

HUGO AGRIPINO DE MEDEIROS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *Meloidogyne javanica* POR  
*Pochonia chlamydosporia* E *Trichoderma atroviride***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M488i  
2014  
Medeiros, Hugo Agripino de, 1983-  
Indução de resistência em tomateiro à *Meloidogyne javanica* por *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma atroviride* / Hugo Agripino de Medeiros. – Viçosa, MG, 2014.  
viii, 84f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Nematóide-das-galhas. 2. *Meloidogyne javanica*. 3. *Pochonia chlamydosporia*. 4. *Trichoderma atroviride*. 5. Nematoda. 6. Tomate - Doenças e pragas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 579.55

HUGO AGRIPINO DE MEDEIROS

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM TOMATEIRO À *Meloidogyne javanica*  
POR *Pochonia chlamydosporia* E *Trichoderma atroviride***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Doctor Scientiae

APROVADA: 19 de fevereiro de 2014

---

Fábio Nascimento Silva

---

Wânia dos Santos Neves

---

Luis Cláudio Vieira da Cunha

---

Fabício de Ávila Rodrigues  
(Coorientador)

---

Leandro Grassi de Freitas  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade e excelente infraestrutura disponibilizada para a realização do trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de estudo e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo para a realização do doutorado sanduíche;

Aos meus pais Maria de Fátima Souza de Medeiros e José Agripino de Medeiros pelo apoio incondicional durante toda a minha vida pessoal e acadêmica;

Aos professores e orientadores que auxiliaram na minha formação profissional, em especial a Leandro Grassi e Fabrício Rodrigues;

Aos professores Enrique Monte e Rosa Hermosa por terem me recebido tão gentilmente em seu laboratório no Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (Universidad de Salamanca, Espanha);

Aos colegas de laboratório, os quais foram essenciais para o desenvolvimento dos trabalhos que constituem a presente tese, em especial à Fernanda Ferreira, Diego Rodrigues, Renata Resende, Irene Carrón, Esclaudys Perez e Belén Rubio;

À Giselle Dias pelo apoio, companheirismo e amor dado a mim a todo momento;

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado no dia a dia, em especial a Roberto Ramos, Tadeu Silva e Danilo Pinho.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	vi
<b>Abstract</b> .....	viii
<b>Introdução geral</b> .....	9
<b>Referências bibliográficas</b> .....	8
<b>CAPÍTULO 1: Indução de resistência local em tomateiro ao nematoide das galhas mediada por <i>Pochonia chlamydosporia</i></b> .....	15
<b>Resumo</b> .....	16
<b>Introdução</b> .....	17
<b>Material e métodos</b> .....	20
Material vegetal .....	20
Infestação do solo com <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	20
Pulverização dos indutores de resistência .....	21
Infestação do solo com <i>M. javanica</i> .....	21
Análise enzimática e nematológica .....	21
Determinação das atividades da PFO, POX e FAL .....	22
Delineamento experimental e análise estatística .....	23
<b>Resultados</b> .....	24
Indução de resistência .....	24
Atividade das enzimas de defesa .....	26
PFO .....	26
POX .....	27
FAL .....	27
<b>Discussão</b> .....	28
<b>Referências bibliográficas</b> .....	36
<b>CAPÍTULO 2: Aspectos moleculares e herdabilidade da resistência induzida por <i>Trichoderma atroviride</i> em tomateiro ao nematoide das galhas</b> .....	46
<b>Resumo</b> .....	47
<b>Introdução</b> .....	48
<b>Material e métodos</b> .....	50
Material vegetal .....	50
Ensaio I: Indução de resistência .....	51
Ensaio II: Penetração e estádios de desenvolvimento .....	52
Análise da expressão gênica .....	53
Ensaio III: Herdabilidade da resistência induzida .....	54
<b>Resultados</b> .....	55

Ensaio I: Indução de resistência .....	55
Ensaio II. Penetração e estádios de desenvolvimento .....	56
Análises da expressão gênica .....	57
Ensaio I: Análise da rota de sinalização .....	57
Ensaio I: Análise de genes de defesa.....	58
Ensaio III: Herdabilidade da resistência induzida.....	59
Análise da resistência .....	59
Análise da rota de sinalização .....	61
Análise dos genes de defesa .....	62
Análise do fator de transcrição MYC2.....	62
<b>Discussão</b> .....	63
<b>Referências bibliográficas</b> .....	72

## RESUMO

MEDEIROS, Hugo Agripino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Indução de resistência em tomateiro à *Meloidogyne javanica* por *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma atroviride*.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Co-orientadores: Fabrício de Ávila Rodrigues e Silamar Ferraz.

A cultura do tomate apresenta grande importância a nível mundial, possuindo como um dos principais patógenos os nematoides do gênero *Meloidogyne*. O manejo químico desse patógeno é complicado além de, atualmente, serem raras e instáveis as fontes de resistência. Assim, buscando-se uma forma de resistência alternativa, a presente tese teve como objetivos: i) avaliar, por meio da atividade de enzimas de defesa, a capacidade de *Pochonia chlamydosporia* em induzir resistência local; e ii) analisar, a partir da expressão de genes de defesa, a capacidade de *Trichoderma atroviride* em desencadear resistência sistêmica e se esta pode ser herdada pela progênie. Em ambos experimentos o patossistema-alvo foi plantas de tomateiro parasitadas por *Meloidogyne javanica*. Observou-se que *P. chlamydosporia* e *T. atroviride* são capazes de causar indução de resistência local e sistêmica, respectivamente. Na indução de resistência local, *P. chlamydosporia* desencadeia a atividade diferencial das enzimas polifenoloxidase e peroxidase, resultando na diminuição do número de galhas. Entretanto, a atividade da fenilalanina amônia liase esteve reprimida, indicando que a resistência pode ser independente da ativação da rota do ácido salicílico. Adicionalmente, notou-se que a aplicação dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), metil jasmonato (MeJa) e Etefon reduz a eficiência da resistência local provocada por *P. chlamydosporia*. O fungo *T. atroviride* também apresentou a capacidade de desencadear resistência, entretanto de forma sistêmica. A partir dos resultados dos ensaios com raiz bipartida, constatou-se a atividade da rota de defesa do ácido salicílico (PR1), a qual bloqueou a sinalização via ácido jasmônico (LOX1). Ademais, os genes da peroxidase (TPX1), da NADPH oxidase (LERBOH1) e da chalcona sintase (LECHS2) apresentaram expressão diferencial ao longo do tempo, demonstrando a sua participação e importância durante a defesa induzida por *T. atroviride*. A atividade conjunta dos genes acima relacionados culminou no atraso do desenvolvimento do ciclo de *M. javanica*, bem como na formação do sítio de alimentação, fatos esses que resultaram na redução no número de galhas. A resistência induzida por *T. atroviride* foi repassada à progênie de forma mais intensa, afetando, além da formação da galha, a reprodução de *Mj*. As

características de sinalização e genes expressos foram praticamente as mesmas. A exceção fica por conta do gene LECHS2, o qual não apresentou influência na resistência das plantas F1 ao parasitismo de *M. javanica*.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Hugo Agripino de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Induced resistance in tomato to *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia* and *Trichoderma atroviride***. Adviser: Leandro Grassi de Freitas. Co-advisers: Fabrício de Ávila Rodrigues and Silamar Ferraz.

