

# ANÁLISE *IN SILICO* DOS ESTs ISOLADOS DE *Coffea arabica* INFESTADA COM *Meloidogyne paranaensis*

Érika V. S. ALBUQUERQUE<sup>1</sup>, E-mail: erikavs@cenargen.embrapa.br; Marília S. SILVA<sup>2</sup>; Cristiane C. TEIXEIRA<sup>1</sup>; Magnólia A. CAMPOS<sup>3</sup>; Maria F. GROSSI-DE-SÁ<sup>1</sup>; Felipe R. DA SILVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; <sup>2</sup>Embrapa Cerrados, Planaltina-DF; <sup>3</sup>Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

## Resumo:

O ataque dos nematóides constitui grande problema fitossanitário para a cultura do café pelos grandes prejuízos que causam e pela dificuldade de controle. Entretanto, é difícil o melhoramento de *C. arabica* para a introgressão de fontes de resistência caracterizadas em *C. canephora*. A base do conhecimento da genética funcional do cafeeiro recebeu grande aporte de informações pela implementação do Projeto Genoma Café Brasileiro (CafEST), cujo banco de dados reuniu seqüências expressas em diferentes tecidos e tratamentos em *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*. Foram gerados mais de 30 mil unigenes, a partir de 154770 *reads* presentes nas bibliotecas do CafEST. Entretanto, apenas 6483 *reads* são oriundos de raiz, sendo que a maior parte destes (76%) provém de uma biblioteca de estresse abiótico. Apenas 302 *reads*, que na sua maioria são *singlets*, correspondem à biblioteca desafiada com nematóide (NS1), em uma condição de interação compatível com cafeeiro suscetível. Neste trabalho foram feitas análises da biblioteca NS1 no contexto do CafEST com o auxílio das ferramentas desenvolvidas no Laboratório de Bioinformática da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A busca por seqüências específicas de NS1 gerou uma lista de 60 *clusters* (2 contigs e 58 *singlets*), que foram categorizados de acordo a similaridade com o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os resultados de BlastX indicaram que metade dos *clusters* não está presente no banco (*no hits*), 40% tem origem vegetal e 10% são de microrganismos ou animais. A comparação da biblioteca NS1 com o restante das bibliotecas do CafEST, assim como com duas outras bibliotecas de raiz induzidas por estresse abiótico (bion e alumínio) demonstrou não haver expressão significativamente diferente pelo teste de Fisher. Como a biblioteca NS1 possui alto índice de novidade (94.7%) e pequeno agrupamento dos *reads*, pudemos inferir que mais bibliotecas de raiz em situações contrastantes devam ser geradas, principalmente de genótipos de café resistente e suscetível aos nematóides. Apesar das limitações da biblioteca, foram encontradas seqüências compatíveis ao estresse aplicado. O entendimento da relação com os patógenos e dos mecanismos da resistência do cafeeiro são ainda bastante incipientes, especialmente em relação aos nematóides. Assim, este estudo faz parte da proposta de alguns projetos em execução que utilizam técnicas moleculares como abordagem da interação entre o *Meloidogyne* e o cafeeiro. Com o entendimento dos mecanismos de resposta da planta envolvidos nesta interação, serão isoladas seqüências que possam ser utilizadas para o melhoramento de cultivares e possibilitar a consequente obtenção de plantas resistentes.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, interação planta-patógeno, ESTs, resistência, *Meloidogyne*.

