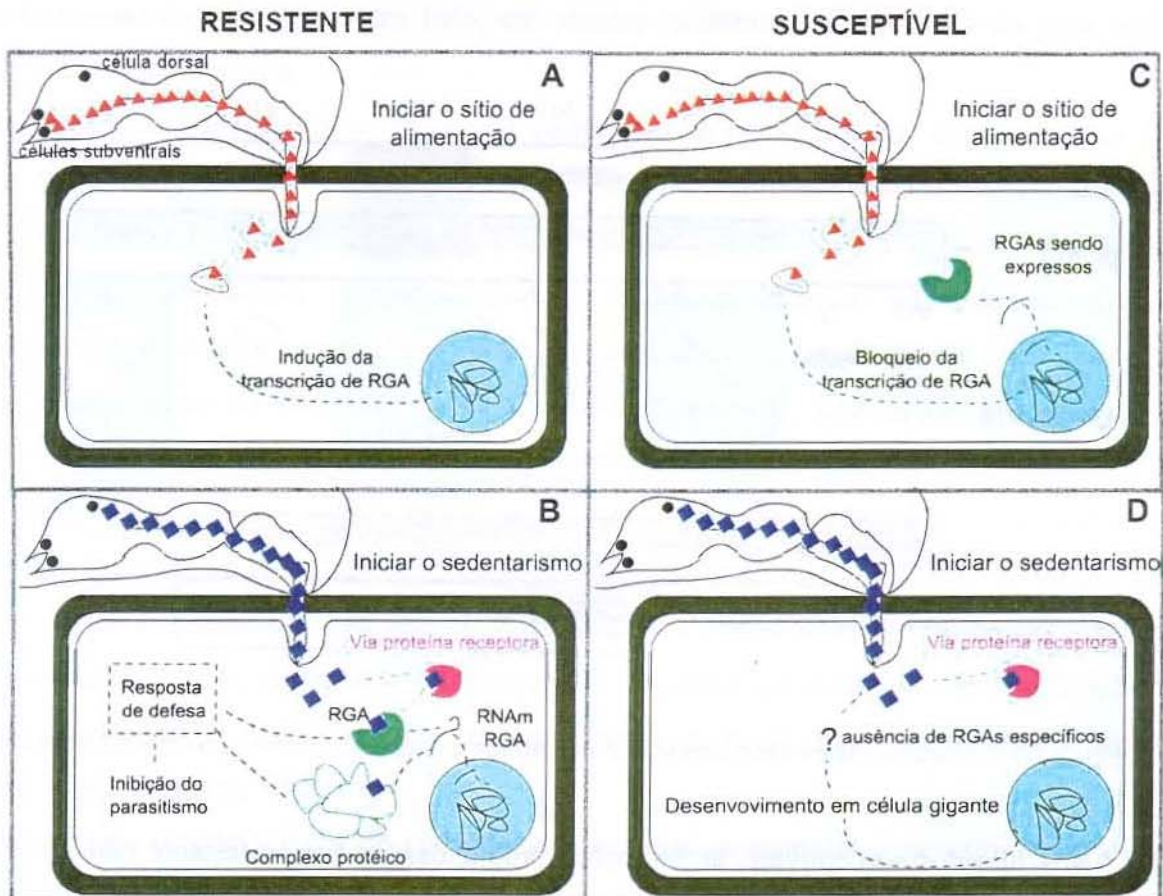


Figura 2.3.8: Representação esquemática de um possível modelo para a participação de RGAs na resistência a nematóides. Modelo baseado no padrão de expressão obtido pela amplificação de cDNAs de progênies segregantes de Icatu Vermelho. (A) Nos híbridos resistentes, as secreções produzidas na fase infestante para o estabelecimento do sítio de alimentação induziriam a expressão de RGAs, e, o acúmulo destes RGAs, observado aos 10 dias pós-infecção (B), conferiria a resistência. Assim, a interação dos RGAs seria com produtos da secreção de estágios sedentários e não de estágios infectivos para o desencadeamento dos mecanismos de defesa. Esta interação com proteínas do nematóide pode ser direta, com produtos de genes R, sejam proteínas simples, dímeros ou complexos multiprotéicos; ou indireta, mediada por proteínas citoplasmáticas da planta, desencadeando o processo de defesa da planta, como a inibição do parasitismo. (C) Nos híbridos susceptíveis, as secreções produzidas na fase infestante não induzem a expressão de RGAs e portanto, não promovem o acúmulo de RGAs aos 10 dias pós-infecção (D), permitindo o desenvolvimento da célula gigante.

CONCLUSÕES

1. Duas famílias distintas de RGAs foram amplificadas a partir de *primers* heterólogos em *Coffea*;
2. RGAs são uma família multigênica e estão presentes em várias cópias no genoma de café;
3. Os RGAs sequenciados apresentaram-se altamente conservados tanto em relação a RGAs do *GenBank*, e principalmente entre as espécies de *Coffea*, apresentando regiões altamente conservadas e específicas para o gênero *Coffea*;
4. Raízes de plantas de *Coffea* apresentam expressão basal de RGAs;
5. O acúmulo de RGAs em determinados tempos pós-infecção indica que ocorre alteração na quantidade do RGA expresso, e que esta alteração segue um mesmo padrão para as plantas susceptíveis e um outro padrão para as plantas resistentes durante a infecção por *M. exigua*;
6. Os dados sugerem a participação de RGAs no mecanismo de resistência ao nematóide *M. exigua* em café.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro passo para o entendimento dos mecanismos de resistência a nematóide foi a identificação de seqüências pertencentes a genes de resistência que participam efetivamente deste processo. Com o entendimento das interações entre hospedeiro e patógeno novas estratégias de controle poderão ser estabelecidas.

Embora a incorporação da resistência natural seja a principal estratégia no manejo de nematóides, muitas plantas cultivadas não possuem genes de resistência disponíveis. Com a clonagem de genes de resistência a nematóides será possível transferi-los a outros hospedeiros. Contudo, a obtenção de genes de avirulência pelos nematóides pode encurtar a utilidade efetiva desta metodologia. Há indicações crescentes de quebra de resistência, como a identificação de virulência, genes *avr*, contra o gene *Mi* em muitas populações de campos onde anteriormente cresciam tomates resistentes no Marrocos (Trudgill & Blok, 2001). Portanto, há necessidade real da introdução de novos genes, assim como maior entendimento dos mecanismos de resistência para que uma resistência a longo prazo seja alcançada.

O objetivo futuro é o entendimento das bases moleculares da resistência a doenças em detalhes suficientes para que seja possível fazer predições sobre a engenharia das plantas e expressão de proteínas de resistência que possam reconhecer moléculas patogênicas essenciais a patogenicidade. Estudos que envolvam análise da regulação de promotores, transformação e estudos de sinalização poderão auxiliar na elucidação de processos que envolvem a resistência da planta a patógenos específicos.

APÊNDICE

1. Sequências nucleotídicas de RGA em café.

1.1. Sequências família EGF

➤ Mundo Novo 1

GTGCTTCTTATGAACCCCTTCGCAATCCACAACCTCAACAATTTCCAAACTGGAATGTCC
ACATCTTCCGGAAAGACCCCAAGGTACAGAAAACATGGTTTCAATTGGAAAGGCAAATGG
TCATAACTCAATTTTATCAACATCTCACTTCGCTTCTGGTCATCATCGACTAAATTACTC
ACACCACGAAACACTTTCTCCCACCATTCCTTTCTCTCTCGATTATTCCTAAGAATACCA
GCAGTGACCACTATTGCTAGTGGTAGCCCTTTACACTTGTCCAAATGTTTGTTCATC
TCCTCTAGGTGCTCTGGACATCTGTTCTCATCAAAGACCTTTGTTGGAAGTAATTCCCGA
CTCTCTTCTGGAACAAGAAACGTAAGTCATAGGGTCTGATCTTTGATTTACTGTACTCG
GCCACAAATTTGTGCCGAGTGGTTATTAACACCCTGCTGCCCTTTTGTGTGTCAGGGAAA
ACAGGTTTGAGTTCCTTCCATACATCATTGGTCCAGACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 1

GTGCTTCTTATGAACCCCTTCGCAATCCACAACCTCAACAATTTCCAAACTGGAATGTCC
ACATCTTCCGGAAAGACCCCAAGGTACAGAAAACATGGTTTCAATTGGAAAGGCAAATGG
TCATAACTCAATTTTATCAACATCTCACTTCGCTTCTGGTCATCATCGACTAAATTACTC
ACACCACGAAACACTTTCTCCCACCATTCCTTTCTCTCTCGATTATTCCTAAGAATACCA
GCAGTGACCACTATTGCTAGTGGTAGCCCTTTACACTTGTCCAAATGTTTGTTCATC
TCCTCTAGGTGCTCTGGACATCTGTTCTCATCAAAGACCTTTGTTGGAAGTAATTCCCGA
CTCTCTTCTGGAACAAGAAACGTAAGTCATAGGGTCTGATCTTTGATTTACTGTACTCG
GCCACAAATTTGTGCCGAGTGGTTATTAACACCCTGCTGCCCTTTTGTGTGTCGGGGAAA
ACAGGTTTGAGTTCCTTCCATACATCATTGGTCCAGACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 2

GTGCTTCTTATGAACCCCTTCAGCAAGCCAAAACCGTATCAACTTGCTAACAGGAATATCC
TTGTCTTCAAGGAAAACCTCCCAAGTAAAGAAAGCACGGTTTTAGATATCCCGGCAAGTGT
TTGTAACCTCAATTCTAAGATTTCCATGCACCGAGCATTTGGATCTTCCATAACTTCAGCA
ATCAAGCTTTTTGCAATTTTACCCACGATTCTGAGCTCTCTTCTATCCTCTGGAGGAGA
CCAGATATTGCATCAACACCAAGAGGCAATCCTTTACACTTTTTGGCAATTTCTTTCCA
ACAAGCAACAATTTCTCGGGACAACCTTCACCATGGAATACTTTCTCTACTAATAAGGTC
CAGCTTTTCATCATCAGACAATAAGCGTAGAGAATGAGGATCACTATCTGGTTCAATTGTC
ATGGCCACATCAGGAAGGCGGGTCGTAATCAAAATCTGCTTCCATTGGCATCATCTGGT
ATTGAATTTCTTAGCTCATTCCAACTCCAGCATCCAGACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 3