Tomato is an important vegetable crop worldwide, been the nematodes of the genus *Meloidogyne* important pathogens. Chemical control of this pathogen is complicated and the sources of resistance are rare and unstable. Thus, looking for an alternative resistance, this thesis aimed : i) to evaluate, through the activity of defense enzymes, the ability of *Pochonia chlamydosporia* to induce local resistance; and ii) analyze, through the expression of defense genes, the ability of *Trichoderma atroviride* in trigger systemic resistance and whether it can be inherited by offspring . The pathosystems used in both works were tomato roots parasitized by *Meloidogyne javanica*. Based on the results, it was observed that *P. chlamydosporia* and *T. atroviride* are able to causing local and systemic resistance, respectively. For the local resistance, *P. chlamydosporia* triggers the differential activity of polyphenol oxidase and peroxidase enzymes, resulting in decreased numbers of galls. Nevertheless, the phenylalanine ammonia lyase activity was repressed, indicating that the local resistance may be independent of the activation of salicylic acid signaling pathway. Additionally, it was observed that the application of acibenzolar-S-methyl (ASM), methyl jasmonate (MeJA) and ethephon reduces the efficiency of the local resistance caused by *P. chlamydosporia*. The fungus *T. atroviride* also showed the ability to trigger resistance, however systemically. Based on experiment results using the split root model, we found the activity of salicylic acid-mediated defense signaling (PR1), which blocked the jasmonic acid signaling pathway (LOX1). Furthermore, peroxidase (TPX1), NADPH oxidase (LERBOH1) and chalcone synthase (LECHS2) genes, showed differential expression over time, demonstrating their participation and importance on *T.atroviride*-induced resistance. The combined activity of the genes previously listed resulted in a delay on the cycle of *M. javanica*, as well as the formation of the feeding site, resulting in the reduction in the number of galls. Induced resistance by *T. atroviride* was passed on to progeny, more intensely and having almost the same characteristics signaling and gene

activity. The only exception was the LECHS2 gene, which did not influence the resistance of F1 plants to parasitism of *M. javanica*.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

---

## INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, são conhecidas mais de 4100 espécies de nematoides parasitos de plantas (15), fato que representa uma importante restrição à produção agrícola mundial. Os danos causados por nematoides têm sido estimados em \$ 157 bilhões por ano (1). No entanto, é provável que isto seja uma subestimativa da verdadeira perda, devido à falta de conhecimento dos produtores sobre nematoides e a não especificidade dos sintomas gerados por estes (32).

Dentre os nematoides de importância econômica, os nematoides das galhas (do inglês: “root-knot nematodes”) são responsáveis pelas maiores perdas a nível mundial (11, 41). Esses são incluídos dentro do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1892 (*Meloidogyne* = fêmea em forma de melão) que está composto por 98 espécies e parasitam quase todas as espécies de plantas cultivadas (32).

Os nematoides das galhas alimentam-se em células do tecido radicular das plantas, onde induzem a formação das galhas, resultado da hipertrofia e hiperplasia das células (14, 24, 57). Segundo Kaloshian et al (33), a infecção por nematoides induz à reprogramação transcricional massiva em ambas interações compatíveis e incompatíveis. Os sintomas na parte aérea das plantas não são facilmente visíveis e semelhantes àqueles produzidos por um sistema radicular danificado (57), sendo provável a ocorrência de altos níveis de infecção sem que necessariamente haja sintomas evidentes (41).

Embora existam muitas espécies descritas, apenas um pequeno conjunto dessas está amplamente disseminado, sendo *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* as espécies mais bem conhecidas e estudadas (11, 34, 57). A maioria dos estudos focados nessas quatro espécies tem sido baseada em pesquisas com tomate ou tabaco como espécies hospedeiras (41).

De acordo com Nyczepir & Thomas (51), historicamente, as práticas de controle recomendadas para áreas infestadas com *Meloidogyne* frequentemente incluíam aplicações de nematicida pré e ou pós-plantio. No entanto, em virtude de muitos dos nematicidas estarem banidos ou sendo retirados do mercado devido à problemas de impacto ambiental e de saúde humana, práticas alternativas ao controle químico estão sendo cada vez mais investigadas e implementadas (42, 50).

Fungos nematófagos são um dos potenciais microrganismos que podem ser usados no controle alternativo de nematoides. Estes fungos compreendem mais de 200 espécies, as quais compartilham a característica de parasitar nematoides (ovos, juvenis e adultos) e utilizá-los como fonte de nutrientes (67). Dependendo do modo de ação, os fungos nematófagos são divididos em quatro grupos: fungos predadores ou armadilha, fungos endoparasitas, fungos produtores de toxinas e fungos parasitas de ovos e fêmeas de nematoides (30).

*Pochonia chlamydosporia* é um importante fungo parasita de ovos de nematoides (53) e sua associação com ovos do gênero *Meloidogyne* foi relatada por diversos autores (19, 25, 44, 58, 64). A principal protease produzida por *P. chlamydosporia* é a VCP1, a qual apresenta atividade no processo de infecção promovendo a dissolução da camada proteica externa da parede de ovos de *M. incognita* (59, 60). Tikhonov et al (65) foram os primeiros a purificar e caracterizar proteína da quitinase de *P. chlamydosporia* (CHI43), a qual apresentou efeito antagônico a ovos de *Globodera pallida*. Em trabalho semelhante, Mi et al (40) clonaram o gene *pcchi4* referente à outra quitinase e observaram que este afeta a estrutura de ovos de *M. incognita*.

*Pochonia chlamydosporia* possui a capacidade de colonizar a rizosfera de muitas espécies de plantas, mesmo na ausência de nematoides (68) e de promover o

crescimento das plântulas (43). Além disso, ao colonizar o sistema radicular, o fungo induz uma resposta de defesa das plantas através da formação de papilas na parede celular, que funcionam como barreiras contra a penetração e a troca de metabólitos entre o hospedeiro e o patógeno (10).