## *In silico* ANALYSIS OF *Coffea arabica* ESTs INFESTED WITH *Meloidogyne paranaensis*

### Abstract:

Nematodes attack constitutes a great sanitary problem for the culture of the coffee due to the great damages caused by them and the difficulty of their control. However, the improvement of *C. arabica* is difficult for the introgression of characterized sources of resistance in *C. canephora*. The functional genetics of the coffee tree received great input of information from the implementation of the Project Genome Brazilian Coffee (CafEST), whose data base congregated expressed sequences in different tissues and treatments in *C. arabica*, *C. canephora* and *C. racemosa*. More than 30 thousand unigenes had been generated from 154770 reads gifts in the libraries of the CafEST. However, only 6483 reads are derived from root, being that most of these (76%) comes from a library of abiotic stress. Only 302 reads, that in its majority are *singlets*, correspond to the library defied with nematode (NS1), in a condition of compatible interaction with susceptible coffee tree. In this work, analyses of library NS1 had been made in the context of the CafEST with the aid of the tools developed in the Bioinformatics Laboratory of the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. The search for specific sequences of NS1 generated a list of 60 clusters (2 contigs and 58 singlets), that had been categorized in similarity agreement with the non-redundant data base of the National Center will be Biotechnology Information (NCBI). The results of BlastX had indicated that half of clusters is not present in the bank (*no hits*), 40% have vegetal origin and 10% are from microorganisms or animals. The comparison of library NS1 with the remaining libraries of the CafEST, as well as with two other induced libraries of root for abiotic stresses (bion and aluminum) demonstrated not to have significantly different expression for the Fisher Test. As library NS1 possesses high index of novelty (94.7%) and small grouping of reads, we could infer mainly that more libraries of root in contrast situations must be generated, from coffee genotypes resistant or susceptible to nematodes. Despite of the limitations of the library, sequences compatible to the applied stress had been found. The knowledge of the coffee relation with the pathogens and the activated mechanisms of resistance are still incipient, especially in relation to nematodes. Thus, this study it is part of some projects proposals in course that use molecular techniques to approach the interaction between the *Meloidogyne* and the coffee tree. With the understanding of the mechanisms involved in the plant response, there will be isolated sequences to be used for the cultivars improvement and the consequent attainment of resistant plants.

Key words: *Coffea arabica*, plant-pathogen interaction, ESTs, resistance, *Meloidogyne*.

## Introdução

O café é um tradicional produto do agronegócio brasileiro que corresponde a 2,4% do total das exportações brasileiras (Ministério do Desenvolvimento, 2006). A produção nacional da safra 2006/07 atingiu 42,5 milhões de sacas de 60kg de café beneficiado, sendo 33,0 milhões de *Coffea arabica*. Entretanto, a maior dificuldade da cultura cafeeira é a suscetibilidade dessa espécie ao dano causado por doenças (Carvalho e Chaulfoun, 2000), pragas (Souza e Reis 1997; Souza et al., 1998) e nematóides (Carneiro et al., 2005).

De acordo com dados de Lordello (1976), dentre os nematóides da cultura do café, os do gênero *Meloidogyne spp.* (nematóides de galha) são os mais agressivos. Ao estabelecerem seu sítio de alimentação na raiz de cultivares suscetíveis, os nematóides induzem o tecido adjacente a formar células gigantes, que servem como fonte de nutrientes para o desenvolvimento e reprodução deste parasita (Williamson, 1998). Os danos ao cafeeiro desestabilizam seu metabolismo, o que também pode acarretar suscetibilidade a outros patógenos oportunistas. Entretanto, existe dificuldade dos programas de melhoramento na introgressão em *C. arabica* das fonte de resistência aos nematóides, disponíveis em outras espécie do gênero *Coffea*. Desta forma, é importante a criação de novas cultivares melhoradas quanto à resistência aos nematóides para evitar o uso de controles químicos (McDowell & Woffenden, 2003).

A resposta de defesa na planta pode ser induzida pela interação gene-a-gene do hospedeiro (gene R) com o patógeno (gene Avr), cujo principal efeito é a morte celular programada das células infectadas, isto é, a HR, resposta de hipersensibilidade (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Diversos genes de resistência já foram isolados em numerosas espécies de plantas (Martin et al., 2003), sendo que a maioria dos genes R está contida em uma mesma família que apresenta domínio de ligação a nucleotídeos (NBS).

Com o objetivo de caracterizar os genes envolvidos no mecanismo da interação planta/patógeno, foi realizada uma análise da biblioteca de *C. arabica* infectada com *M. paranaensis* (NS1) presente no banco brasileiro de ESTs do Projeto Genoma Café (CafEST). Os 60 *clusters* biblioteca-específicos foram obtidos a partir de 302 *reads*, utilizando-se o conjunto de ferramentas de bioinformática disponível na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A similaridade desses ESTs com os acessos do GeneBank permitiu a formação de quatro categorias. Os resultados indicam que a biblioteca apresentou alto índice de novidade, sendo que a maioria dos *reads* não formou *contigs*. Entretanto, a comparação da biblioteca NS1 com outras bibliotecas de raiz desafiadas, ou mesmo com o restante do CafEST, não indicou diferença significativa de expressão dos *clusters* específicos da biblioteca testada.

