

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERAÇÃO ENTRE CAFEEIROS SILVESTRES DE *Coffea arabica* E *Meloidogyne paranaensis*¹

Bárbhara Joana dos Reis Fatobene²; Patrícia Favoretto Renci³; Juliana Carvalho Martinati Schenk⁴; Mirian Perez Maluf⁵; Oliveira Guerreiro Filho⁶; Maria Bernadete Silvarolla⁷; Wallace Gonçalves⁸

¹ Trabalho resultante da tese de doutorado de BJR Fatobene financiado pela FAPESP.

² Bolsista do Consórcio Pesquisa Café, Dra., barbhara.fatobene@gmail.com

³ Bolsista de Pós-doutorado do PNPD/Capes, Dra., pafavo@gmail.com

⁴ Bolsista de Pós-doutorado do CNPq, Dra., julianamartinati@gmail.com

⁵ Pesquisadora, Embrapa Café, Brasília-DF, Dra., maluf@iac.sp.gov.br

⁶ Pesquisador, Instituto Agrônômico - Centro de Café 'Alcides Carvalho', Dr., oliveiro@iac.sp.gov.br

⁷ Pesquisadora, Instituto Agrônômico - Centro de Café 'Alcides Carvalho', Ms., bernadet@iac.sp.gov.br

⁸ Pesquisador, Instituto Agrônômico - Centro de Café 'Alcides Carvalho', Dr., wallace@iac.sp.gov.br

RESUMO: Fontes de resistência ao nematoide das galhas *Meloidogyne paranaensis* foram encontradas em cafeeiros silvestres de *Coffea arabica*. Esses cafeeiros resistentes representam importante fonte de variabilidade genética para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes, dada a maior facilidade de hibridação com as cultivares comerciais da espécie e a consequente transferência dos genes de resistência, assim como, à recuperação mais rápida dos caracteres agrônômicos do parental recorrente, contribuindo para abreviação do tempo e dos recursos investidos no melhoramento convencional da espécie. Com o objetivo de obter informações sobre a interação molecular entre cafeeiros silvestres de *C. arabica* e *M. paranaensis* foi realizada análise dos perfis de expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo antioxidante, à defesa de plantas a patógenos e ao ciclo celular. Os resultados da análise de expressão gênica relativa do cafeeiro IAC 2279-5B resistente a *M. paranaensis* e do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 indicam que as respostas de defesa ao nematoide estão relacionadas à via do ácido salicílico.

PALAVRAS-CHAVE: melhoramento genético do cafeeiro, nematoides das galhas, resistência genética.

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF INTERACTION BETWEEN WILD *Coffea arabica* TREES AND *Meloidogyne paranaensis*

ABSTRACT: Sources of resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne paranaensis* were identified in wild *Coffea arabica* trees. These resistant plants represent important source of genetic variability for the development of new resistant cultivars. These plants may be easily crossed with commercial cultivars to transfer resistance genes, allowing faster recovery of agronomic traits from recurrent parental, contributing to shortening the time and resources invested in the traditional coffee breeding. In order to gather information about molecular interaction between wild coffee of *C. arabica* and *M. paranaensis* we performed an analysis of expression profiles of several genes related to antioxidant metabolism, defense of plants to pathogens and cell cycle. Gene expression analysis on coffee IAC 2279-5B resistant to *M. paranaensis* and on susceptible control Mundo Novo IAC 515-20 indicated that defense response is associated with salicylic acid pathway.

KEYWORDS: coffee breeding, root-knot nematodes, genetic resistance.

INTRODUÇÃO

A agressividade de *Meloidogyne paranaensis* e sua crescente disseminação em regiões produtoras de café a colocam como séria ameaça à cultura no Brasil nos estados de São Paulo, Paraná (CAMPOS & VILLAIN, 2005) e Minas Gerais (CASTRO et al, 2008), assim como em países da América Central (VILLAIN et al., 2013).

Com exceção da cultivar IPR 100 (SERA et al., 2007) todas as cultivares registradas de *Coffea arabica* são altamente suscetíveis a *M. paranaensis*. Em áreas infestadas por nematoides dessa espécie, o cultivo de *C. arabica* só tem sido possível devido à utilização de porta-enxertos de *C. canephora* resistentes (BERTRAND et al., 2000; CAMPOS & SILVA, 2008).