Para a utilização de *P. chlamydosporia* no campo, os clamidósporos são o tipo de inóculo preferencial para aplicação, visto que os conídios e fragmentos de hifas possuem baixas taxas de sobrevivência no solo e são alvos de fungistase quando adicionados ao solo sem uma complementação energética (39). Alguns bioprodutos à base de isolados promissores de *P. chlamydosporia* têm sido desenvolvidos no Brasil, Cuba e Portugal, por meio de tecnologias que permitem a produção de clamidósporos em larga escala (38).

Outro gênero fúngico, *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), tem sido amplamente estudado no controle de fitopatógenos (23, 28, 29, 45). *Trichoderma* spp. são encontrados em diversos ecossistemas e são capazes de colonizar a parte aérea e as raízes, crescendo endofiticamente, bem como em resíduos de planta e matéria orgânica, atuando, assim, como saprófitas (22, 27, 46). O potencial de espécies de *Trichoderma* como agentes de biocontrole de doenças de plantas foi relatado pela primeira vez no início da década de 1930 (71) e, nos anos seguintes, o controle de várias doenças foram constatadas por diversos autores (9). Vários isolados de *Trichoderma* estão incluídos como biofungicidas em produtos para controle biológico registrados, embora muitas formulações para uso comercial contra patógenos de plantas não estejam registrados como produtos para proteção de plantas (23).

*Trichoderma* tem sido utilizado em vários estudos de controle de nematoides (2, 35, 47, 48, 61). O atributo mais importante que faz *Trichoderma* um antagonista eficaz de microrganismos contendo quitina é a sua capacidade de produzir enzimas

quitinolíticas . O aumento da atividade de protease e quitinase durante o parasitismo de ovos por *Trichoderma* spp. constitui-se no fator responsável pela redução da infestação do patógeno (61, 63).

As plantas, diferentemente de animais, não possuem sistema circulatório de defesa nem tampouco células de defesa móveis, entretanto, são capazes de estabelecer respostas ao ataque do patógeno que são altamente específicas e que frequentemente geram uma “memória” (62). Assim, as doenças de plantas têm sido consideradas como um processo coevolucionário em ecossistemas naturais, onde as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos para reconhecer e defender-se contra patógenos (49), sendo estas respostas dependentes da imunidade inata de cada célula e de sinais sistêmicos emitidos a partir dos sítios de infecção (31).

Na primeira linha de defesa da planta estão os padrões moleculares associados a patógenos ou micróbios (do inglês: “pathogen- or microbe-associated molecular patterns” - PAMPs e MAMPs, respectivamente), tais como a quitina ou flagelina, que são reconhecidos por receptores localizados na membrana (do inglês: “Pattern-recognition receptors” – PRRs). A percepção de MAMPs ou PAMPs por PRRs leva à ativação de múltiplas cascatas de sinalização (8), desencadeando a resistência denominada PTI (do inglês: “PAMP pattern-triggered immunity”) (31). Entretanto, o patógeno pode suplantar a PTI por meio da produção de proteínas efectoras (produzidas por genes *Avr*), que impedem o reconhecimento dos PAMPs e permitem que o patógeno continue a colonização do tecido.

A segunda linha de defesa da planta atua principalmente no citoplasma, onde as proteínas NB-LRR (do inglês: nucleotide-binding leucine rich repeat) são codificadas por genes de resistência da planta (R), que reconhecem proteínas efectoras codificadas pelos genes *Avr*. O reconhecimento e atenuação das proteínas *Avr* pelas proteínas R

resulta na imunidade desencadeada por efector, ETI (do inglês: effector-triggered immunity) (20). O modelo acima descrito é denominado “zig-zag”, proposto por Jones & Dangl (31), no qual os autores descrevem a interação entre as defesas da planta e sua supressão por patógenos, modelo este atualmente aceito para explicar a evolução da defesa das plantas. Adicionalmente, os autores também comentam que a resistência basal compreende a quantidade de resistência residual que é ativada por patógenos virulentos em plantas hospedeiras suscetíveis após a supressão da defesa ativa pelos efetores do patógeno.

Juntamente com a resistência genética, determinada pela presença de determinados gene (s), há outra forma de resistência em plantas, denominada resistência induzida (do inglês: “induced resistance” - IR) (70). Esta é ativada sob influência de metabólitos de patógenos e vários outros fatores bióticos e abióticos denominados elicitores, que refletem um potencial adaptativo do organismo. Vale ressaltar que a IR em plantas ativam os mesmo mecanismo de defesa que é operado na resistência determinada geneticamente (72).

De acordo com Walters et al (70), o tratamento de plantas com vários agentes, incluindo microrganismos, fragmentos da parede celular, extratos vegetais e produtos químicos sintéticos, pode induzir a resistência ao ataque de patógenos, tanto localmente quanto sistemicamente. Os mediadores mais bem conhecidos na sinalização sistêmica são os derivados oxigenados ácidos graxos (ácido jasmônico - AJ, ácido metil jasmônico e outros jasmonatos) e derivados hidróxidos do ácido benzoico, como por exemplo o ácido salicílico (AS) (16, 36, 62, 72).

Dependendo do tipo de infecção e da natureza do estresse, as plantas ativam diferentes sistemas de sinalização para promover a proteção de seus tecidos (17). Com o objetivo de alcançar o estado de estabilidade, as plantas ajustam as interações entre os

diferentes sistemas de sinalização. Isso pode ser notado nas vias do AS e AJ que são incluídas em um complexo sistema de comunicação e que são antagonistas (37).

Sabe-se há vários anos que a resistência basal em plantas pode ser potencializada por determinados fatores ambientais (4). A resistência induzida é baseada no fenômeno denominado “priming”, o qual desencadeia a resposta da resistência basal, causando uma ativação mais rápida e mais forte dessas defesas subsequentemente ao ataque do patógeno ou do inseto (13).

Em plantas sob priming, as respostas de defesa não são ativadas diretamente pelo agente desencadeador, mas são memorizadas e expressas de maneira mais rápida após a percepção de um segundo sinal biótico de estresse, processo esse que possui uma base epigenética (21, 26, 55, 69). Estudos recentes têm começado a analisar como mecanismos regulatórios epigenéticos, tais quais metilação do DNA e a remodelação da cromatina, podem influenciar na duração da expressão gênica e na imunidade da planta (6, 66).