TATGAACCCCTTCAGCAATCCATAATCGCAACAACCTTCCAAACTGGAATATCAGAGTCTTC
TCGAAAGACCCCATGTAGAGAAAGCAGGGTCTCAAGTAGTGAGGCAGGTGACTGAAACT
CAATTTGATCAGATTATCTAGAGGCGACGTGTCCCTTGCAAGGAATCTGTCAACCCTTC
AGAAACTTCCCTCCACCAATTAATGTTCTCTCTATCAATCACCAGGATACCTGCTATTAC
TACTATTGCTAGCGGCAATCCATTACATCTTTGCAGAATCCGTAATTCATAATCCTCAAT
CTCTGGTGGGTAGGTGTTCTTACCAAAAACCTTCTCCGTAGTAACTCCTGACTCTCTTC
AAGATTTCAGGAATCGCAGATAATAGGGTCCAATCTGTGGATTAGCATACAGAGCTACAGA
TTTAATTCGGCTTGTTATAACCACTCTACTGCAGTTATTATGGTCAGGAAGAGCTGACCT
GAGATCATCCCATGCTTCTTTGGTCCAGACATCATCCAGTATCAATC

1.2. Sequências família MHD

➤ Icatu Vermelho 2-1

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG

CTCTTGCGAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTATCCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
 CGGCTGAACCAAGTGAATGAGCCATCCACAATTTGACTAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
 GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGTGCTTTAGTTTCAAGTGGGAGGTGAAA
 ATAACCTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTATGCTTCTCATCTCTATATTCCTCTTCTAC
 CTTGGCCAGATCATTATTCAAGATATCCGACCATGTATCAAGAGCTTTATTTCTTAAAAG
 ACATCCTATAACCTCTACAGCCAGAGGTAAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
 AATAGCCTTTACACCTTTATCTAGGTCTGATTTCATCCCGTTAATTGCATTTCTGGC
 AAATAATTTAGACAAATCCTCATGGGGCAATTTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGGCAC
 ATTCTGCGGACTCAAACCAAAATACATTTTCTGTTGACCGGTTACAATCACCTAGTTCC
 GTTATGTGCTTTCAATAAGCCTTTCTTCAGCTTTTCCAATCCTCGAGATTTTCAGTCCA
 GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Mundo Novo 2-1

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
 CTCTTGCGAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTTCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
 TGGCTGAACCAAGTGAATGAGCCATCCACAATTTGACCAAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
 GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGCGCTTTAGTTTCAAGTGGGAGGTGAAA
 ATAACCTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTATGCTTCTCATCTCTATATTCCTCTTCTAC
 CTTGGCCAGATCATTATTCAAGATATCCGACCATTTATGACGAGCTTGAGGTCTTAAAAG
 ACATCCTATAACCTCTACAGCCAGAGGTAAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
 AATAGCCTTTACATCTTTTATCTAGGTCTGACTCATCCCGTTAATTGCATTTCTGGC
 AAATAATTTAGACAAATCCTCATGGGGCAATTTTCCCAAGGAAATATGGGGGATAGGCAC
 ATTCTGCGGACTCAAACCAAAACATTTTCTGATCGACCAAGTTACAATCACCTAGTTCC
 GTTATGTGCTGTCAATAAGCCTTTCTTCAGCTTTTCCAATCCTCGAGATTTTCAGTCCA
 GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Mundo Novo 2-2

CGACAGTCAGTCGTGCATCCCGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
 CTCTTGCGAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTATCCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
 CGGCTGAACCAAGTGAATGAGCCATCCACAATTTGACTAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
 GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGTGCTTTAGTTTCAAGTGGGAGGTGAAA
 ATAACCTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTATGCTTCTCATCTCTATATTCCTCTTCTAC
 CTTGGCCAGATCATTATTCAAGATATCCGACCATGTATCAAGAGCTTTATTTCTTAAAAG
 ACATCCTATAACCTCTACAGCCAGAGGTAAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
 AATAGCCTTTACACCTTTATCTAGGTCTGATTTCATCCCGTTAATTGCATTTCTGGC
 AAATAATTTAGACAAATCCTCATGGGGCAATTTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGGCAC
 ATTCTGCGGACTCAAACCAAAACATTTTCTGTTGACCGGTTACAATCACCTAGTTCC
 GTTATGTGCTTTCAATAAGCCTTTCTTCAGCTTTTCCAATCCTCGAGATTTTCAGTCCA
 GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 2-1

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
 CTCTTGCGAGCCTGTCAAAGTATCTGCGTCCTTTATCCTGCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
 TGGCTGAACCAAGTGAATGAGCCATCCACAATTTGACTAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
 GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGTGCTTTAGTTTCAAGTGGGAGGTGAAA
 ATAACCTTAGACTAAGGACAAATAGCGTTCTGTGCTTCTCATCTCTAAATTCCTCTTCTAC
 CGTGGCCAGATCATTATTCAAGATATCCGACCATTTATAAAGATCTTTATTTCTTAAAAG
 ACATCCTATAGCCTCTACAGCCAGAGGTAAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
 AATAGCCTTTACACCTTTATCTAGGTCTGACTCATCCCGTTCGATTGCATTTCTGGC
 AAATAATTTAGACAAATCCTCATGGGGCAATTTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGGCAC
 ATTCTGCGGACTCAAACCAAAACATTTTCTGTTGACCGGTTACAATCACCTAGTTCC
 GTTATGTGCTTTCAATAAGCCTTTCTCTAGCTTTTCCAATCCTCGAGATTTTCAGTCCA
 GACATCATCCAGTATCAATC

➤ *C. racemosa* 2-1

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGAACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
 CACTTGCGAGCCTGTCAAAGTATCTGCGTCCTTTATCCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
 TGGCTGAACCAAGTGAATGAGCCATCCACAATTTGACTAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
 ACCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGTGCTTTAGTTTCAAGTGGGAGGTGAAA
 ATAACCTTAGTCTAAGGACAGGTAGTGTTCCACGCTCCTCATCTCCAAATTCGCTTCTAC
 CTTGGCCAGATCATTATTCAAGATATCCGACCATGTATCAAGAGGTTTACTTCTTAAAAG

ACATCCTATAACATCTACAGCCAGAGGTAACCATCACATTTGCTCACAACCTCGATCAGC
AATAGCCTTTACATCTTTATTCACTAGGTCTGACTCATCCCTTGCAATTTCTGGCAAATAA
TTTCGGACATTCCTCATGGGGCAATTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGACACATTCTG
CGGACTCAAACCAAACACATTTTCTGTTGACCGAGTTACAATCACCCCATTTCCGTTATG
TGCTTTCAATAAGCATTTCTTCAGCCTTTTCCATTCTTTGAGATTTTCGGTCCAGACATC
ATCCAGTATCAATC

➤ Icatu Vermelho 2-2

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
CTCTTGACAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTTTCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
TGGCTGAACCACTGAATGAGCCATCCACAATTTGACCAAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGCGCTTTAGTTACAGGTGGGAGGTGAAA
ATAACTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTATGCTTCTCATCTCTATATTCTCTTCTAC
CTTGGCCAGATCATTATTCAAGATACCCGACCATTATGACGAGCTTGAGGTCTTAAAAG
ACAGCCTATAACCTCTACAGCCAGAGGTAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
AATAGCCTTTACATCTTTATTCACTAGGTCTGACTCATCCCTTTAATTGCATTCTGGC
AAATAATTTAGACATTCCTCATGGGGCAATTTCCCAAGGAAATATGGGGGATAGGCAC
ATTCTGCGGACTCAAACCAAACACATTTTCTGATCGACCAAGTTACAATCACCCATAGTGCC
GTTATGTGCTGTCAATAAGCCTTTCTTCAGCTCTTTCCAATCCTCGAGATTTTCAGTCCA
GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 2-2

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
CTCTTGACAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTTTCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
TGGCTGAACCACTGAATGAGCCATCCACAATTTGACCAAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGCGCTTTAGTTACAGGTGGGAGGTGAAA
ATAACTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTGTGCTTCTCATCTCTAAGTTCTCTTCTAC
CTTGGCCAGATCATTATCCAAGATATCCGACCAAGTCTCAGGAGCTTTTTTTCTACAAAC
ACATCCTATAACCTCTACAGCCTGAGGTAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
AATAGCCTTTACACCTTTATTCACTAGGTCTGACTCATCCCGTCAATTGCATTCTGGC
AAATAATTTAGACATTCCTCATGGGGCAATTTCCCAAGGAAATGTGGGGGATCGACAC
ATTCTGCGGACTCAAACCAAACACGTTTTCTGTTCGACCAAGTTACAATCACCCATAGTTCC
GTTATGTGCTTTCAATAAGCATTCTCCAGCTTTTTCCAATCCTCGAGATTGTCAGTCCA
GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Icatu Vermelho 2-3

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
CTCTTGACAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTTTCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
TGGCTGAACCACTGAATGAGCCATCCACAATTTGACCAAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGCGCTTTAGTTACAGGTGGGAGGTGAAA
ATAACTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTGTGCTTCTCATCTCTAAGTTCTCTTCTAC
CTTGGCCAGATCATTATCCAAGATATCCGACCAAGTCTCAGGAGCTTTTTTTCTACAAAC
ACATCCTATAACCTCTACAGCCTGAGGTAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
AATAGCCTTTACACCTTTATTCACTAGGTCTGACTCATCCCGTCAATTGCATTCTGGC
AAATAATTTAGACATTCCTCATGGGGCAATTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGACAC
ATTCTGCGGACTCAAACCAAACACGTTTTCTGTTCGACCAAGTTACAATCACCCATAGTTCC
GTTATGTGCTTTCAATAAGCATTCTCCAGCTTTTTCCAATCCTCGAGATTGTCAGTCCA
GACATCATCCAGTATCAATC