## Material e Métodos

A biblioteca de cDNA NS1 foi construída a partir do conjunto (*pool*) de mRNAs expressos em *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho inoculado com *Meloidogyne paranaensis*. A produção do inóculo de *M. paranaensis* foi feita em plantas suscetíveis de *C. arabica* cv. Mundo novo cultivadas em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos de raízes de cafeeiro infestadas utilizando o método de Hussey e Barker (1973), com hipoclorito de sódio 0,5%. Para a eclosão de juvenis de segundo estágio (J2), a suspensão de ovos foi submetida à técnica do funil de Baermann modificado (Whitehead & Hemming, 1965) em recipiente com água destilada durante 14 dias à temperatura de 25-27°C. A suspensão de ovos foi purificada utilizando o método de Flotação e Centrifugação (Jenkins, 1964). Os nematóides no estágio J2 foram quantificados em lâmina de Peters. Plantas com 4 a 6 pares de folhas cultivadas em copos de 200mL com solo foram infestadas com 2000 J2. As raízes secundárias foram coletadas após 3, 6 e 10 dpi, lavadas em água corrente e preservadas a -80°C. A metodologia de extração do RNA total, síntese do cDNA, clonagem e seqüenciamento foram descritas por Vieira et al. (2006).

Os dados gerados pelos seqüências da biblioteca NS1 foram analisados no contexto do CafEST utilizando-se o sistema de análise, disponíveis para os usuários cadastrados das instituições participantes deste projeto. Após o processamento dos cromatogramas gerados no Projeto Genoma Café (remoção de seqüências de rRNA e de vetor, adaptador, caudas de poli-A e bases de baixa qualidade), as 154.770 seqüências restantes foram agrupadas com uso do programa CAP3 para a formação de 45.366 grupos do conjunto UniGene de Café. As seqüências-consenso de cada UniGene foram comparadas com seqüências protéicas do NCBI por BlastX. Apenas semelhanças com e-values melhores que  $10^{-5}$  foram consideradas.

A ferramenta de busca “biblioteca-específica” foi utilizada para o isolamento dos *clusters* presentes somente em NS1. Com o Teste de Fisher, foi realizada a comparação nível de significância 0.5 entre os seguintes grupos: NS1 x CafEST-NS1 e NS1 x raiz desafiada (RT5 e RT8, que receberam estresses abióticos com bion - acibenzolar-S-methyl ou alumínio, respectivamente).

## Resultados e Discussão

A partir dos 560 clones seqüenciados da biblioteca NS1, foram gerados 302 *reads* aceitos, que formaram 286 *clusters*. Apenas 14 desses grupos são formados por mais de uma seqüência. Assim, conforme indica o índice de novidade de NS1 (94.7%), se não houvesse comprometimento da qualidade de grande parte das seqüências, outros clones poderiam ter sido seqüenciados antes de atingir o nível de saturação da biblioteca.

Foram obtidos 60 *clusters* com a ferramenta de busca “biblioteca-específica”. Apenas dois *contigs* foram formados, cada um contendo 2 *reads*. A análise dos resultados de BlastX desses *clusters* (Fig. 1) demonstrou que 10% dos *clusters* não tem similaridade com outras plantas do banco de dados, sendo 1 deles um *contig*. Como existe a presença de

material genético do *Meloydogine*, que é intrínseca ao tratamento para desafio contra nematóide, e uma vez que poucas das seqüências de *Meloydogine* depositadas no banco de dados são anotadas, pode ser que esses *clusters* não constituam contaminação externa do experimento. De acordo com o resultado do BlastX realizado, metade (50%) dos *clusters* não apresentou similaridade com o banco de dados (*no hits found*), que pode indicar novas seqüências isoladas, mas deve-se levar em consideração que apenas 1 desses 30 *clusters* gerados formou *contig*. Além disso, deverão ser analisadas as seqüências nucleotídicas dos *clusters* contra o banco de dados para verificar possíveis semelhanças com genes de microrganismos.