Fontes de resistência a *M. paranaensis* foram encontradas em acessos silvestres de *C. arabica* oriundos da Etiópia (SILVAROLLA et al., 1998, ANZUETO et al., 2001; BOISSEAU et al., 2009; FATOBENE, 2014). Esses cafeeiros resistentes representam importante fonte de variabilidade para o desenvolvimento de novas cultivares, dada a maior facilidade de hibridação com as cultivares da espécie e a consequente transferência dos genes de resistência, assim como, à recuperação mais rápida dos caracteres agrônômicos do parental recorrente, contribuindo para abreviação do tempo e dos recursos investidos no melhoramento convencional da espécie.

Embora muitos progressos já tenham sido alcançados através dos métodos convencionais de melhoramento, deve-se salientar que o longo ciclo de vida da cultura e as diferentes formas de reprodução das espécies silvestres e comerciais de *Coffea* são fatores que dificultam o melhoramento genético do cafeeiro, tornando o processo longo e oneroso. Nesse contexto, a incorporação de técnicas biotecnológicas podem constituir valiosas ferramentas para o melhoramento das cultivares modernas, viabilizando a identificação e introdução de genes de interesse (MALUF, 2008; ALBUQUERQUE, 2009), como aqueles responsáveis pela expressão da resistência aos nematoides.

Com o objetivo de obter informações sobre a interação molecular entre cafeeiros silvestres de *C. arabica* e *M. paranaensis*, foi realizada análise dos perfis de expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo antioxidante, à defesa de plantas a patógenos e ao ciclo celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise de expressão gênica foram utilizados dois genótipos: o acesso silvestre de *C. arabica* IAC 2279-5B, classificado como resistente a *M. paranaensis* (FATOBENE, 2014) e a testemunha suscetível Mundo Novo IAC 515-20. Foram utilizadas plantas de um ano de idade, cultivadas em vasos de 500 ml em substrato composto de mistura de Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico Típico e areia 1:1 (v:v), autoclavada por 2 horas a 127 °C e fertilizada de acordo com recomendações para a cultura. As plantas foram inoculadas com 5000 juvenis de segundo estágio coletados em Funil de Baermann. A cada tempo de coleta quatro plantas foram amostradas.

Foram coletadas raízes secundárias dos tratamentos antes da inoculação (tempo 0), e nos tempos correspondentes à infecção e início da migração dos juvenis no córtex radicular (12 horas após a inoculação - hai), migração e início de estímulo dos sítios de alimentação por alguns dos juvenis (7 dias após a inoculação - dai) e quando sítios de alimentação já estavam bem estabelecidos (14 dias após a inoculação) (SEVERINO et al., 2012). As amostras foram armazenadas a -80 °C.

A extração do RNA foi realizada conforme protocolo Trizol® (*Applied Biosystems*), com a adaptação de um tampão CTAB no início da extração. O RNA foi obtido a partir de aproximadamente 2g de raízes secundárias submetidas à maceração em nitrogênio líquido. A qualidade do RNA foi avaliada em gel desnaturante de agarose [1%]. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria (OD_{220-280nm}).

Para a síntese de cDNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 RNase-Free DNase – Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Foram sintetizadas quatro alíquotas independentes de cDNA de cada planta amostrada, os quais foram misturados para a obtenção de um bulk das amostras, facilitando as análises de expressão gênica.

A seleção de genes para as análises de expressão gênica foi realizada em função de informações prévias da literatura. Genes potencialmente associados com a resistência de plantas a patógenos, com o metabolismo antioxidante e com funções do ciclo celular foram selecionados como genes candidatos para o estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos genes avaliados na interação entre cafeeiros resistente e suscetível de *Coffea arabica* inoculados com *Meloidogyne paranaensis*.

Gene	Descrição
CELL DIV	Cell division cycle protein
BETA	Beta tubulin
DNAM	DNA methyltransferase
APX	Ascorbate peroxidase
CAT	Catalase
CaPrx	Class III peroxidase
EDS1	Enhanced disease susceptibility 1
PAD4	Phytoalexin deficient 4
LTP	Lipid transfer protein [<i>Atriplex nummularia</i>]
RAR1	Required for <i>Mla12</i> resistance
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
NPR1	Non-expressor of pathogenesis related genes-1

Para a identificação de sequências gênicas homólogas em café foram realizadas buscas dirigidas no Banco de Dados do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) e no banco de dados das Solanáceas (<http://solgenomics.net/>).