Vários trabalhos comprovam a capacidade de *Trichoderma* spp. em induzir resistência a diversos fitopatógenos, tais como *Alternaria solani* em tomate (12, 18), *Fusarium oxysporum* em pepino e tomateiro (5, 52), *Plasmopara viticola* em videira (54, 56), *Phytophthora capsici* em pimenta (7) e *Uromyces appendiculatus* em feijoeiro (3).

Entretanto, não se dispõe de estudos sobre indução de resistência desencadeada por *P. chlamydosporia* ou *T. atroviride* ao nematoide das galhas. Assim, baseando-se no acima exposto, a presente tese possui como objetivo avaliar a inducibilidade da resposta de defesa de plantas de tomateiro, colonizadas por *P. chlamydosporia* ou *Trichoderma atroviride*, ao parasitismo de *M. javanica*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, P.; Gouzy, J.; Aury, J. M.; Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G.; Deleury, E.; Perfus-Barbeoch, L.; Anthouard, V.; Artiguenave, F.; Blok, V. C.; Caillaud, M. C.; Coutinho, P. M.; Dasilva, C.; De Luca, F.; Deau, F.; Esquibet, M.; Flutre, T.; Goldstone, J. V.; Hamamouch, N.; Hewezi, T.; Jaillon, O.; Jubin, C.; Leonetti, P.; Magliano, M.; Maier, T. R.; Markov, G. V.; McVeigh, P.; Pesole, G.; Poulain, J.; Robinson-Rechavi, M.; Sallet, E.; Segurens, B.; Steinbach, D.; Tytgat, T.; Ugarte, E.; van Ghelder, C.; Veronico, P.; Baum, T. J.; Blaxter, M.; Bleve-Zacheo, T.; Davis, E. L.; Ewbank, J. J.; Favery, B.; Grenier, E.; Henrissat, B.; Jones, J. T.; Laudet, V.; Maule, A. G.; Quesneville, H.; Rosso, M. N.; Schiex, T.; Smant, G.; Weissenbach, J.; Wincker, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915.
2. Abd-El-Fattah, A. I.; Abd-El-Khair, H.; Wafaa, M. A. E. N. 2012. Interaction of *Fusarium solani* and *Meloidogyne incognita* on sugar beet and their control using *Trichoderma viride*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 7, p. 3166-3175.
3. Abeysinghe, S. 2009. Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* RU01 against *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 37, n. 3, p. 203-207.
4. Ahmad, S.; Gordon-Weeks, R.; Pickett, J.; Ton, J. 2010. Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 6, p. 817-827.
5. Alizadeh, H.; Behboudi, K.; Ahmadzadeh, M.; Javan-Nikkhah, M.; Zamioudis, C.; Pieterse, C. M. J.; Bakker, P. A. H. M. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 14-23.
6. Alvarez, M. E.; Nota, F.; Cambiagno, D. A. 2010. Epigenetic control of plant immunity. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 563-576.
7. Bae, H.; Roberts, D. P.; Lim, H.-S.; Strem, M. D.; Park, S.-C.; Ryu, C.-M.; Melnick, R. L.; Bailey, B. A. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 628-628.
8. Balmer, D.; Planchamp, C.; Mauch-Man, B. 2013. On the move: Induced resistance in monocots. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 22, p. 695-709.
9. Benitez, T.; Rincon, A. M.; Limon, M. C.; Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260.

10. Bordallo, J. J.; Lopez-Llorca, L. V.; Jansson, H. B.; Salinnas, J.; Persmarl, L.; Asensio, L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, v. 154, p. 491-499.
11. Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G. J.; Perfus-Barbeoch, L.; Abad, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 203-220.
12. Chowdappa, P.; Mohan Kumar, S. P.; Jyothi Lakshmi, M.; Upreti, K. K. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117.
13. Conrath, U.; Beckers, G. J. M.; Flors, V.; García-Agustín, P.; Jakab, G.; Mauch, F.; Newman, M.-A.; Pieterse, C. M. J.; Poinssot, B.; Pozo, M. J.; Pugin, A.; Schaffrath, U.; Ton, J.; Wendehenne, D.; Zimmerli, L.; Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071.
14. de Almeida Engler, J.; Gheysen, G. 2013. Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 17-24.
15. Decraemer, W.; Geraert, E. 2006. Ectoparasitic nematodes. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.) **Plant Nematology**. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing. p. 153–184.
16. Dodds, P. N.; Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548.
17. Farmer, E. E.; Almeras, E.; Krishnamurthy, V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 372-378.
18. Fontenelle, A. D. B.; Guzzo, S. D.; Lucon, C. M. M.; Harakava, R. 2011. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1492-1500.
19. Freire, F. C. O.; Bridge, J. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 577-596.
20. Greenberg, J. T.; Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 201-211.
21. Gutzat, R.; Mittelsten Scheid, O. 2012. Epigenetic responses to stress: triple defense? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 5, p. 568-573.
22. Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56.

23. Hermosa, R.; Rubio, M. B.; Cardoza, R. E.; Nicolás, C.; Monte, E.; Gutiérrez, S. 2013. The contribution of Trichoderma to balance the costs of plant growth and defence. **International Microbiology**, v. 16, p. 69-80.
24. Hewezi, T.; Baum, T. J. 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 9-16.
25. Hidalgo-Diaz, L.; Bourne, J. M.; Kerry, B. R.; Rodriguez, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. **International Journal of Pest Management**, v. 46, n. 4, p. 277-284.
26. Holeski, L. M.; Jander, G.; Agrawal, A. A. 2012. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 11, p. 618-626.
27. Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma Species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10.
28. Howlett, B. J.; Brotman, Y.; Landau, U.; Cuadros-Inostroza, A.; Takayuki, T.; Fernie, A. R.; Chet, I.; Viterbo, A.; Willmitzer, L. 2013. Trichoderma-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003221.
29. Jamshidnejad, V.; Sahebani, N.; Etebarian, H. 2013. Potential biocontrol activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Trichoderma harzianum* BI against *Meloidogyne javanica* on tomato in the greenhouse and laboratory studies. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n. 13, p. 1632-1640.
30. Jansson, H. B.; Lopez-Llorca, L. V. 2001. Biology of nematophagous fungi. In: Mishra, J. D.; Horn, B. W. (Ed.) **Trichomycetes and other fungal groups: Professor Robert W. Lichtwardt commemoration volume**. Enfield: Science Publisher. p. 145-173.
31. Jones, J. D. G.; Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329.
32. Jones, J. T.; Haegeman, A.; Danchin, E. G. J.; Gaur, H. S.; Helder, J.; Jones, M. G. K.; Kikuchi, T.; Manzanilla-López, R.; Palomares-Rius, J. E.; Wesemael, W. M. L.; Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961.
33. Kaloshian, I.; Desmond, O. J.; Atamian, H. S. 2011. Disease resistance-genes and defense response during incompatible interactions. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomic and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer p. 309-324.
34. Karssen, G.; Moens, M. 2006. Root-knot Nematodes. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.) **Plant Nematology**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 59-90.