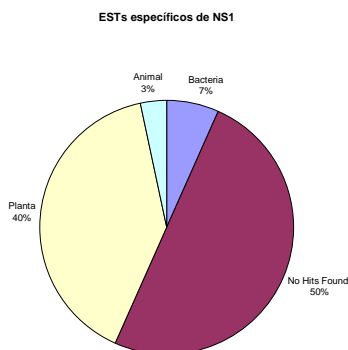


Figura 1: Categorização dos *clusters* biblioteca-específicos de NS1 de acordo com o reino pertencente da seqüência de maior similaridade encontrada no NCBI.

Os resultados de similaridade (*best hits*) dos 40% de ESTs de planta estão representados na tabela 1. Os dados bibliográficos de algumas seqüências identificadas nesta tabela indicam forte ligação das respectivas enzimas com as vias metabólicas relacionadas ao estresse oxidativo.

Tabela 1: resultados dos melhores *hits* de similaridade dos *clusters* biblioteca-específicos de NS1 a seqüências vegetais depositadas no NCBI.

Cluster	Similaridade	E-value
1	gb AAD50974.1  catalase CAT1 [Manihot esculenta]	3,00E-08
2	bj BAD72330.1  putative acyl-CoA synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	1,00E-100
3	dbj BAE93355.1  phosphate transporter [Lotus japonicus]	1,00E-87
4	dbj BAF17902.1  Os05g0506900 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	2,00E-21
5	dbj BAF25839.1  Os09g0560300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	7,00E-30
6	emb CAB76908.1  putative Ruv DNA-helicase [Cicer arietinum]	1,00E-119
7	gb AAF61647.1  UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase [Nicotiana tabacum]	4,00E-75
8	gb AAR83852.1  thioredoxin [Capsicum annuum]	3,00E-44
9	gb AAS88782.1  At1g49000 [Arabidopsis thaliana]	4,00E-17
10	gb AAT40487.1  putative disease resistance protein [Solanum demissum]	1,00E-18
11	gb ABE81653.1  Protein kinase [Medicago truncatula]	2,00E-18
12	gb ABE90455.1  AMP-dependent synthetase and ligase [Medicago truncatula]	1,00E-87
13	gb ABF93805.1  expressed protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	1,00E-21
14	ref NP_175266.1  acyl-CoA thioesterase/ catalytic/ hydrolase, acting on ester bonds [Arabidopsis thaliana]	5,00E-14
15	ref NP_175914.1  PLDEPSILON phospholipase D [Arabidopsis thaliana]	1,00E-15
16	ref NP_181959.1  lipid binding [Arabidopsis thaliana]	5,00E-27
17	ref NP_191795.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]	5,00E-92
18	ref NP_564435.1  carbon-sulfur lyase [Arabidopsis thaliana]	1,00E-22
19	ref NP_566232.1  unknown protein [Arabidopsis thaliana]	1,00E-31
20	ref NP_566246.1  nucleotide binding [Arabidopsis thaliana]	9,00E-14
21	gb AAM47987.1  putative protein [Arabidopsis thaliana]	4,00E-12
22	ref NP_849590.1  EMB2748 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-19
23	ref NP_922201.1  putative steroid membrane binding protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	2,00E-13

Evidências de que o processo oxidativo deve ser evitado para o sucesso da virulência do patógeno foram demonstradas no trabalho de Hassouni et al., 1999 com a enzima *peptide methionine sulfoxide reductase* (MsrA), que repara proteínas oxidadas e está presente na maioria dos organismos vivos. Nesse estudo com *Erwinia chrysanthemi*, observou-se que o mutante MsrA2 exibiu virulência reduzida em chicória em comparação ao tipo selvagem. Os autores sugerem que as plantas respondem ao patógeno virulento pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e as enzimas que reparam o dano oxidativo permitem que os patógenos virulentos sobrevivam ao ambiente da hospedeira. Os resultados dão suporte à teoria de que as ROS desempenham um papel chave na defesa da planta.