➤ Apoatã 2-3

CGACAGTCAGTCGTGCATCCTGTACTTCTCTGACTCTGGCTGTTGCTGAAAGAAGGAAAG
CTCTTGACAGCCTGTCAAAGCATCTGCGTCCTTTTTCTCCAGTGTTTCTGCCAACTTACT
TGGCTGAACCACTGAATGAGCCATCCACAATTTGACCAAGTTCATCTTTGTCAAACCTCATG
GCCTTTAGGGAATATGGAGCAAAATGAAAAGCAGCGCTTTAGTTACAGGTGGGAGGTGAAA
ATAACTTAGTCTAAGGACAAATAGTGTTCTGTGCTTCTCATCTCTAAGTTCTCTTCTAC
CTTGGCCAGATCATTATCCAAGATATCCGACCAAGTCTCAGGAGCTTTTTTTCTACAAAC
ACATCCTATAACCTCTACAGCCTGAGGTAACCATCACATTTGCTCACAATTCCATCAGC
AATAGCCTTTACACCTTTATTCACTAGGTCTGACTCATCCCGTCAATTGCATTCTGGC
AAATAATTTAGACATTCCTCATGGGGCAATTTCCCAAGGAAATATGGGGGATCGACAC
ATTCTGCGGACTCAAACCAAACACGTTTTCTGTTCGACCAAGTTACAATCACCCATAGTTCC
GTTATGTGCTTTCAATAAGCATTCTCCAGCTTTTTCCAATCCTCGAGATTGTCAGTCCA
GACATCATCCAGTATCAATC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anthony, F.; Combes, M.C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G. & Lashermes, P. (2002) The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theor Appl Genet** 104: 894-900.
- Anthony, F.; Bertrand, B.; Quiros, O.; Wilches, A.; Lashermes, P.; Berthaud, J. & Charrier, A. (2001) Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica** 118: 53-65.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. **Jour Mol Biol** 215: 403-410.
- Anzueto, F.; Bertrand, B.; Sarah, J.L.; Eskes, A.B. & Decazy, B. (2001) Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica** 118: 1-8.
- Aravind, L.; Dixit, V. & Koonin, E. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. **Trends Biol Sci** 24: 47-53.
- Baker, B.; Zambrisky, P.; Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. **Science** 276: 726-733.
- Bent, A.F.; Kunkel, B.N.; Dahlbeck, D.; Brown, K.L.; Schmidt, R.; Giraudat, J.; Leung, J. & Staskawicz, B.J. (1994) RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science** 265: 1856-1860.
- Berthaud, J. (1980) L'incompatible chez *Coffea canephora* methode de test et determinisme genetique. **Café. Cacao. Thé** 24: 267-274.
- Bertrand, B.; Duran, M.X.P.; Anzueto, F.; Cilas, C.; Etienne, H.; Anthony, F. & Eskes, A.B. (2000) Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne* sp nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. **Euphytica** 113: 79-86.
- Bird, D.M. & Koltai, H. (2000) Plant Parasitic Nematodes: Habitats, Hormones, and Horizontally-Acquired Genes. **J Plant Growth Regul** 19: 183-194.
- Bird, D.M. (1996) Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **J Parasitol** 82: 881-888.

- Boyce, D.C.; Nam, J. & Dangl, J.L. (1998) The *Arabidopsis thaliana* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. **Proc Natl Acad Sci** 95: 15849-15854.
- Bryan, G.T.; Wu, K-S.; Farrall, L.; Jia, Y.; Hershey, H.P.; McAdams, S.A.; Faulk, K.N.; Donaldson, G.K.; Tarchini, R. & Valent, B. (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2033-2045.
- Brommonschenkel, S.H.; Frary, A.; Frary, A. & Tanksley, S.T. (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene SW-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. **Mol Plant-Microbe Int** 13: 1130-1138.
- Brown, D.J.F.; Robertson, W.M. & Trudgill, D.L. (1995) Transmission of viruses by plant nematodes. **Annu Rev Phytopathol** 33: 223-249.
- Cai, D.; Kleine, M.; Kifle, S.; Harloff, H.; Sandal, N.N.; Marcker, K.A.; Klein-Lankhorst, R.M.; Salentijn, E.M.J.; Lange, W.; Stiekema, W.J.; Wyss, U.; Grundler, F.M.W. & Jung, C. (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science** 275: 832-834.
- Campos, V.P. (1992a) Danos e prejuízos causados por fitonematóides. **Inf Agropec**, Belo Horizonte, 16: 14-15.
- Campos, V.P. (1992b) Implicações da sobrevivência dos nematóides em solo e raízes de plantas no controle destes fitopatógenos. **Inf Agropec**, Belo Horizonte, 16: 15-16.
- Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, M.R.A. & Carneiro, R.G. (1996) Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. **Fund and Appl Nemat** 19: 555-560.
- Carvalho, A. & Fazuoli, L.C. (1993) Café. In: Furlani, A.M.C. & Viégas, G.A. eds. **O melhoramento de plantas no Instituto Agonômico**, Campinas, Instituto Agronômico, 2: 29-76.
- Carvalho, A.; Medina Filho, H. P.; Fazuoli, L. C.; Guerreiro Filho, O. & Lima, M. M. A. (1991) Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). **Revista Brasil Genet** 14: 135-183.
- Chevallier, A. (1947) Lés caféiers du globe. III. Systématique des caféiers. Maladies et insectes nuisibles. **Encyclopedie biologique** 28: 1-256 Fascicule III. Paul Lechevalier, Paris.
- Collins, N.C.; Webb, C.A.; Seah, S.; Ellis, J.G.; Hulbert, S.H. & Pryor, A. (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. **Mol Plant-Microbe Int** 10: 968-978.
- Cordeiro, M.C.R. & Sá, M.F.G. (2000) Biotecnologia e resistência a patógenos.

http://www.biotechnologia.com.br/bio/10_b.htm.

- Dangl, J.L. (1992) The mayor histocompatibility complex à la carte: are there analogies to plant disease resistance genes on the menu? **Plant J** 2: 3-11.
- Davis, E.L.; Hussey, R.S.; Baum, T.J.; Baker, J.; Schots, A.; Rosso, M. & Abad, P. (2000) Nematode Parasitism genes. **Annu Rev Phytopathol** 38: 365-96.
- Diaz-Silveira, M.F. & Herrera, J.O. (1998) Na overview of nematological problems in Cuba. **Nematropica** 28: 151-163.
- Ellis, J.; Lawrence, G. & Dodds, P. (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. **Plant Cell** 11: 495-506.
- Fazuoli, L.C.; Monaco A. & Carvalho, A. (1977) Resistência do cafeeiro a nematóides. **Bragantia** 36: 297-307.
- Fazuoli, L.C. (1981) Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M.incognita*. **Colloque Intern. sur la Protec. des Cultur. Trop.**, Lyon, p.57. Resumos.
- Fazuoli, L.C. (1991) Metodologias, critérios e resultados da seleção em progênies do café Icatu com resistência a *Hemileia vastatrix*. **Tese de Doutorado**, UNICAMP, Campinas, 322p.
- Fazuoli, L.C.; Maluf, M.P.; Guerreiro Filho, O.; Medina Filho, H.P. & Silvarolla, M.B. (1999) Melhoramento clássico do cafeeiro relacionado com a biotecnologia moderna. **III Seminário Internacional sobre biotecnologia na agroindústria cafeeira**. 24-28 maio. Anais. Londrina. pp. 217-229.
- Fernandez, D.; Noir, S.; Agostini, C.; Bon, M.-C.; Combes, M.-C., Silva, M.C.; Guerra-Guimarães, L.; Anthony, F.; Bertrand, B. & Lashermes, P. (2001) Molecular Physiology and genetics of Coffee Resistance to Parasites. **19th International Scientific Colloquium on Coffee – ASIC**. Triest, 14-18 May 2001.
- Gebhardt, C. & Valkonen, J.P.T. (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. **Annu Rev Phytopathol** 39: 79-102.
- Gilbert, J.C. & McGuire, D.C. (1956) Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. **Proc Am Hot Society** 68: 437-442.
- Glazer, I.; Epstein, E.; Orion, D. & Apelbaum, A. (1986) Interactions between auxin and ethylene in root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infected tomato roots. **Physiol Mol Plant Pathol** 28: 171-179.

- Goddijn O.J.M.; Lindsey K.; van der Lee F.M.; Klap J.C. & Sijmons P.C. (1993) Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic harbouring promoter-gusA fusion constructs. **Plant J** 4: 863-873.
- Gonçalves, W.; Silvarolla, M.B. & Lima, M.M.A. de (1998) Estratégias visando a implementação do manejo integrado dos nematóides parasitos do cafeeiro. **Inf Agrop**, Belo Horizonte, 19: 36-47
- Gonçalves, W. (1999) Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematóides. **III Simpósio de atualização em genética e melhoramento de plantas**, Genética e melhoramento do cafeeiro. Universidade Federal de Lavras.
- Gonçalves, W. & Silvarolla, M.B. (2001) Nematóides Parasitos do Cafeeiro. In: **Tecnologias de produção de café com qualidade**. Editor: Zambolim, L. Viçosa:UFV pp. 199-267.
- Graham, M.A.; Marek, L.F.; Lohnes, D.; Cregan, P. & Shoemaker, R.C. (2000) Expression and genome organization of resistance genes analogs in soybean. **Genome** 43: 86-93.
- Grant, M.R.; Godiard, L.; Straube, E.; Ashfield, T.; Lewald, J. et al.. (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Science** 269: 843-46.
- Guerreiro Filho, O.; Silvarolla, M.B. & Eskes, A.B. (1999) Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Euphytica** 105: 7-15.
- Hammond-Kosack, K.E.; Atkinson, H.J. & Bowles, D.J. (1989) Systemic accumulation of novel proteins in the apoplast of the leaves of potato plants following root invasion by the cyst-nematode *Globodera rostochiensis*. **Physiol Mol Plant Pathol** 35: 495-506.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. (1997) Plant disease resistance genes. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 48: 575-607.
- Herrera, I.C. & Marban-Mendoza, N. (1999) Effects of leguminous cover crops on plant parasitic nematodes associated with coffee in Nicaragua. **Nematropica** 29: 223-232.
- Hulbert, S.H.; Webb, C.A.; Smith, S.M. & Sun, Q. (2001) Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annu Rev Phytopathol** 39: 285-312.
- Hussey, R.S. (1989) Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. **Annu Rev Phytopathol** 27: 123-141.
- Hwang, C.-F.; Bhakta, A. V.; Truesdell, G.M.; Pudlo, W.M. & Williamson, V.M. (2000) Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. **Plant Cell** 12: 1319-1329.