As amostras de cDNA foram então submetidas às análises de expressão gênica. As condições de reações foram as mesmas descritas por ISKANDAR et al. (2004). Para uma reação com volume final de 15 µL foram utilizados 2 µL de cDNA na concentração de 1000 ng/µL, 4,6 µL de água ultra pura tratada com DEPC, 0,45 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) diluídos a 10 pmol e 7,5 µL de *SYBR green master mix* (Fermentas). O controle endógeno escolhido foi o gene que codifica GAPDH - *Desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato* por apresentar maior estabilidade dos C_T's nas amostras analisadas.

Para maior confiabilidade dos resultados todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Foram utilizadas também amostras sem adição de cDNA, como controle negativo, para detectar qualquer sinal de contaminação. Para confirmar a presença de *amplicons* únicos, os produtos do PCR foram submetidos à curva de dissociação com temperatura variando entre 60°C e 95°C. Todas as placas foram feitas em triplicatas para aumentar a precisão experimental.

Os resultados obtidos em plataforma de PCR em tempo real foram submetidos à quantificação relativa (QR), sendo que o calibrador, para todos os genes testados foi o controle suscetível antes da inoculação. As condições da reação são aquelas especificadas pelo fabricante e foram realizadas em termociclador ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystem), seguindo as etapas de configuração e ajuste de dados; eliminação de amostras (se necessário); delimitação do *Threshold* ou nível do sinal normalizado usado para determinar o C_T ; obtenção do número de ciclos limite para cada amostra (C_T); cálculo da QR de expressão; comparação dos valores de QR de cada amostra. Os resultados das QR dos genes selecionados foram analisados utilizando-se o valor de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) – ΔC_T (gene calibrador); ΔC_T (amostra) = C_T (gene alvo) – C_T (endógeno); ΔC_T (calibrador) = C_T (tempos de infecção) – C_T (endógeno).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes reguladores de funções básicas das células CELL DIV, BETA e DNAM não apresentaram expressão diferencial entre os genótipos resistente e suscetível, nem entre os tempos de coleta, com tendência de repressão entre 7 dai e 14 dai (Figura 1).

Os genes do metabolismo oxidativo APX, CAT e CaPrx apresentaram perfis de expressão distintos. APX foi reprimido no genótipo resistente a partir de 7 dai, e não apresentou alteração do perfil de expressão no genótipo suscetível. O gene CAT foi reprimido no genótipo suscetível às 12 hai, aproximando-se ao padrão observado na planta resistente. Já o gene CaPrx foi ativado às 12 hai em ambos os genótipos, sobretudo no suscetível, e posteriormente reprimido (Figura 1).

Em geral, os genes relacionados à resposta de defesa a patógenos em plantas apresentaram aumento da expressão entre 12 hai e 7 dai. Os genes EDS1 e PAD4, que atuam em conjunto no estímulo da produção de ácido salicílico e ocorrência de resposta de hipersensibilidade (FEYS et al., 2005; RIETZ, 2011) apresentaram aumento da expressão a partir das 12 hai e pico de expressão aos 7 dai. O mesmo padrão de expressão foi observado para o gene LTP, que codifica proteínas sinalizadoras auxiliando uma resposta de resistência sistêmica adquirida (SAR).

RAR1, que atua como regulador das respostas de defesa coordenando a degradação e *turnover* de proteínas envolvidas na sinalização de defesa (DICKINSON, 2003), apresentou tendência de aumento da expressão a partir de 7 dai, quando os genes de defesa começam a ser reprimidos.

O gene PAL codifica a fenilalanina amônia liase que é a primeira enzima na via de síntese do ácido salicílico a partir do ácido cinâmico (TAIZ & ZEIGER, 2004). Este gene apresentou maior expressão nos estágios precoces da infecção (12 hai) no genótipo suscetível, com posterior decréscimo até os 7 dai, enquanto que na planta resistente não foi observada alteração da expressão no decorrer da infecção dos nematoides.