35. Khattak, B. 2008. **Biological management of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) with *Trichoderma harzianum* Rifai in tomato**. NWFP Agricultural University Peshawar, Peshawar, Pakistan. 157 pp.
36. Kumar, P. P. 2013. Regulation of biotic and abiotic stress responses by plant hormones. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 943-943.
37. Kunkel, B. N.; Brooks, D. M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 325-331.
38. Maciel, A. S.; Medeiros, H. A.; Lopes, E. A.; Ferreira, P. A. 2011. Biological control of animal-parasitic nematodes and plant-parasitic nematodes. In: Boer, F.; Chung, J. A. (Ed.) **Nematodes: Morphology, functions and management strategies**. Hauppauge: Nova Science Publishers. p. 1-58.
39. Manzanilla-Lopez, R. H.; Esteves, I.; Finetti-Sialer, M. M.; Hirsch, P. R.; Ward, E.; Devonshire, J.; Hidalgo-Diaz, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1-7.
40. Mi, Q.; Yang, J.; Ye, F.; Gan, Z.; Wu, C.; Niu, X.; Zou, C.; Zhang, K.-Q. 2010. Cloning and overexpression of *Pochonia chlamydosporia* chitinase gene *pcchi44*, a potential virulence factor in infection against nematodes. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 810-814.
41. Moens, M.; Perry, R. N.; Starr, J. L. 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 1-17.
42. Molinari, S. 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 311-323.
43. Monfort, E.; Lopez-Llorca, L. V.; Jansson, H. B.; Salinas, J.; Park, J. O.; Sivasithamparam, K. 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1229-1235.
44. Morgan-Jones, G.; Godoy, G.; Rodrigues-Kábana, R. 1981. *Verticillium chlamydosporium* parasite of *Meloidogyne arenaria* females. **Nematropica**, v. 11, n. 2, p. 115-120.
45. Mukherjee, M.; Mukherjee, P. K.; Horwitz, B. A.; Zachow, C.; Berg, G.; Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: Advances in genetics of biological control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 522-529.
46. Mukherjee, P. K.; Horwitz, B. A.; Herrera-Estrella, A.; Schmoll, M.; Kenerley, C. M. 2013. *Trichoderma* research in the genome era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 105-129.

47. Mukhtar, T.; Arshad Hussain, M.; Zameer Kayani, M. 2013. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamyosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 1, p. 66-76.
48. Naserinasab, F.; Sahebani, N.; Etebarian, H. R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato. **African Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 276-280.
49. Ni, X.; Yang, J.; Sun, S.; Yang, W. 2013. Identification and analysis of resistance-like genes in the tomato genome. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 3, p. 136-143.
50. Nicol, J. M.; Turner, S. J.; Coyne, D. L.; den Nijs, L.; Hockland, S.; Maafi, Z. T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode Interactions**. London: Springer. p. 21-43.
51. Nyczepir, A. P.; Thomas, S. H. 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing. p. 412-443.
52. Ojha, S.; Chatterjee, N. C. 2012. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzuanum*. **Journal of plant protection research**, v. 52, n. 2, p. 220-225.
53. Palma-Guerrero, J.; Gómez-Vidal, S.; Tikhonov, V. E.; Salinas, J.; Jansson, H.-B.; Lopez-Llorca, L. V. 2010. Comparative analysis of extracellular proteins from *Pochonia chlamyosporia* grown with chitosan or chitin as main carbon and nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 568-574.
54. Palmieri, M. C.; Perazzolli, M.; Matafora, V.; Moretto, M.; Bachi, A.; Pertot, I. 2012. Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 17, p. 6237-6251.
55. Pastor, V.; Luna, E.; Mauch-Mani, B.; Ton, J.; Flors, V. 2013. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46-56.
56. Perazzolli, M.; Roatti, B.; Bozza, E.; Pertot, I. 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. **Biological Control**, v. 58, n. 1, p. 74-82.
57. Perry, R. N.; Moens, M. 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer p. 3-20.
58. Ribeiro, R. C. R.; Campos, V. P. 1993. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento in vitro de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 132-139.
59. Segers, R.; Butt, T. M.; Keen, J. N.; Kerry, B. R.; Peberdy, J. F. 1995. The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamyosporium* and

Metarhizium anisopliae are serologically and functionally related. **FEMS Microbiology Letters**, v. 126, n. 3, p. 227-231.

60. Segers, R.; Butt, T. M.; Kerry, B. R.; Peberdy, F. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. **Microbiology**, v. 140, p. 2715-2723.

61. Sharon, E.; Bar-Eyal, M.; Chet, I.; Herrera-Estrella, A.; Kleifeld, O.; Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 687-693.

62. Spoel, S. H.; Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89-100.

63. Suarez, B.; Rey, M.; Castillo, P.; Monte, E.; Llobell, A. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 46-55.

64. Sun, M. H.; Gao, L.; Shi, Y. X.; Li, B. J.; Liu, X. Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, n. 1, p. 22-28.

65. Tikhonov, V. E.; Lopez-Llorca, L. V.; Salinas, J.; Jansson, H. B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamyosporium* and *V. suchlasporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 35, n. 1, p. 67-78.

66. van den Burg, H. A.; Takken, F. L. W. 2009. Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? **Trends in plant science**, v. 14, n. 5, p. 286-294.

67. Viaene, N.; Coyne, D. L.; Kerry, B. R. 2006. Biological and cultural management. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.) **Plant nematology**. Wallingford: CAB International. p. 346-369.

68. Vianene, N. M.; Abawi, G. S. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamyosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p. 85-100.

69. Walters, D. R.; Paterson, L. 2012. Parents lend a helping hand to their offspring in plant defence. **Biology Letters**, v. 8, n. 5, p. 871-873.

70. Walters, D. R.; Ratsep, J.; Havis, N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280.

71. Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v. 22, p. 837-845.

72. Zinovieva, S. V.; Vasyukova, N. I.; Udalova, Z. V.; Gerasimova, N. G. 2013. The participation of salicylic and jasmonic acids in genetic and induced resistance of tomato

to *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919). **Biology Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 297-303.

## **CAPÍTULO 1**

---

**Indução de resistência local em tomateiro ao nematoide das galhas  
mediada por *Pochonia chlamydosporia***

## RESUMO

MEDEIROS, Hugo Agripino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Indução de resistência local em tomateiro ao nematoide das galhas mediada por Pochonia chlamydosporia.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Co-orientador: Fabrício de Ávila Rodrigues e Silamar Ferraz.