- Jia, Y.; McAdams, S.A.; Bryan, G.T.; Herchey, H.P. & Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J** 19: 4004-4014.
- Jones, D.A. & Jones, J.D.G. (1996) The roles of leucine rich repeats in plant defenses. **Adv Bot Res Adv Plant Pathol** 24: 90-167.
- Jung, C. & Wyss, U. (1999) New Approches to Control Plant Parasitic Nematodes. **Appl Microbiol Biotechnol** 51: 439-446.
- Kanazin, V.; Marek, L.F. & Shoemaker, R.C. (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93: 11746–11750.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends Biochem Sci** 19: 415-421.
- Kretschmer, J.M.; Chalmers, K.J.; Manning, S.; Karakousis, A.; Barr, A.R.; Islam, A.K.M.R.; Logue, S.J.; Choe, Y.; Barker, S.; Lance, R.M. & Langridge, P. (1997) RFLP mapping of the *Ha2* cereal cyst nematode resistance gene in barley. **Theor Appl Genet.**, 94: 1060–1064.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. & Nei, M. (2001) **MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software**, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lagudah, E.S.; Moullet, O. & Appels, R. (1997) Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. **Genome** 40: 659-665.
- Lashermes, P.; Combes, M.C.; Robert, J.; Trouslot, P.; D'Hont, A.; Anthony, F. & Charrier, A. (1999) Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol Gen Genet.** 261: 259-266.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F. & Gebhardt, C. (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance gene from potato with potential for wide application in plants. **Nat. Genet.**, 14: 421-429.
- Leister, D.; Kurth, J.; Laurie, D.A.; Yano, M.; Sasaki, T.; Devos, K.; Graner, A. & Schulze-Lefert (1998) Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 370-375.

- Leroy, T.; Henry, A.-M.; Royer, M.; Altosaar, I.; Frutos, R.; Duris, D.; Philippe, R. (2000) Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports** 19: 382-38.
- Lima, R.D. & Ferraz, S. (1985a) Biologia de *Meloidogyne exigua* I. Desenvolvimento embriogênico e efeito da temperatura na embriogênese. **Revista Ceres**. Viçosa 32: 339-348.
- Lima, R.D. & Ferraz, S. (1985a) Biologia de *Meloidogyne exigua* II. Desenvolvimento embriogênico em cafeeiro Mundo Novo. **Revista Ceres**. Viçosa 32: 349-361.
- Lordello, L.G.E. (1984) **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel. 314p.
- Maluf, M.P.; Saab, I.N.; Wurtzel, E.T. & Sachs, M.M. (1997) The *viviparous 12* maize mutant is deficient in abscisic acid, carotenoids, and chlorophyll synthesis. **J Exp Bot** 48: 1259-1268.
- McDowell, J.M.; Dhandaydham, M. Long, T.A., Aarts, M.G.M.; Goff, S.; Holub, E.B. & Dangl, J.L. (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of Arabidopsis. **Plant Cell** 10: 1861-1874.
- Medina-Filho, H.P. & Tanksley, S.D. (1983) Breeding for nematode resistance. In **Handbook of Plant Cell Culture** Vol. 1, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, & Y. Yamada, eds (New York:MacMillan), pp. 904-923.
- Mendes, B.V.; Ferraz, S. & Shimoya, C. (1977) Observações histopatológicas de cafeeiro parasitado por *Meloidogyne exigua*, Goeldi, 1887. **Nematologia Brasileira** 2: 207-229.
- Meyers, B.C.; Dickerman, A.W.; Michelmore, R.W.; Sivaramakrishnan, S.; Sobral, B.W. & Young, N.D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of a ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant J** 20: 317-332.
- Michelmore, R.W. & Meyers, B.C. (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by a divergent selection and a birth-and-death process. **Genome Res** 8: 1113-1130.
- Milligan, S.B.; Bodeau, J.; Yaghoobi, J.; Kaloshian, I.; Zabel, P. & Williamson, V.M. (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **Plant Cell** 10: 1307-1319.
- Moura, R.M. (1997) O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte II. In: Luz, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Gráfica e Editora Pe. Berthier, v.5, p. 281-315.
- Nei, M. (1987) **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York.

- Nei, M. (1991) Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. In MM Miyamoto and J Cracraft (eds). **Phylogenetics analysis of DNA sequences**. Oxford University Press. New York.
- Noir, S; Combes, M.-C.; Anthony, F.& Lashermes, P. (2001) Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Mol Genet and Genomics** 265: 654-662.
- Oldroyd, G.E.D. & Staskawicz, B.J. (1998) Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 10300-10305.
- Orozco-Castillo, C.; Chalmers, K.J.; Powell, W. & Waugh, R. (1996) RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationship within the genus *Coffea*. **Plant Cell Rep** 15: 337-341.
- Paillard, M.; Lashermes, P.& Pétiard, V. (1996) Construction of a molecular linkage map in *Coffea*. **Theor Appl Genet** 87: 43-47.
- Paulson, R.E. & Webster, J.M. (1972) Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiol Plant Pathol** 2: 227-34.
- Roberts, P.A. (1992) Current Status of the Availability, Development, and use of host plant resistance to nematodes. **Journal of Nematology** 24: 213-227.
- Roupe van der Voort, J.R.; Kanyuka, K.; van der Vossen, E.; Bendahmane, A.; Mooijman, P.; Klein-Lankhorst, R.; Stiekema, W.; Baulcombe, D. & Bakker, J. (1999) Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. andigena CPC1673 into cultivated potato. **Mol Plant-Microbe Int** 12: 197-206.
- Rossi, M.; Goggin, F.L.; Milligan, S.B.; Kaloshian, I.; Ullman, D.E. & Williamson, V.M. (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proc Natl Acad Sci USA** 95: 9759-9754.
- Russo, C.A.M.; Miyaki, C.Y. & Pereira, S.L. (2001) Reconstrução filogenética: Métodos Geométricos. In: **Biologia Molecular e Evolução**, Mاتيoli SR (editor). Holos Editora.
- Russo, C.A.M. (1997) Efficiencies of different statistical tests in supporting a known vertebrate phylogeny. **Mol Biol Evol** 14: 1078-1080.

- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol** 4: 406-425.
- Salmeron, J.M.; Oldroyd, G.E.D.; Rommens, C.M.T.; Scofield, S.R.; Kim, H.S.; Lavelle, D.T.; Dahlbeck, D. & Staskawickz, B.J. (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell** 86: 123-33.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) **Molecular Cloning Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor New York. 3th edition.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci** 74: 5463-5467.
- Santos, J.M. dos. (1997) Estudo das principais espécies de *Meloidogyne goeldi* que infectam o cafeeiro no Brasil com descrição de *Meloidogyne goeldi* sp.n. Jaboticabal, UNESP, **Tese de Doutorado**. 153p.
- Schieber, E. & Grullon, L. (1969) Problem of nematodes which attack coffee (*Coffea arabica*) in Dominican Republic. **Turrialba** 19: 513.
- Seah, S.; Sivasithamparan, K.; Karakousis & Lagudah, E.S. (1998) Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley. **Theor Appl Genet** 97: 937-945.
- Shirano, Y.; Kachroo, P.; Shah & Klessig, D.F. (2002) A gain-of-function mutation in an Arabidopsis toll interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich-repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. **Plant Cell** 14: 3149-3162.
- Sijmons, P.C. (1993) Plant-nematode interactions. **Plant Molecular Biology** 23: 917-931.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J. & Wyss, U. (1994). Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. **Annu Rev Phytopathol** 32: 235-259.
- Silvarolla, M.B.; Gonçalves, W. & Lima, M.M.A (1998) Resistência do cafeeiro a nematóides V - Reprodução de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros derivados da hibridação de *Coffea arabica* com *C. canephora*. **Nematologia Brasileira** 22: 51-59.
- Sondahl, M.R. & Lauritis, J.A. (1992) Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops. **Biotechnology in agriculture** 8: 401 -420.

- Spielmeyer, W., Robertson, M., Collins, N., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Seah, S., Moullet, O. & Lagudah, E.S. (1998) A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*). **Genome** 41: 782-788.
- Staskawicz, B.J. (2001) Genetics of Plant-Pathogen Interaction Specifying Plant Disease Resistance. **Plant Physiology** 125: 73-76.
- Taylor, A.L; & Sasser, J.N (1978) **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh, North caroline State University, 111p.
- Trudgill, D.L. & Blok, V.C. (2001) Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally succesful and damaging biotrophic root pathogens. **Annu Rev Phytopathol** 39: 53-77.
- van der Biezen, E. & Jones, J. (1998) The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Curr Biol** 8: R226-R227.
- Villain, L.; Molina, A.; Sierra, S.; Decazy, B. & Sarah, J.L. (2000) Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. **Nematropica** 30: 87-100.
- Wallace, H.R. (1973) **Nematode ecology and plant disease**. London, Edward Arnold Limited. 228p.
- Williamson, V.M. (1999) Nematode resistance genes. **Curr Opin Plant Biol** 2: 327-331.
- Williamson, V.M. (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annu Rev Phytopathol** 36: 277-293.
- Williamson, V.M. & Hussey, R.S. (1996) Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. **Plant Cell** 8: 1735-1745.
- Yang, X.; Chang, H.Y. & Baltimore, D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. **Science** 281: 1355-1357.
- Zhang, F.R. & Schmitt, D.P. (1995) Spatial-temporal patterns of *Meloidogyne konaensis* on coffee in Hawaii. **Journal of Nematology** 27: 109-113.