A **catalase** é uma enzima antioxidante que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, protegendo a célula dos efeitos tóxicos deste poderoso agente oxidante (Bai & Cederbaum, 2001). O dano oxidativo é expresso após o desenvolvimento de sintomas na combinação patógeno-hospedeiro. O envolvimento das enzimas antioxidantes no desenvolvimento da suscetibilidade sugere que o aumento dessas atividades interrompe os sinais gerados pelo aumento nos reativos de oxigênio (ROS), o que pode enganar as reações de defesa na planta hospedeira, resultando na reação compatível.

A N-miristilação tem funções biológicas diversas e diferentes destinações intracelulares. As quinases e outras proteínas envolvidas na sinalização transmembrânica, como subunidades de proteínas G, são substrato para este tipo de modificação pós-traducional (Jeffrey et al., 1991). Em plantas, a miristilação não é bem conhecida, apesar de ter sido isolado o gene da myristyl CoA:protein N-myristyltransferase de *Arabidopsis thaliana*. A quinase Pto de tomate, que confere resistência à *Pseudomonas syringae*, contém um sítio de miristilação em seu terminal amino. O motivo de miristilação também é encontrado em cDNAs codificadores de **acyl-Co-A synthetase** graxa de *Brassica napus* e de um gene específico de nódulo de *Alnus glutinosa* (Fulda et al. 1997; Pawlowski et al. 1997). Entretanto, ainda não foi demonstrada a relação entre estes motivos e suas funções. Recentemente foi descrito que a análise mutacional do sítio de miristilação do Pto não é requerida para conferir a resistência. Transcritos semelhantes a acyl-CoA synthetases foram isolados por *differential display* (DD) de tecidos foliares de pimenta (*Capsicum anuum*) induzidos com ácido salicílico (SA). Um dos transcritos de **acyl-CoA synthetase** putativa acumulou rapidamente em resposta a tratamento com SA e em interações tanto compatíveis quanto incompatíveis com *Xanthomonas campestris* (Lee et al., 2001).

As peroxiredoxinas são **thioredoxin-** ou **glutaredoxin-dependent peroxidases**, cuja função é destruir peróxidos. Foi demonstrado em álamo (*Populus* spp.) que a peroxiredoxin Q, é reduzida por thioredoxin, que serve como doador. Esta atividade da thioredoxin foi evidenciada em mutantes de espinafre (*Spinacia oleracea*). A expressão de peroxiredoxina é modificada em resposta à infecção por *Melampsora larici* - populina, o agente causador da ferrugem do álamo. No caso de resposta de hipersensibilidade (HR), a expressão de peroxiredoxina aumentou, enquanto que na interação compatível houve decréscimo (Rouhier et al., 2004).

O papel do SA foi estudado em folhas tabaco com interação incompatível causada por patógeno. A biosíntese do SA acumula primariamente como SA 2-O- $\beta$ -D-glucoside (SAG) e *glucosyl salicylate* (GS). A SA GTase de tabaco (**UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase**) é capaz de formar ambos SAG e GS. Foi demonstrado em bibliotecas de cDNA induzidas por SA a clonagem de um gene com especificidade ampla a fenóis simples. Análise de Northern blot demonstrou que o mRNA de GTase mRNA foi induzido tanto por SA como por patógenos incompatíveis. O rápido tempo de indução do mRNA por SA indica que o transcrito pertence aos genes de resposta precoce ao SA. A indução *in vitro* de Gtase por SA em raiz de aveia (*Avena sativa* L. cv Dal) demonstrou aumento de 23 vezes em relação ao nível constitutivo desta enzima (LeeDagger & Raskin, 1999).

A atividade da **phospholipase D** (PLD) hidrolisa lipídeos de membrana para gerar ácido fosfatídico (PA) e um grupamento de cabeça livre, sendo esta atividade é amplamente encontrada em vegetais. As PLDs compõem uma família de enzimas heterogênea com propriedades bioquímicas, regulatórias e estruturais distintas. Os mutantes dessa enzima são afetados na morte celular mediada por peróxido. Estudos indicam que a PLD tem um papel multiregulatório em diversos processos, incluindo a sinalização de ácido abscísico (ABA), morte celular programada (PCD), raiz em cabeleira, crescimento de raiz, tolerância ao frio e outras respostas aos estresses. Os resultados indicam que PLDs específicas funcionam em diferentes etapas das vias de estresse oxidativo em plantas: enquanto PLD $\alpha$ 1 promove a produção de ROS, PLD $\delta$  media as respostas da planta às ROS (Wang, 2005).