No presente trabalho foi analisada, por meio da atividade de enzimas de defesa, a capacidade de *Pochonia chlamydosporia*, isolado Pc-10 (Pc), em induzir resistência local em raízes de tomateiro parasitadas por *Meloidogyne javanica* (Mj). Os tratamentos consistiram da aplicação foliar dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), metil jasmonato (MeJa) e ácido 2-cloroetil fosfônico (Etefon, Etf), isoladamente ou em combinação com Pc. Aos 27 dias após o semeio, infestou-se o solo referentes aos tratamentos com Pc com suspensão contendo 5.000 clamidósporos/g de solo. Três dias após a infestação com Pc, as plantas foram pulverizadas com os indutores ASM, MeJa e Etf, nas doses de 1,0; 0,5 e 0,5 mM, respectivamente. Às 48h após a aplicação dos indutores, infestou-se o solo com 200 juvenis de segundo estágio de Mj. As coletas de três raízes/tratamento para análise das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e fenilalanina amônia liase foram realizadas às 24, 96 e 168 horas após a infestação do solo com o patógeno. A coleta de quatro raízes/tratamento para a avaliação do número de galhas (NG) foi realizada aos 30 dias após a infestação do solo com Mj. A unidade experimental consistiu de uma planta por vaso de 2 litros. As plantas tratadas apenas com MeJa ou Pc obtiveram o menor NG, enquanto que àquelas tratadas com ASM e Etf não apresentaram redução significativa. A aplicação de Pc combinada com os demais indutores reduziu a eficiência do fungo em desencadear resistência local. A análise da atividade enzimática ao longo do tempo das enzimas polifenoloxidase e peroxidase evidenciou a influência positiva destas na resposta de defesa local, enquanto que a atividade fenilalanina amônia liase foi praticamente nula. Esse é o primeiro relato de *P. chlamydosporia* induzindo resistência a um fitopatógeno.

**Palavras-chave:** *Meloidogyne javanica*, enzimas de defesa, controle biológico, indutores de resistência, resistência local.

## INTRODUÇÃO

Os nematoides são fitopatógenos de grande importância na agricultura e seus efeitos danosos sobre as culturas têm forte impacto econômico e social (8, 69). As perdas causadas por esses organismos são estimadas em 157 milhões de dólares por ano em todo mundo (1). O gênero *Meloidogyne*, conhecido como o dos nematoides das galhas, apresenta mais de 80 espécies, sendo *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* as mais comuns e polífagas, com até 3000 espécies de plantas hospedeiras (63, 93). O ciclo de vida desse gênero é composto pelo estágio de ovo, por quatro estádios juvenis (J1 – J4) e um estágio adulto, sendo o J2 o estágio infectivo. A duração do ciclo de vida é dependente da espécie do nematoide e das condições ambientais mas, em geral, dura de três a seis semanas (13, 47).

O estágio J2 é atraído para a raiz seguindo um gradiente de exsudados e CO<sub>2</sub>, e penetra logo após a região da coifa, onde as células jovens da epiderme ainda não apresenta grande deposição de celulose e pectina em suas paredes. Uma vez no interior da raiz, o J2 migra até as células do tecido parenquimático da planta onde se estabelece, perfura a parede celular de células do parênquima e injeta, por meio do estilete, proteínas produzidas pelas suas glândulas esofágicas (74). Cinco a sete células parenquimáticas não diferenciadas se tornarão o sítio de alimentação permanente do nematoide durante o seu ciclo, sendo então denominadas células gigantes (44, 77). O primeiro sinal de indução de células gigantes é a formação de células binucleadas, que após sucessivas divisões nucleares mitóticas sem divisão celular, tornam-se células poliploides com até 100 núcleos (12, 36).

A estratégia mais utilizada para conter o parasitismo de nematoides tem sido a aplicação de nematicidas químicos. Entretanto, seu uso torna-se economicamente viável apenas em culturas de alto valor de mercado, possuindo ainda um futuro questionável

devido ao risco que apresenta à segurança ambiental (5, 69). Adicionalmente, em razão do número limitado de cultivares resistentes disponíveis e adaptadas às diversas regiões agrícolas, assim como a suplantação da resistência conferida pelo gene *Mi* no campo em condições de altas temperaturas, as possibilidades de manejo de nematoides tornaram-se reduzidas (64, 70). Dessa forma, vários grupos de pesquisa tem se empenhado em obter estratégias de manejo alternativas ao uso de nematicidas químicos, estando entre essas o uso de organismos antagonistas a nematoides (16, 39, 78).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams & Zare possui uma ampla distribuição mundial e tem sido um dos agentes de controle biológico mais estudados contra nematoides endoparasitas sedentários (23, 60, 66, 67, 98, 109, 114). Os primeiros relatos deste fungo parasitando nematoides foram realizados em ovos de *H. schachtii* (111) e *H. avenae* (48), e tem sido frequentemente associado à supressividade de solos desde então (2, 49, 114). *P. chlamydosporia* é capaz de colonizar simbioticamente a superfície do sistema radicular e de parasitar ovos e fêmeas de fitonematoides que se encontram parasitando essas raízes (109). O fácil processo de cultivo em laboratório, o acesso a isolados e a eficiência no controle de nematoides têm contribuído para utilização de *P. chlamydosporia* em controle biológico (60).

Segundo Walters et al. (105), a resistência a patógenos pode ser induzida em plantas por meio da aplicação de uma variedade de agentes bióticos e abióticos, resultando em uma resposta de amplo espectro e duração variável, possuindo no ácido salicílico (AS) e no ácido jasmônico (AJ) as moléculas-chave envolvidas na resposta de defesa. Tais moléculas desencadeiam os fenômenos da resistência sistêmica adquirida (do inglês: “Systemic Acquired Resistance” - SAR) e da resistência sistêmica induzida (do inglês: “Induced Systemic Resistance” - ISR), respectivamente (50, 51, 117). As plantas evoluíram diferentes modos de detectar e limitar a invasão de patógenos (59). O

mecanismo pelo qual a planta aumenta o seu nível de resistência, intensificando a capacidade de resposta do seu sistema de defesa no momento do reconhecimento de determinados sinais, é denominado "priming" (3, 17, 73, 86). Do ponto de vista evolutivo, a seleção natural favorece à inducibilidade, ou seja, as defesas das plantas somente serão produzidas na presença de estresse biótico, a exemplo dos patógenos (73, 90). Dessa forma, o priming configura-se como uma solução para compensar o dilema entre a ativação da defesa contra patógenos e o custo envolvido neste processo (42, 102).