**NBS-LRR RELATED SEQUENCES OF *COFFEA* SPECIES – GENETIC DIVERSITY
AND EXPRESSION IN RESPONSE TO ROOT-KNOT NEMATODE INFECTION¹**

Cintia Hotta Orsi ^{2,3}, Mirian Perez Maluf ^{2,4*} and Wallace Gonçalves²

¹ Funded by Brazilian Consortium for Coffee Research and Development

² Coffee Research Center “Alcides Carvalho”, Agronomic Institute of Campinas (IAC),
Campinas/Brazil

³ Dept. of Genetics and Evolution / State University of Campinas (Unicamp), Campinas /
Brazil

⁴ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Coffee Unit/ Brasília/ Brazil

* Author for correspondence

Address for correspondence: Coffee Research Center / IAC

Av. Barão de Itapura, 1481

P.O. Box 28 Campinas – SP

13001-970

Brazil

Phone: 55.19.3241-5188

Fax: 55.19.3212-0458

Email: maluf@iac.br

ABSTRACT

The identification of resistance gene analogs (RGA) in several plant species has been achieved based on the high homology of their two main protein domains, the nucleotide binding site and the leucine rich region. In this work, RGA related sequences were identified in species of the genera *Coffea* using heterologous primers. Only two distinct families were identified in all evaluated species, which included general resistant and susceptible lines, corroborating the low genetic diversity reported for this genus. In other study, resistant and susceptible coffee plants inoculated with *Meloidogyne exigua* were evaluated for RGA expression, through reverse transcriptase analysis. The results presented here demonstrate that although a basal RGA expression is observed in both susceptible and resistant cultivars, there is a differential expression of a specific RGA sequence in resistant roots. These observations suggest that RGA locus may be involved with nematode resistance mechanisms in coffee plants. However, this locus low genetic diversity available in *Coffea* species could represent a bottleneck for the development of new resistant cultivars by breeding programs.

Key words: coffee, differential expression, NBS-LRR, plant resistance, root-knot nematode.

INTRODUCTION

Plant defense to pathogen attack involves the activation of at least two types of response. First, a set of intracellular reactions leading to localized cell death is triggered upon pathogen recognition. This hypersensitive response (HR) is accomplished by the action of several proteins that are specifically induced after a gene-for-gene interaction. The second type of response is initiated just after the HR-response, involves the activation of a complex net of signaling molecules and proteins, and results in an overall defense response by the plant. This is known as the systemic acquired response, SAR.

Several plant genes are being identified as responsive to pathogen invasion, and related to the initiation of defense mechanism in plants. Among these, the resistance genes (R) have been identified in several species, and are apparently related to specific recognition of elicitors produced by avirulent pathogens genes (*avr*). This recognition may trigger the cascade of activation of several proteins, which will result in the HR.

Molecular analysis of R genes of diverse origin and pathogen specificity revealed that they share highly conserved amino acid domains (Bent et al. 1994; Lawrence et al. 1995). These domains include a nucleotide-binding site (NBS), and a leucine-rich repeat (LRR), which may respond for actions such as protein interaction during signal transduction, and pathogen specific recognition. A strategy that has been successfully employed to identify analogs to R genes, Resistance Gene Analogs (RGA) in several plant species is the use of heterologous primers, corresponding to the conserved domains, to amplify related sequences (Leister et al. 1996). In this way, several RGA were identified in soybean (Kanazin et al. 1996), wheat (Spielmeyer et al. 1998), rice (Mago et al. 1999), maize (Collins et al. 1998) and others (Leister et al. 1996; Pflieger et al. 1999; Fourmann et al. 2001).

Although a large number of sequences were identified by this methodology, very few of these were actually associated to a specific pathogen resistance mechanism. Several analysis using genetics and molecular maps allowed a physical localization and co-relation between previously evaluated resistant loci to the identified RGA sequences (Graham et al. 2000; Kretschmer et al. 1997; Pflieger et al. 1999).

Among defense RGA genes identified so far is the *Mi* locus in tomato, characterized as responsible for resistance to root knot nematode *Meloydogine sp* (Gilbert and McGuire 1956).

A functional *Mi* allele was cloned from a BAC library containing the entire region to which *Mi* was localized (Milligan et al. 1998). In transient expression analysis, the functional *Mi* allele conferred resistance to *M. javanica* to a previously susceptible tomato line (Milligan et al. 1998). This represents the first study demonstrating that an R family gene is actually involved with a specific defense response.

Coffee plants, belonging to *Coffea arabica* species, are very susceptible to pathogen, such as insects, bacteria, fungus and nematode. Resistant *C. arabica* lines have been developed through crosses with other *Coffea* species, bearing natural defense mechanisms, such as *C. canephora* and *C. racemosa*. Thus, resistance to the agent of the orange-rust, the fungus *Hemileia vastratrix* was transferred from *C. canephora* to *C. arabica* (Monaco and Carvalho 1975; Fazuoli et al. 1999). Although coffee breeding programs are making efforts to develop multiple pathogen resistant inbred lines, very little information is available regarding the genetic control of these responses. For instance, resistance to root knot nematode infection, one of the main problems in coffee fields, is not well characterized at the molecular level in *Coffea* species. A limiting factor for identification of resistant-related locus is the lack of either genetic or molecular maps, and also the reduced number of coffee genes identified so far.

Recently, Noir et al. (2001) identified some RGA sequences in *Coffea* using heterologous primers. However, the amplified fragments covered only three amino acid sub-domains of the NBS conserved region. Also, only two *Coffea* species were evaluated in this study. The authors identified 19 different RGA sequences, which could be grouped into nine distinct classes.

In order to initiate a program aiming the characterization of defense mechanisms in coffee plants, we characterize RGA sequences in *Coffea* species. The variability of those sequences was compared among susceptible and resistant inbred lines and commercial cultivars. Also, in an attempt to associate the expression of those sequences with defense mechanisms, the expression of some RGAs in response to root knot nematode infection were evaluated in selected resistant and susceptible coffee genotypes.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

All plant material evaluated is part of to the Germplasm Collection of *Coffea*, from IAC, Campinas, Brazil. The Coffee Breeding Program of IAC developed all cultivars tested. Leaves were collected from non-cultivated accessions of *C. racemosa*, and from *C. canephora* cultivar Apoatã (B) and *C. arabica* cultivars Mundo Novo (MN) and Icatu Vermelho (MN). Mundo Novo resulted from a selection for high-yield and is a highly susceptible cultivar. Icatu Vermelho is an inter-specific hybrid of *C. arabica* and *C. canephora*, with several backcrosses to *C. arabica*. It is resistant to the orange-rust agent *Hemileia vastratrix*.

DNA extraction

Young leaves of all plant materials were collected, frozen in Liquid N₂ and kept at -80°C, until used. Total DNA was extracted according to Paillard et al. (1996).

Amplification of RGAs

Oligonucleotides corresponding to NBS-domains were designed based on sequence alignment of other RGA locus such as *Mi* (AF039682), *Cre3* (AF052641), and *rpm1* (AF122995). Primers corresponding to NBS sub-domains (Figure 1) were as following: Primer KIN1 (FORWARD): 5' a 3': TGATACTGGATGATGTCTGG; Primer EGF1 (REVERSE): 5' a 3': GTGCTTCTTATGAACCCTTC; Primer MHD1 (REVERSE): 5' a 3': CGACAGTCAGTCGTGCAT. Amplification reactions were performed using 250ng DNA, 1X Taq reaction buffer, 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0,2 pmols/μl of *primer*, 2.5U Taq Polymerase. PCR final conditions were: an initial denaturing step at 95°C for 5 min., followed by 30 cycles of 1 min. at 95°C, 1.5 min. at 50°C and 2 min. at 72°C, and a final extension step at 72°C during 10 min. Amplified fragments were separated by agarose electrophoresis, and gel purified using commercial kit (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech).

Cloning, sequencing and analysis of PCR products

Cloning of amplified and purified fragments was performed using the *pMOSBlue blunt ended cloning kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Amplified fragments corresponding to Kin/EGF primer combinations from *C. arabica* Mundo Novo and *C. canephora* Apoatã were cloned.

Besides these, for KIN/MHD primer set were also cloned fragments from *C. arabica* Icatu Vermelho and *C. racemosa*.

At least 40 clones of each original PCR reaction were sequenced by the dideoxy method. The sequencing kit *ABI-PRISM Dye Terminator* was used, and the reactions were separated in an ABI377 Automatic sequencer. Computer tools such as ClustalW, Molecular Toolkit, and BLAST analyzed sequences.

The method Neighbor-joining (NJ) with p-distance (Saitou and Nei 1987) was used for phylogenetical analysis. NJ-tree construction and bootstrap analysis, with 5,000 replications, were performed by the software MEGA2 (Kumar et al. 1993).

Nematode inoculation

Nematode populations were collected in naturally infested fields. Inoculum of *M. exigua* was isolated from mixed samples, identified and propagated in coffee plants, in greenhouse. Egg masses were collected and used to infect roots from *C. arabica* cultivar Mundo Novo (susceptible) and *C. canephora* cultivar Apoatã (resistant). Around 5000 eggs/individual were used for infection of coffee seedlings roots.