As etapas finais do síntese de ácido jasmônico (JA) é catalizada pelas três principais enzimas do ciclo de  $\beta$ -oxidação: acyl-CoA oxidase (ACX), proteína multifuncional (contendo atividades 2-*trans*-enoyl-CoA hidratase e L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) e 3-ketoacyl-CoA thiolase (KAT). Presume-se que uma atividade adicional de **thioesterase** também esteja envolvida na liberação de JA a partir de JA-CoA, o produto final da  $\beta$ -oxidação. A caracterização de um mutante de resposta a ferimento em tomate deficiente na biosíntese de JA biosynthesis demonstrou que este defeito resulta de perda de função de um membro (ACX1A) da família de enzimas ACX que participa na  $\beta$ -oxidation peroxisomal. Foi demonstrado que: ACX1A usa OPC8-CoA como substrato e que esta isoforma participa na síntese na vasta maioria dos JA induzidos em folhas feridas; o JA ou um derivado é o sinal fisiológico para a resposta de defesa induzida por ataque de inseto; experimentos de enxertia indicam que o estágio de  $\beta$ -oxidação da biosíntese de JA é requerida para a produção do sinal de ferimento transmissível. Esses resultados ressaltam a noção de que o JA é um componente essencial do sinal de longa distância para resistência induzida por herbivoria (Li et al., 2005).

As comparações dos clusters específicos de NS1 no nível de significância 0.5 do Teste de Fisher, tanto contra os grupos de raiz desafiada ou do restante do CafEST, indicaram não haver expressão estatisticamente significativa entre as bibliotecas consideradas.

## Conclusões

Do total de 154770 *reads* presentes nas 50 bibliotecas do CafEST, apenas 6483 são oriundos de raiz. A maior parte destes (76%) provém de uma biblioteca de estresse abiótico. Apenas 302 *reads* correspondem à biblioteca desafiada com nematóide, em uma interação compatível com cafeeiro suscetível. Além disso, muitos dos ESTs das bibliotecas de raiz são semelhantes a organismos não vegetais. Apesar das seqüências isoladas de planta serem fortemente relacionadas ao estresse biótico, não foi possível concluir se estes ESTs tem expressão diferencial ou específica desta biblioteca, devido a baixa representatividade dos genes amostrados. Assim, para identificar um conjunto significativo de seqüências de genes relacionados à interação planta-patógeno do cafeeiro com o nematóide, será necessária a construção de novas bibliotecas de

raiz, representando o contraste da situação desafiada com nematóide com o controle de raiz não estressada. Com o cruzamento dos dados obtidos pelas abordagens propostas, deveremos obter seqüências potencialmente utilizáveis no estudo de melhoramento do cafeeiro, bem como gerar informações para o entendimento da resistência nesta e em outras culturas.