Os compostos acibenzolar-S-metil, metil jasmonato e etefon são ativadores químicos que possuem a capacidade de desencadear resistência, auxiliando na resposta de defesa da planta a fitopatógenos (33, 34, 65, 71, 107). O acibenzolar-S-metil foi primeiro produto químico sintético desenvolvido como um ativador de SAR (104), sendo vendido até pouco tempo no Brasil com o nome comercial de Bion<sup>®</sup>. No entanto, embora a resistência induzida por estes agentes seja de amplo espectro e de longa duração, estes raramente impedem a infecção (103)

Paralelamente aos indutores químicos sintéticos, vários relatos existentes na literatura fundamentam a eficiência da resistência induzida por microrganismos, tais como fungos e rizobactérias, no controle de nematoides com diferentes hábitos de alimentação, à destacar: *Meloidogyne* spp. (22, 100, 101), *Pratylenchus penetrans*, *Radopholus similis* (28, 85) e *Xiphinema index* (41). Os modos de ação relacionados com o desencadeamento da resistência por agentes bióticos têm sido atribuídos, de modo geral, ao AS (19, 83), AJ e etileno (106, 110), às espécies reativas de oxigênio (100), aos compostos fenólicos e PR-proteínas (41, 115), bem como da quitinase (41, 54).

Visto a aptidão de *P. chlamydosporia* no controle de nematoides e a inexistência de trabalhos relacionados à capacidade de indução de resistência por este fungo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de *P. chlamydosporia* em limitar, via resistência induzida, o desenvolvimento de *M. javanica* no tecido radicular de tomateiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, cv. Santa Clara) foram semeadas em vasos de 2 litros contendo solo e areia (3:1) esterilizados, efetuando-se o desbaste e mantendo apenas uma planta por vaso. No momento do semeio e nas três semanas seguintes, aplicou-se 100 ml de solução nutritiva contendo, em mg/L 104,42 de  $K_2SO_4$ ; 192 de  $KCl$ ; 61 de uréia; 150,35 de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,61 de  $H_3BO_3$ ; 4,10 de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,27 de  $NH_4MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ; 6,67 de  $ZnSO_4$ ; 1,74 de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 4,08 de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  e 5,58 de EDTA bisódico.

### **Infestação do solo com *Pochonia chlamydosporia***

O isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* (Pc) foi utilizado neste estudo por ter sido selecionado em trabalhos anteriores (23, 24, 29) devido a sua capacidade de reduzir populações de nematoides e de produzir grande número de clamidósporos. Aos 27 dias após o semeio, os tratamentos referentes à Pc tiveram o solo infestado com o fungo na forma de suspensão, a fim de proporcionar a concentração final de 5.000 clamidósporos/g de solo.

### **Pulverização dos indutores de resistência**

Três dias após a aplicação de Pc, realizou-se a aplicação dos indutores de resistência acibenzolar-S-metil: ASM (Bion<sup>®</sup>, Syngenta), ácido 2-cloroetil fosfônico: Etf (Etefon, Sigma-Aldrich) e metil jasmonato: MeJa (Sigma, Aldrich) nas concentrações de 1; 0,5 e 0,5 mM, respectivamente, em um volume de 50ml/planta. Em seguida, cada planta foi coberta individualmente com saco plástico por um período de 12 horas. As plantas do tratamento controle foram pulverizadas com água destilada.

### **Infestação do solo com *M. javanica***

Dois dias após a pulverização dos indutores, realizou-se a infestação do solo com 200 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* (Mj) obtidos por meio da metodologia do Funil de Baermann (6). A população de Mj utilizada foi derivada de plantas de tomate mantidas na casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia - UFV. Aos 30 dias após a infestação do solo com Mj, realizou-se a coleta de 4 plantas/tratamento para a avaliação do número de galhas (NG).

### **Análise enzimática e nematológica**

Às 24, 96 e 168 horas após a infestação (hai) do solo com Mj, efetuaram-se as coletas de três raízes/tratamento para a realização das análises enzimáticas. Em cada coleta, as raízes foram lavadas com água para eliminar os resíduos de solo, acondicionadas cuidadosamente em papel alumínio e rapidamente depositadas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas a -80°C. Posteriormente, procedeu-se as análises das enzimas de defesa: polifenoloxidasas (PFO) (EC 1.10.3.1), peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) e fenilalanina amônia-liases (FAL) (EC 4.3.1.5).

## **Determinação das atividades da PFO, POX e FAL**

Na análise da PFO, POX e FAL em cada tempo amostrado, foram processadas as três raízes anteriormente coletadas, constituindo-se cada planta, uma repetição biológica. Para a extração da enzima PFO, o total de 1 g de raiz foi macerado em nitrogênio líquido. O pó resultante da maceração foi homogeneizado em 10 ml do tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8) contendo 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante utilizado como o extrato enzimático bruto.

A atividade da PFO foi analisada seguindo a determinação colorimétrica da oxidação de pirogalol de acordo com Kar & Mishra (46). Adicionou-se uma solução contendo 450 µL de água destilada, 250 µL do tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 6,8) e 200 µL de pirogalol (100 mM) a 40 µL extrato enzimático bruto (25 °C). Os tubos de ensaio foram cobertos com papel alumínio visando sua proteção contra a luz. Registrou-se a absorbância da purpurogalina colorida a 420 nm à cada 10 s após a adição do extrato enzimático bruto à solução do substrato, totalizando seis leituras. Utilizou-se o coeficiente de extinção de  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para calcular a atividade da PFO (14), a qual foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de purpurogalina produzida.

A atividade da POX foi determinada semelhantemente à da PFO, modificando-se para 250 µL o volume de água destilada utilizada para a solução do substrato, bem como para 30 µL o volume de extrato enzimático bruto. As médias das atividades da POX, PFO e PAL foram subtraídas dos valores encontrados nas plantas do tratamento controle, fazendo com que a atividade das enzimas esteja referenciada, em cada ponto, ao eixo das abscissas.

Para análise da FAL, macerou-se 1 g de raiz em nitrogênio líquido. Em seguida, homogeneizou-se o macerado em 25 ml de tampão borato de sódio (50 mM; pH 8,3) contendo 1% PVP (0,25 g), 0,25 ml de PMSF (1 mM), procedimento esse realizado a frio. O homogeneizado foi centrifugado a 8.000 g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e utilizado como o extrato enzimático bruto.