RGA expression analysis

Total RNA was extracted from infected and control roots of both susceptible and resistant genotypes according to Maluf et al. (1997). RGA expression was evaluated by reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) using the commercial kit ThermoScript™ RT-PCR System (Life Technologies). The forward primer used in all reactions was the Kin1 (see *Amplification of RGAs*). The reversed primers were: MHD2: 5' a 3': CGTGCATCCTGTACTTCTCT; EGF2: 5' a 3': TGCTTCTTATGAACCCTTCC; CFA1: 5' a 3': CAAGGTACAGAAAACATGGT. Control actin primers were used to check integrity and initial concentration of mRNA.

For time-course analysis infected roots were collected at the following infection interval times: non-inoculated; 24 hours-, 3 days-, 10 days-, 21 days-, and 30 days- after inoculation. Root samples were collected from both susceptible and resistant genotypes, frozen in liquid N₂, and kept at -80°C until used.

RESULTS

RGA amplification from *Coffea* genotypes

In order to evaluate the diversity of RGA sequences in *Coffea* species, these were amplified from a selection of genotypes, using combinations of heterologous primers corresponding to NBS domains. Oligonucleotide primers were designed based on alignment of previously identified RGA sequences (Kanazin et al. 1996; Collins et al. 1998). The primers tested (Figure 1) amplify a DNA fragment that comprehends the whole sequence between the kinase-1 of the NBS domain, and either EGF or MHD motifs of the region between NBS and LRR domains. Optimal amplification conditions were established for all primers combinations using *C. arabica* genomic DNA. Amplified fragments that corresponded to expected size were directly sequenced to confirm their RGA identity. After positive identification, RGA were then amplified from all other genotypes.

RGA related sequences were amplified from all genotypes analyzed, including species that exhibit resistance to several pathogens, such as *C. canephora* and *C. racemosa*, and also in highly susceptible *C. arabica* cultivar. Both set of primers combinations amplified corresponding sequences in all germplasm tested. However, for the primer combination that includes the region between kinase-1 and EGF domains, only amplified sequences from cultivars Mundo Novo of *C. arabica* and Apoatã of *C. canephora* were further analyzed.

Amplified fragments were cloned and sequenced. In order to minimize sequence polymorphisms due to Taq polymerase errors, at least 40 clones of each PCR reaction were analyzed. A total of 9 distinct sequences were observed for the KIN/MHD primer combination, and 3 for the KIN/EGF combination (Figure 2). Only sequences with at least two copies were used for further analysis. BLAST searches in the GenBank demonstrated the high homology of coffee sequences with other RGA sequences (Figure 3), such as NBS-LRR resistance-like protein J71 from *Phaseolus vulgaris* e Prf protein from *Lycopersicon pimpinellifolium*. Interestingly, a sequence amplified from *C. canephora* showed significant homology with the *Mi* locus of tomato (61% of positive amino acids). This locus is responsible for the resistance to *Meloidogyne* nematode species in tomato. Coffee cultivars expressing nematode resistance belong to *C. canephora* species, and major efforts are being made to transfer resistant genes from this species to *C. arabica*.

Alignment of amplified RGA coffee sequences demonstrated that these might be grouped in 3 distinct groups, based on observed polymorphisms in conserved regions (Figure 2B). However, the overall genetic variability of these sequences is very low. Although significant polymorphisms were observed at DNA level, very few significant amino acid changes are present in conserved protein domains. Besides the NBS domains, other highly conserved amino acid regions were observed in coffee RGA sequences. Apparently, those domains are coffee specific, since they are not present in other species RGAs (Figure 2B).

Two distinct gene families were observed in *Coffea* species, according to the pair of primers used: the MHD family, and the EGF family (Figure 2). In order to look at phylogenetic relationships of these families we used the neighbour-joining (NJ) method with p-distance (Saitou and Nei 1987). Construction of NJ tree and its bootstrap tests were performed by the software MEGA2 (Kumar et al. 1992). The gene family node is supported with 100% bootstrap values. This node separates EGF and MHD families into two clusters (Figure 4). Due to the fact that no species displaying gene sequences belonging to either MHD or EGF families could be identified, external group genes used in this analysis belong both to MHD family (AB028617) and EGF family (AF039682 and AF320848). Sequences of MHD family can be divided into two groups, A and B, according bootstrap values (Figure 4) and sequence alignments (Figure 2B). Despite the fact that Icatu Vermelho 2-2 sequence is located in group A, it is a hybrid sequence from groups A and B (Figure 2B). Significantly this sequence displays an L amino acid in GLPL motif, representing group A, and an R amino acid in CFA motif of group B, therefore, representing a hybrid sequence of both groups.

RGA expression in nematode infected roots

With the purpose of verify if RGA amplified sequences are somehow related with resistance to the nematode *M. exigua* in selected *Coffea* cultivars, their expression was evaluated through RT-PCR analysis. Roots of the nematode resistant *C. canephora* cultivar Apoatã were infected with eggs of *M. exigua*. Samples were collected and frozen at different time intervals after inoculation (see Material and Methods). Total RNA was extracted and used for further amplification of RGA related transcripts. As a control, roots of *C. arabica* susceptible cultivar Mundo Novo were submitted to the same treatment. At first, cDNA was synthesized from total RNA using an oligo dT primer. A selective amplification of RGA sequences was then

performed using the same primer pairs as for genomic analysis. To check both quality and quantity of initial mRNA, coffee actin-specific primers were used to amplify related sequences. Amplified fragments corresponding to RGA sequences were observed in both resistant and susceptible cultivars (Figure 5). Those fragments were further cloned and sequenced for comparison with genomic sequences. These analyses confirmed the identity and diversity of expressed resistance gene analogs. Also, it was observed that RGA sequences belonging to the same group of NBS domains identified in genomic PCR are being expressed in infected roots. However, analysis with restriction endonucleases could not detect any polymorphism among expressed RGA sequences from susceptible and resistant genotypes (data not shown).

RT-PCR analysis revealed that both susceptible and resistant genotypes expressed RGA in root tissues in the absence of nematode. Basal expression was detected in non-inoculated roots, and at initial periods upon nematode inoculation (Figure 5). The major difference observed between genotypes is related with expression level, observed for only one of the primer combinations tested, the KIN/MHD2. For this primer set, nematode resistant roots displayed a low level of RGA transcripts accumulation until 10 days after inoculation. At this point, a peak of RGA sequence accumulation is observed (Figure 5). On the other hand, nematode susceptible roots exhibit a high basal RGA transcript accumulation in pathogen absence. However, this accumulation ceases after nematode inoculation (Figure 5). In both susceptible and resistant genotypes actin transcripts levels were uniform during time-course treatments, demonstrating that mRNA was intact in those samples. These results were repeatedly observed, even when RNAs extracted from different plants were tested. Also, the same pattern of RGA transcripts accumulation is observed in *C. arabica* hybrids segregating for resistance to *M. exigua* (data not shown). For others primer sets tested there was no detectable difference in transcripts levels at the 10 days tested inoculation time (Figure 6). For those primer sets both susceptible and resistant inoculated roots accumulated corresponding transcripts.

DISCUSSION

The RGA family members are characterized by the presence of two conserved nucleotide domains. The NBS domain consists of several amino acid motifs, which are responsible for

the recognition and binding of DNA specific regions. The LRR domain comprehends leucine repeats that are probably related with specific protein recognition and stabilization of DNA/protein interactions. The highly conserved amino acid sequence of these domains allows the design of specific primers that amplify similar sequences in several species. This strategy was used to amplify RGA related sequences in *Coffea* genotypes.

RGA related sequences were amplified from both susceptible and resistant cultivars. The variability among sequences is not very high. This low diversity is more evident in susceptible cultivars, such as Mundo Novo, which amplified only one type of RGA sequence for KIN/EGF and two types for KIN/MHD, even in several independent PCR reactions. Nevertheless, the NBS-domain evaluated in this analysis is very conserved in all plant sequences identified. Therefore, it could be argued that the variability in RGA sequences, essential for their role in specific pathogen recognition will probably be found in others domains, such as the LRR. In other studies, it has been shown that a basal expression level of these sequences is observed, even in absence of pathogen attacks (Tao et al. 2000; Fourmann et al. 2001). Together these observations may suggest another biological role for R genes, besides the involvement during HR.

In an attempt to evaluate the genetic relationship of the species in study, we performed a phylogenetic analysis, using the NJ- inference method. The phylogenetic gene tree obtained from this analysis corroborates the evolutive history of the species *C. arabica*. This species was possibly originated from an inter-specific cross between *C. canephora* and *C. eugenoides* (Lashermes et al. 1999), followed by chromosome duplication. Therefore, *C. arabica* is an allotetraploid ($2n=44$), and other species of *Coffea* are diploid ($2n=22$). Despite this inter-specific origin, the overall genetic variability of *C. arabica* is very low. This is a result of autogamous reproduction, and intensive breeding cycles. On the other hand, the selected *C. canephora* cultivar Apoatã exhibited a higher number of nucleotide and amino acid differences (Figure 2). These observations are consistent with the facts that this cultivar has a wide-spectrum of pathogen resistance and that *C. arabica* is susceptible to several pathogens.

Another interesting observation is related to *C. arabica* cultivar Icatu Vermelho. This cultivar is the result of an artificial inter-specific cross between *C. canephora* and *C. arabica*, followed by successive backcross to *C. arabica*. It is a tetraploid and exhibit orange-rust resistance (Monaco and Carvalho 1975). Amplified RGA sequences are homologous to both parental

sequences (Figure 4). Sequences belonging to groups 1 and 2 are identical, representing probably sequences originated in *C. arabica*. Therefore, the group B in figure 4 contains the IV sequence originated in *C. canephora*.

The species *C. racemosa* is the only genotype in this study that does not share a common origin with the other species. The NJ-tree demonstrates this relationship, once sequences from IV, MN and AP are grouped inside the MHD family, and sequences from *C. racemosa* comprehend an isolated group for this family (Figure 4).

The two main primers set used in this analysis were able to amplify two distinct RGA families. This distinction is supported by observations such as a significant proportion of nucleotide differences (0.25—p—0.30), an acceptable bootstrap confidence level (BCL), and the presence of an outsider RGA group, from *Arabidopsis*, included in one family.