## Referências Bibliográficas

- Bai J. & Cederbaum A.I. (2001) Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept.* 10(3-4):189-99.
- Carneiro, R.M.D.G.; Randig, O.; Almeida, M.R.A.; Gonçalves, W. (2005). Identificação e Caracterização de Espécies de Meloidogyne em Cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais Através dos Fenótipos de Esterase e SCAR-Multiplex-PCR. *Nematologia Brasileira* 29, 233-242.
- Carvalho, V.L.; Chaulfoun, S.M. Boletim Técnico no. 58, Doenças do cafeeiro: diagnose e controle. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, agosto 2000. 44 p.
- Fulda, M.; Heinz, E.; Wolter, F.P. (1997) Brassica napus cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol. Biol.* 33, 911-922.
- Gordon J.I.; Duronio, R.J.; Rudnick, D.A.; Adams S.P.; Gokel G.W. (1991) Protein N-Myristoylation *J Biol Chem.* 1991 May 15;266(14):8647-50.
- Hammond-Kosack, E.K. & Jones, D.G.J. (1997) Plant disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.* 48:575-607
- Hassouni, M.E.; Chambost, J.P.; Expert, D.; Gijsegem, F.V.; BARRAS, F. (1999) Biochemistry The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (96): 887-892.
- Hussey, R.S. and Barker, K.R. (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.
- Jenkins, W.R. (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 48:692.
- Lee, S.J.; Suh, M.C.; Kim, S.; Kwon, J.K.; Kim, M.; Paek, K.H.; Choi, D.; Kim, B.D. (2001) Molecular cloning of a novel pathogen-inducible cDNA encoding a putative acyl-CoA synthetase from *Capsicum annuum* L. *Plant Mol Biol.* Aug;46(6):661-71.
- LeeDagger, H.I. and Raskin, I. (1999) *J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 51, 36637-36642, December 17, 1999 Purification, Cloning, and Expression of a Pathogen Inducible UDP-glucose:Salicylic Acid Glucosyltransferase from Tobacco. *J Biol Chem.* 274(51):36637-42.
- Li, C.; Schillmiller, A.L.; Liu, G.; Lee, G.I.; Jayanty, S.; Sageman, C.; Vrebalov, J.; Giovannoni, J.J.; Yagi, K.; Kobayashi, Y.; Howe, G.A. (2005) Role of  $\beta$ -Oxidation in Jasmonate Biosynthesis and Systemic Wound Signaling in Tomato. *The Plant Cell* 17:971-986.
- Lordello, L.G. Nematóides das plantas cultivadas. 8ª ed. São Paulo, Brasil, Nobel. 314 p. 1976.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 23-61.
- McDowell, J.M. & Woffenden, B.J. (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology.* v.21, n.4.
- Ministério do Desenvolvimento. Cadeias que sofreriam menores ameaças com a liberalização. [http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sdp/proAcao/forCompetitividade/impZonLivComercio/11cafe\\_resumo.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sdp/proAcao/forCompetitividade/impZonLivComercio/11cafe_resumo.pdf) Acesso em: 08 dez. 2006.
- Pawlowski K.; Twigg P.; Dobritsa S.; Guan C.; Mullin B.C. (1997) A nodule-specific gene family from *Alnus glutinosa* encodes glycine- and histidine-rich proteins expressed in the early stages of actinorhizal nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 656-664.
- Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Gualberto, J.M.; Jordy, M.N.; De Fay, E.; Hirasawa, M.; Duplessis, S.; Lemaire, S.D.; Frey, P.; Martin, F.; Manieri, W.; Knaff, D.B.; Jacquot, J.P. (2004) Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. *Plant Physiology* 134(3):1027-38.
- Souza, J.C. de; Reis, P.R. Boletim Técnico no 50, Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, setembro 1997. 40 p.
- Souza, J.C. de; Reis, P.R.; Rigitano, R.L.O. Boletim Técnico no. 54, Bicho-Mineiro do Cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte, MG: EPAMIG, maio 1998. 48p.
- Vieira LGE, Andrade AC, Colombo CA, Moraes AAH, Metha A, Oliveira AC, Labate CA, Marino CL, Monteiro-Vitorello CB, Monte DC, Giglioti E, Kimura ET, Romano E, Kuramae EE, Lemos EGM, Almeida ERP, Jorge EC, Barros EVSA, da Silva FR, Vinecky F, Sawazaki HE, Dorry HFA, Carrer H, Abreu IN, Batista JAN, Teixeira JB, Kitajima JP, Xavier KG, Lima LM, Camargo LEA, Pereira LFP, Coutinho LL, Lemos MVF, Romano MR, Machado MA, Costa MMC, Grossi de Sá MF, Goldman MHS, Ferro MIT, Tinoco MLP, Oliveira MC, Sluys M-AV, Shimizu MS, Maluf MP, Eira MTS, Guerreiro Filho O, Arruda P, Mazzafera P, Mariani PDSC, Oliveira RL, Harakava R, Balbao SF, Tsai SM, Mauro SMZ, Santos SN, Siqueira WJ, Costa GGL, Formighieri EF, Carazzolle MF and Pereira GAG (2006) Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18: 95-108
- Wang, X. (2005) Regulatory Functions of Phospholipase D and Phosphatidic Acid in Plant Growth, Development, and Stress Responses. *Plant Physiol.* October; 139(2): 566-573.
- Whitehead, A.G. and Hemming J.R. (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annual Applied. Biology*, 55:25-38.

Williamson, V.M. (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:277-93.