NPR1 é um receptor do ácido salicílico (WU et al. 2012) e está envolvido na regulação da transcrição de inúmeros genes relacionadas à patogênese (PR) (PIETERSE et al. 1998), como os LTPs (PR-14). Também é um regulador positivo da resposta de defesa a estresses bióticos e é considerado o principal regulador da reação de defesa (BALDERAS-HERNÁNDEZ, 2013). Em nosso estudo, o gene NPR1 apresentou ativação antecipada no genótipo resistente às 12 hai.

A análise da expressão gênica de cafeeiros resistente e suscetível de *C. arabica* evidenciou que a maioria dos genes avaliados não apresentou expressão diferencial entre os genótipos resistente e suscetível inoculados com *M. paranaensis*. ALBUQUERQUE (2009) também observou que 47 genes, dos 90 que avaliou, não apresentaram alteração nos perfis de expressão durante a interação de cafeeiros resistentes e suscetíveis e *M. incognita*, e que aqueles que foram alterados sofreram ativação tanto na reação compatível como na incompatível.

A ativação e repressão gênica decorrente da interação molecular entre planta hospedeira e nematoide fazem parte de uma reprogramação geral da expressão genica da planta, necessária ao desenvolvimento dos sítios de alimentação (GHEYSEN & FENOLL, 2002).

Em ambos os genótipos não foram observadas alterações expressivas na expressão dos genes APX e CAT. Tal perfil não permite conclusões sobre a participação destes genes na resposta de defesa. A ativação de CaPrx às 12 hai, sobretudo no genótipo suscetível também observada por SEVERINO et al. (2012), pode estar relacionada à degradação do H_2O_2 , ou a uma função antagônica aos genes APX e CAT, uma vez que algumas peroxidases apoplásticas podem participar da biossíntese de espécies reativas de oxigênio (DICKINSON, 2003). Estudos abordando a atividade das enzimas do metabolismo oxidativo e quantificação de H_2O_2 nos tecidos podem ser úteis no entendimento da função destes genes na interação cafeeiros x nematoides.

Ao contrário do observado por ALBUQUERQUE (2009), houve alteração do padrão da expressão do gene PAL nos dois genótipos. Ativação do gene PAL também foi observada na interação incompatível entre soja e *M. javanica* (BENEVENTI et al., 2013). Além do papel na biossíntese de AS, ligninas e flavonoides, proteínas codificadas pelo gene PAL podem atuar como inibidores da produção e detoxificação de H_2O_2 (TAKAHAMA & ONIKI, 1997), o que pode explicar o aumento na expressão observado às 12 hai.