Together, the results allow for inferences about the division of the two RGA families observed, which took place probably before *C. arabica* speciation. If the division had occurred after this speciation, the sequence from *C. racemosa* would be represented as an external group to both MHD and EGF families, what does not occurred. Until present, no member of the MHD gene family could be found in monocotyledonous species during GenBank BLAST searches. This fact could be an indicative that the separation between those two families probably occurred before the diversification of dicotyledonous groups.

The species *C. arabica* is the most important of all cultivated species of *Coffea*. Arabica plants produce a high quality coffee beverage. However, these plants are highly susceptible to all types of pathogens. Despite the fact that losses in yields due to insects and diseases are very high, very little information regarding defense mechanisms and genetic control of resistance is available for *Coffea* species.

In this work, we initiated a characterization of response to nematode infection on resistant coffee plants. Root-knot nematodes belonging to genus *Meloidogyne* represent one of the most aggressive pathogens to coffee plants. After infection of susceptible plants, nematodes parasitize xylem parenchymatous cells, altering their function and gene expression, and leading to the development of giant cells. As a result, galls appear all over the root system, causing a functional collapse and consequent plant death. Plant resistance to nematodes is observed when the pathogen has reduced levels of reproduction (Trudgill 1991). Genes that confer resistance to nematodes have been identified in several plant species. Several of them

have been already mapped and cloned. Among these, the locus *Mi* of tomato (Milligan et al. 1998), the *Cre* of wheat (Seah et al. 1998), the *Hs1^{pro-1}* from sugar-beet (Cai et al. 1997), are members of the RGA gene family, and are associated with the hypersensitive-response.

In order to investigate if a member of the RGA gene family of *Coffea* is involved during nematode defense response of resistant cultivars, the expression of these genes was evaluated in inoculated roots in time-course experiments. Sequences corresponding to RGA genes were amplified by RT-PCR from susceptible and resistant roots inoculated with *M. exigua*. This nematode was chosen because the coffee resistance inheritance is apparently monofactorial (Fazuoli 1981), which therefore could be the result of an RGA gene action. The results showed an accumulation of RGA-related transcripts in both susceptible and resistant genotypes, even in the absence of nematode. This pattern of accumulation was already described for other RGA transcripts (Tao et al. 2000; Fourmann et al. 2001) and also for some defense related proteins (Van Loon and Van Strien 1999). The fact that resistant genotypes exhibit a less intense RGA-transcript accumulation in the presence of nematode, at the first days after infection was unexpected. Susceptible genotype, on the other hand, has an intense transcript accumulation in the absence of nematode, and after 10 days this accumulation is turned down. However, this expression pattern was observed only for one of the RGA primer set combinations. For other primer sets, basal transcripts accumulated at all times after nematode inoculation. These observations could imply that a specific RGA sequence is involved during defense response in resistant roots. If this is the case, the specificity of RGA-mediated response is most probably due to differences in the LRR-domain, once no restriction polymorphism could be detected between expressed sequences of susceptible and resistant roots (data not shown).

The fact that other coffee RGA sequences are expressed during infection also demonstrated that transcription of plant genes is not totally repressed by nematode proteins in infected roots. Although, there is no previous cytological analysis of nematode infection on coffee roots, greenhouse observations suggested that the resistance response would be initiated within 7 to 10 days after infection. Therefore, at this point, the nematode had migrated along root cells until the root tip, and initiated the development of the feeding site and the giant cell. This development involves the repression of specific plant gene expression in giant cells by nematode proteins. Previous studies suggested that plant genes not essential for nematode

feeding site establishment are preferentially turned off (Goddijn et al. 1993). Also, cytological analysis of coffee roots infected with *M. incognita* demonstrated that in resistant plants the giant cell is underdeveloped (Anzueto et al. 2001). These results suggest that defense mechanisms in coffee are probably more related to inhibition of giant cell development rather than blocking of nematode infection. In our analysis, resistant plants show an increase of RGA transcript accumulation at the point correspondent to giant cell development, and not before when the nematode penetrates the root system. On the other hand, susceptible plants exhibit RGA transcript accumulation in the initial steps of nematode infection, suggesting that plant defense genes are activated at this point, but are probably repressed at subsequent steps. In this case, although the results obtained so far suggest that RGA genes are involved in the response to nematode infection, their exact role is not well characterized. This type of gene could not only be related to specific nematode recognition, but also to further activation steps in the defense-signaling pathway.

In this work we could demonstrate that RGA related sequences in species of the genus *Coffea* are not very polymorphic, and have common ancestral origin. Also, the resistance mechanism to nematode in *Coffea* cultivars is associated with differential expression of a RGA. Future studies focusing on cytological and molecular aspects of plant-nematode interactions would help the understanding of RGA specific role during defense response. As for molecular-assisted selection in coffee breeding programs, the identification of DNA polymorphisms on RGA sequences would represent important tools for selection of resistant *Coffea* genotypes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. C. A. Colombo for the use of his laboratory facilities. C.H.O. was supported by a graduate scholarship from Capes/Brazil.

REFERENCES

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

- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. and Staskawicz, B.J. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**: 1856-1860.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein-Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M.J., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Jung, C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* **275**: 832-834.
- Collins, N.C., Webb, C.A., Seah, S., Ellis, J.G., Hulbert, S.H. and Pryor, A. 1998. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant-Microbe Int* **10**: 968-978.
- Fazuoli, L.C. 1981. Resistance of coffee to the root-knot nematode species *Meloidogyne exigua* and *M. incognita*. *Colloque Intern. sur la Protec. des Cultur. Trop.*, Lyon, p.57.
- Fazuoli, L.C., Medina-Filho, H.P., Guerreiro-Filho, O., Gonçalves, W., Silvarolla, M.B. and Lima, M.M.A. 1999. Coffee cultivars in Brazil. *Association Scientifique International du Café – 18^{ème} Colloque Helsinki, Finland*, p. 396 - 404.
- Fourmann, M., Charlot, F., Froger, N., Delourme, R. and Brunel, D. 2001. Expression, mapping, and genetic variability of *Brassica napus* disease resistance gene analogues. *Genome* **44**: 1083-1099.
- Gilbert, J.C. and McGuire, D.C. 1956. Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial type tomatoes. *Proc Am Hort Soc* **68**: 437-442.
- Goddjin, O.J.M., Lindsey, K., van der Lee, F.M., Klap, J.C. and Sijmons, P.C. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic harbouring promoter-gusA fusion constructs. *Plant J* **4**: 863-873.
- Graham, M.A., Marek, L.F., Lohnes, D., Cregan, P. and Shoemaker, R.C. 2000. Expression and genome organization of resistance genes analogs in soybean. *Genome* **43**: 86-93.
- Kanazin, V., Marek, L.F. and Shoemaker, R.C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11746–11750.
- Kretschmer, J.M., Chalmers, K.J., Manning, S., Karakousis, A., Barr, A.R., Islam, A.K.M.R., Logue, S.J., Choe, Y., Barker, S., Lance, R.M. and Langridge, P. 1997. RFLP mapping of the *Ha2* cereal cyst nematode resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* **94**: 1060 – 1064.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Lashermes, P., Combes, M.C., Robert J., Trouslot, P., D' Hont, A., Anthony, F. and Charrier, A. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet* **261**: 259-266.

- Lawrence, G.J., Finnegan, E.J., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G. 1995. The L6 gene for flax rust resistance is related to the arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *The Plant Cell* **7**: 1195-1206.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance gene from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet* **14**: 421-429.
- Maluf, M.P., Saab, I.N., Wurtzel, E.T. and Sachs, M.M. 1997. The *viviparous 12* maize mutant is deficient in abscisic acid, carotenoids, and chlorophyll synthesis. *J Exp Bot* **48**: 1259-1268.
- Mago, R., Nair, S. and Mohan, M. 1999. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theor Appl Genet* **99**: 50-57.
- Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V.M. 1998. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell* **10**: 1307-1319.
- Monaco, L.C. and Carvalho, A. 1975. Coffee breeding for leaf rust resistance. Association Scientifique International du Café – 7^{ème} Colloque Hambourg, Germany, p. 437 - 445.
- Noir, S., Combes, M.-C., Anthony, F. and Lashermes, P. 2001. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 654-662.
- Paillard, M., Lashermes, P. and Pétiard, V. 1996. Construction of a molecular linkage map in *Coffea*. *Theor Appl Genet* **87**: 43-47.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B. and Palloix, A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* **42**: 1100-1110.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Seah, S., Sivasithamparan, K., Karakousis, A. and Lagudah, E.S. 1998. Cloning and characterisation of a family of disease resistance analogs from wheat and barley. *Theor Appl Genet* **97**: 937-945.
- Spielmeyer, W., Robertson, M., Collins, N., Leister, D., Schulze-Lefert, P., Seah, S., Moullet, O. and Lagudah, E.S. 1998. A superfamily of disease resistance gene analogs is located on all homoeologous chromosome groups of wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* **41**: 782-788.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M. and Katagiri, F. 2000. Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistant gene *Rps2*. *The Plant Cell* **12**: 2541-2554.
- Trudgill, D.L. and Blok, V.C. 2001. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 53-77.

Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97.

FIGURES

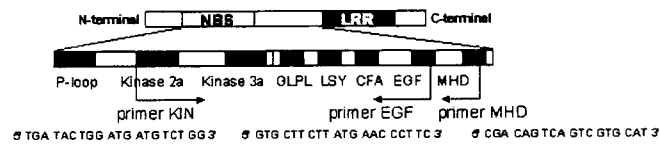


Figure 1- Schematic representation of NBS-LRR domains. Selected primers corresponding to amplified domains are shown.