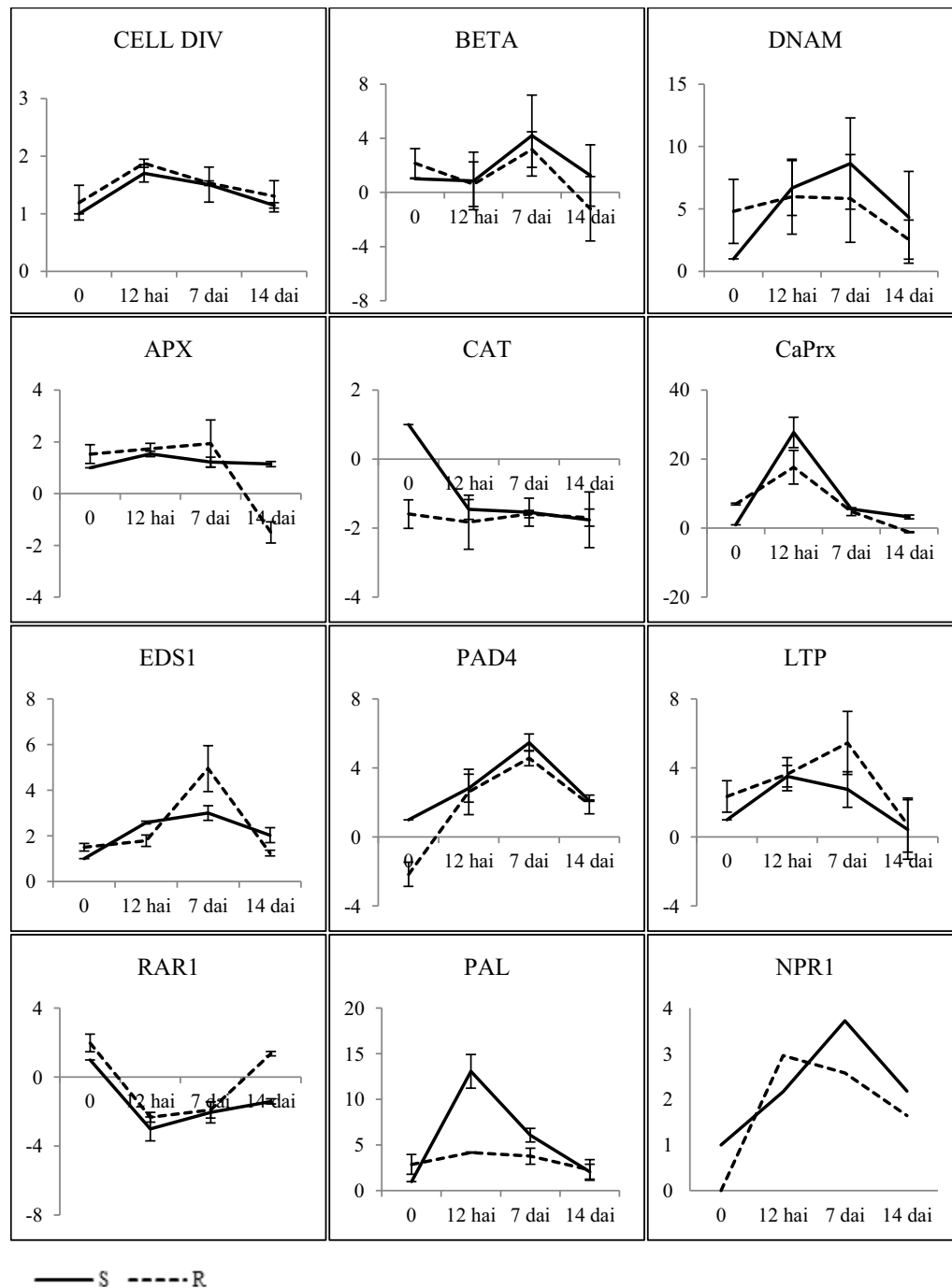


Figura 1. Expressão gênica relativa de cafeeiro silvestre de *Coffea arabica* resistente (R = IAC 2279-5B) e suscetível (S = Mundo Novo IAC 515-20) inoculados com o nematoide *Meloidogyne paranaensis*. hai= horas após a inoculação; dai= dias após a inoculação.

A ativação dos genes de defesa EDS1, PAD4, LTP e NPR1 sugere que a resposta de defesa do cafeeiro a *M. paranaensis* está relacionada à via do ácido salicílico (AS). Este fitohormônio também é um importante componente da sinalização para a resistência de tomateiros a *M. javanica* mediada pelo gene *Mi-1*, associado à resposta de hipersensibilidade (BRANCH et al., 2004). O papel do AS na sinalização da resistência também foi evidenciado em mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes no acúmulo e sinalização do AS que apresentaram aumento da suscetibilidade ao nematoide do cisto *Heterodera schachtii* (WUBBEN et al., 2008).