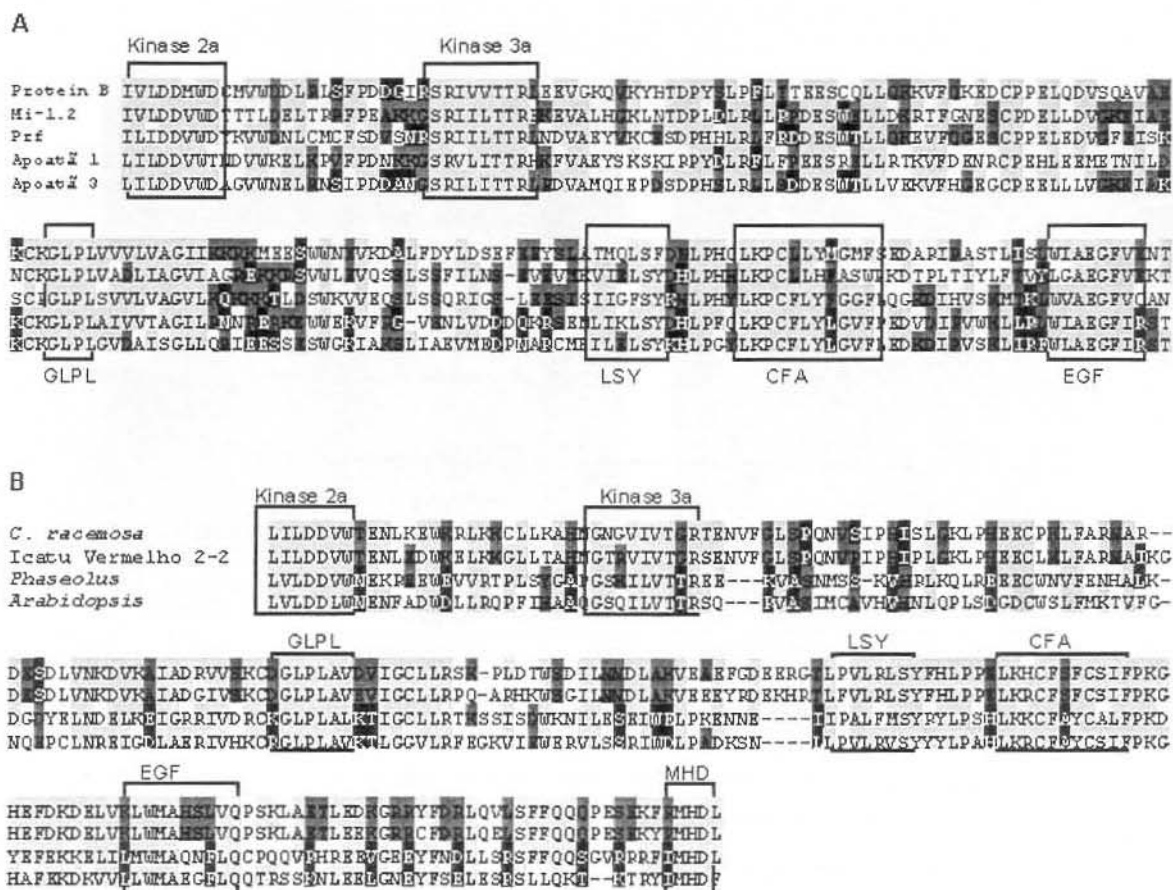


Figure 3 – Alignment of coffee RGA deduced amino acid sequences with homologous sequences from other species present in the GenBank. Sequences amplified using (A) KIN/EGF and (B) KIN/MHD primer sets showed high homology with correspondent RGA sequences. Light grey boxes correspond to similar amino acids present in all aligned sequences. Dark grey and black boxes correspond to similar amino acids present in at least two aligned sequences.

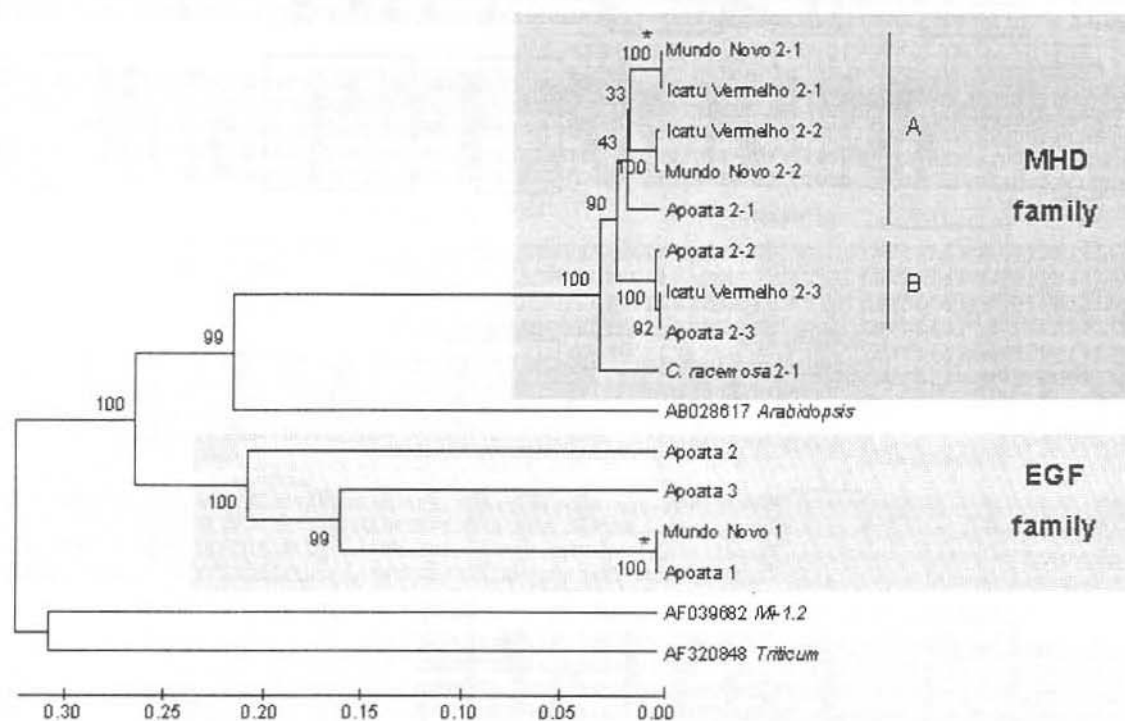


Figure 4 – Phylogenetic tree for RGA nucleotide sequences from *Coffea* species. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method. Numbers (%) on the branches correspond to bootstrap values (5,000 replications).

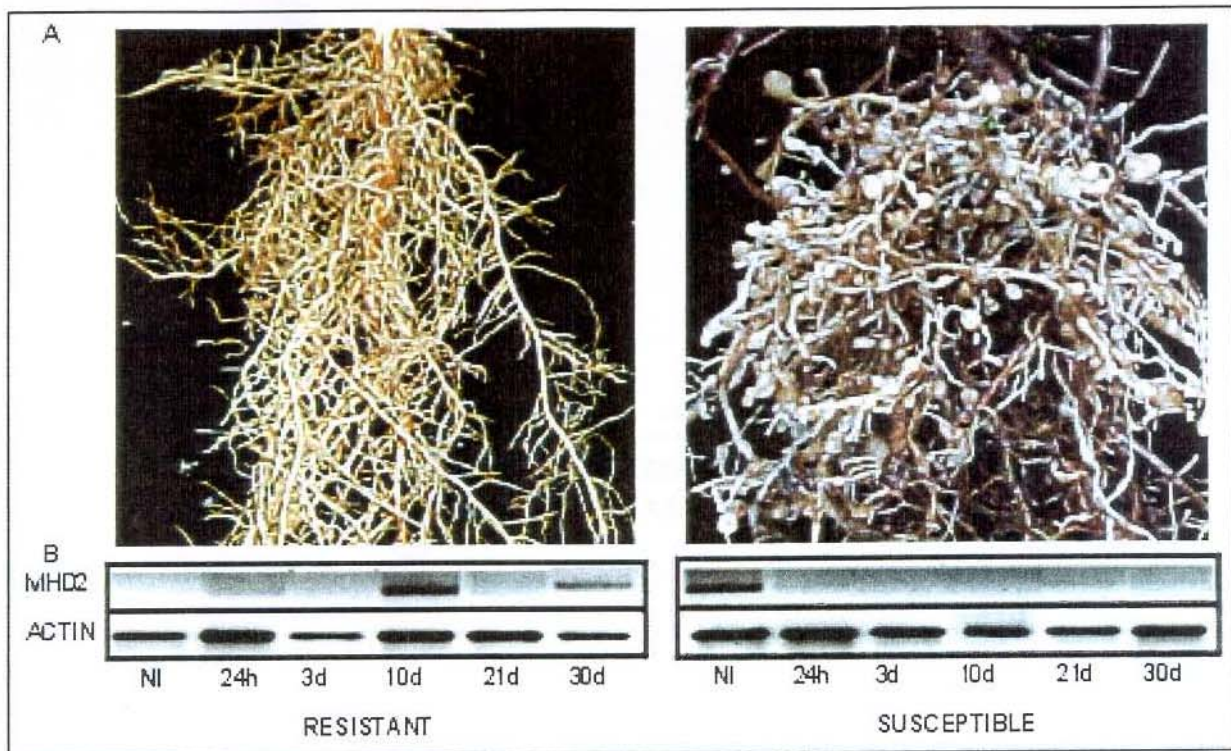


Figure 5 – RGA expression in coffee seedlings roots during nematode infection. Roots of resistant and susceptible (A) cultivars were inoculated with *M. exigua*. Development of nodes corresponding to nematode multiplication is observed only in susceptible roots. Expression of RGA was detected by RT-PCR only in infected resistant roots (B). Actin transcript levels were used as a control of mRNA integrity and concentration.



Figure 6 – RGA expression detected by RT-PCR in susceptible (MN) and resistant (AP) cultivars, after 10 days of nematode inoculation. Primers amplifying MHD, EGF and CFA motifs were tested, and only the pair related to MHD motif showed a significant difference in transcript accumulation.