CONCLUSÃO

Os resultados da análise de expressão gênica relativa do cafeeiro IAC 2279-5B resistente a *M. paranaensis* e do controle suscetível Mundo Novo IAC 515-20 indicam que as respostas de defesa ao nematoide estão relacionadas à via do ácido salicílico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.V.S. **Estudo da interação entre *Coffea arabica* e o nematóide da galha *Meloidogyne incognita*: identificação da resistência e caracterização por histopatologia e genômica funcional**. 2009. 249p. Tese (Doutorado) - UFRGS.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. **Euphytica**, v.118, p.1-8, 2001.
- BALDERAS-HERNÁNDEZ, V.E.; ALVARADO-RODRÍGUEZ, M.; FRAIRE-VELÁZQUEZ, S. Conserved versatile master regulators in signalling pathways in response to stress in plants. **AoB PLANTS**, v. 5. Disponível em: <http://aobpla.oxfordjournals.org>. Acesso em 26 de Agosto de 2014.
- BENEVENTI, M.A.; SILVA JUNIOR, O.B.; SÁ, M.E.L.; FIRMINO, A.A.P.; AMORIM, R.M.S.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; SILVA, M.C.M.; SILVA, J.P.; CAMPOS, M.A.; LOPES, M.J.C.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS JR, G. GROSSI-DE-SÁ, M.F. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, v. 14:322, 2013.
- BERTRAND, B.; PEÑA DURÁN, M.X.; ANZUETO, F.; CILAS, C.; ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; ESKES, A.B. 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**, v.113, p.79-86, 2000.
- BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.38-41, 2009.
- BRANCH, C.; HWANG, C.F.; NAVARRE, D.A.; WILLIAMSON, V.M. Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 351–356, 2004.
- CAMPOS, V.P.; SILVA, J.R.C. **Management of *Meloidogyne* spp. in Coffee Plantations**. In: SOUZA, R.M. (Ed). **Plant-Parasitic Nematodes of Coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, v.1, p.149-164, 2008.
- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB International, 2005. p.529-579.
- CASTRO, J.M.C.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A.; NAVES, R.L.; ANDRADE JÚNIOR, W.C.; DUTRA, M.R.; COIMBRA, J.L.; MAXIMINIANO, C.; SILVA, J.R.C. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.56-64, 2008.
- DICKINSON, M. **Molecular Plant Pathology**. London: BIOS Scientific Publishers, p. 193-216, 2003.
- FATOBENE, B.J.R. **Seleção de cafeeiros com resistência múltipla a nematoides do gênero *Meloidogyne***. 2014. 71p. Tese (Doutorado) – Pós-graduação IAC.
- FEYS, B.J.; WIERMER, M.; BHAT, R.A.; MOISAN, L.J.; MEDINA-ESCOBAR, N.; NEU, C.; CRUZ-CABRAL, A.; PARKER, J.E. *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an enhanced disease susceptibility1 complex in plant innate immunity. **Plant Cell**, v. 17, p. 2601-2613, 2005.
- GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 191-219, 2002.
- ISKANDAR, H.M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Report**, v. 22, n. 4, p. 325–337, 2004.
- MALUF, M. P. Genomic tools for the development of engineered *Meloidogyne*-resistant coffee cultivars. In: Souza, R.M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. 1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v.1, p.191-205.
- PIETERSE, C.M.; VAN WEES, S.C.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1571–1580, 1998.
- RIETZ, S.; STAMM, A.; MALONEK, S.; WAGNER, S.; BECKER, D.; MEDINA-ESCOBAR, N.; VLOT, A.C.; FEYS, B.J.; NIEFIND, K.; PARKER, J.E. Different roles of enhanced disease susceptibility 1 (EDS1) bound to and dissociated from phytoalexin deficient 4 (PAD4) in Arabidopsis immunity. **New Phytologist**, v. 191, p. 107–119, 2011.
- SERA, G.H.; SERA, T.; ITO, D.S.; MATA, J.S.; DOI, D.S.; AZEVEDO, J.A.; RIBEIRO FILHO, C. Progenies de *Coffea arabica* IPR 100 resistentes ao nematoide *Meloidogyne paranaensis*. **Bragantia**, v.66, p.43-49, 2007.
- SEVERINO, F.E.; BRANDALISE, M.; COSTA, C.S.; WILCKEN, S.R.; MALUF, M.P.; GONÇALVES, W.; MAIA, I.G. CaPrx, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. **Plant Science**, v. 191-192, p. 35-42, 2012.

- SILVAROLLA, M. B.; GONÇALVES, W.; LIMA, M. M. A. ; GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.. Identificação de fontes de resistência a *Meloidogyne paranaensis* em germoplasma de *Coffea arabica* provenientes da Etiópia. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 21, 1998, Maringá - SP. **Resumos**, 1998. p. 56-57.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. 4, Porto Alegre: Artmed, p. 819, 2004.
- TAKAHAMA, U; ONIKI, T. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. **Physiologia Plantarum**, v. 101, p. 845-852, 1997.
- VILLAIN, L.; SARAH, J.L.; HERNÁNDEZ, A.; BERTRAND, B.; ANTHONY, F.; LASHERMES, P.; CHARMETANT, P.; ANZUETO, F.; CARNEIRO, R.M.D.G. Diversity of root-knot nematodes parasiting coffee in Central America. **Nematropica**, v. 43, p. 194-206, 2013.
- WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J.Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I.D.; DE LUCA, V.; Despres, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, v. 1, p. 639–647, 2012.
- WUBBEN, M.J.; JIN, J.; BAUM, T.J. Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent pathogenesis-related gene expression in roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, 424-432, 2008.