Adicionou-se 100 µL de extrato enzimático bruto à solução contendo 350 µL do tampão Tris-HCl (25 mM; pH 8,8) e 550 µL de L-fenilalanina (100 mM). Em seguida, incubou-se a mistura da reação em banho-maria a 40°C durante 4 h. Nas amostras controle, substituiu-se o substrato L-fenilalanina pelo tampão Tris utilizando o mesmo volume de 550 µL. A reação foi interrompida pela adição de 60 µL de HCl 6N. A absorbância dos derivados do ácido transcinâmico foi registrada após a adição do extrato enzimático bruto à mistura do substrato, sendo a leitura realizada a 290 nm. O coeficiente de extinção de  $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (119) foi utilizado para calcular a atividade da FAL, a qual foi expressa em  $\text{mol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína. Os conteúdos solúveis proteicos dos extratos foram avaliados pelo método de Warburg & Christian (108).

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (Tabela 1), sendo cada tratamento constituído por 14 repetições. Com o objetivo de eleger amostras para a análise da atividade enzimática, selecionou-se os tratamentos: Controle, Pc, Mj, Pc+Mj. Os dados da atividade enzimática referentes à PFO e POX (24 hai) foram transformados para  $\text{Log}_{10}$  visando atender a pressuposições das análises estatísticas. Os dados da PFO, POX, FAL e NG foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de

Duncan à 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA 7.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

**Tabela 1. Tratamentos aplicado às plantas de tomateiro utilizadas no ensaio de indução de resistência**

Controle (água destilada)	Pc
Mj	Pc + Mj
ASM + Mj	Pc + ASM + Mj
MeJa + Mj	Pc + MeJa + Mj
Etf + Mj	Pc + Etf + Mj

Pc: *Pochonia chlamyosporia*; Mj: *Meloidogyne javanica*; ASM: acibenzolar-S-metil; MeJa: metiljasmonato; Etf: etefon.

## RESULTADOS

### Indução de resistência

A interação entre os fatores Pc e indutores foi estatisticamente significativa, ocorrendo portanto diferenças na resistência induzida em tomateiro na combinação de diferentes indutores com Pc (Tabela 2).

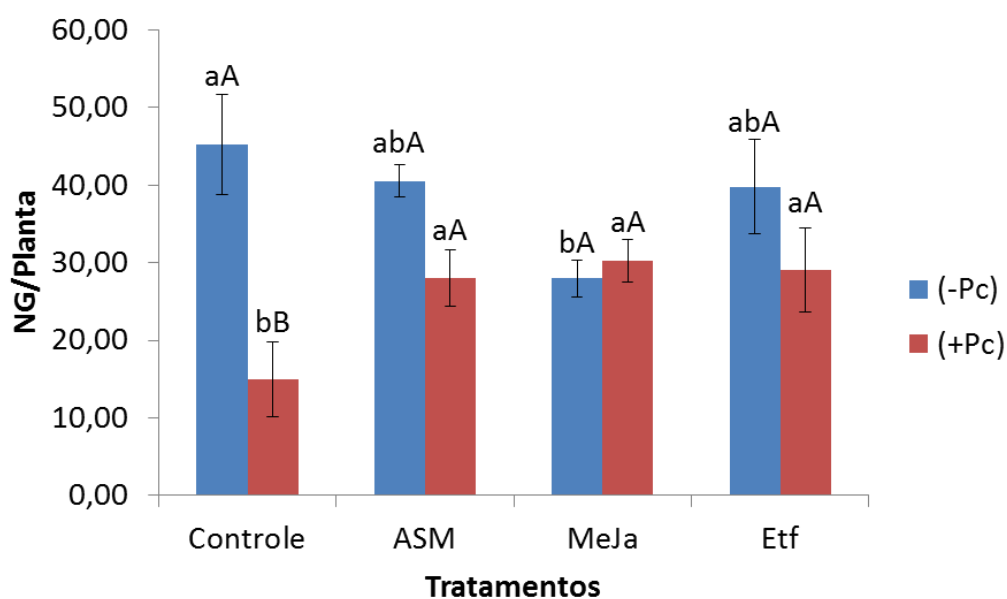
**Tabela 2: Quadro de análise de variância referente à análise do número de galhas (NG) obtidos resultantes do ensaio de indução de resistência utilizando diferentes indutores e a combinação destes com *Pochonia***

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Intercepto	1	33652,05	33652,05	335,6929	0,000000
Indutores	3	134,66	44,89	0,4478	0,721139
Pc	1	1283,36	1283,36	12,8021	0,001518
Indutores + Pc	3	920,83	306,94	3,0619	0,047428
Erro	24	2405,92	100,25		
Total	32	38396,83			

Pc: *Pochonia chlamyosporia*

Em relação à indução a partir da utilização dos elicitores químicos, observou-se que plantas pulverizadas apenas com MeJa obtiveram o menor NG, diferenciando-se do tratamento controle mas, em contrapartida, apresentando igualdade estatística com os demais elicitores. O efeito da aplicação isolada de ASM e Etf sobre o NG não apresentou diferença em relação ao controle (Figura 1).

A aplicação de Pc isoladamente reduziu o NG significativamente quando comparado aos demais tratamentos. Não obstante, a aplicação dos indutores químicos em plantas previamente colonizadas por Pc culminou na redução da eficiência do fungo em reduzir o NG (Figura 1).

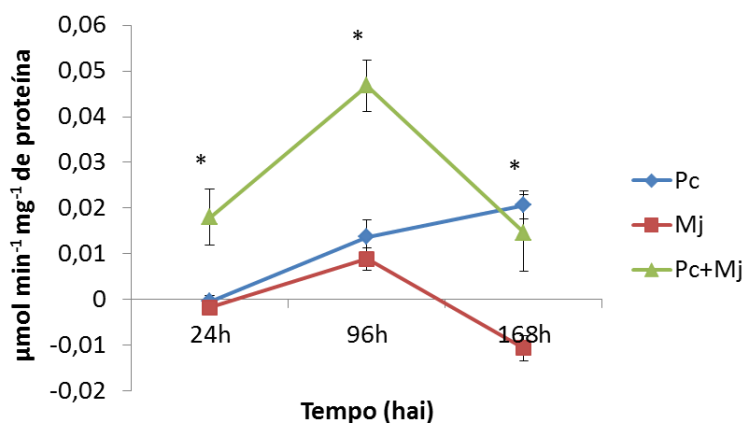


**Figura 1.** Número de galhas em tomateiro decorrente do parasitismo de *Meloidogyne javanica* (Mj) aos 30 dias após a infestação do solo com 200 juvenis de segundo estágio (J2) de Mj. NG: número de galhas; ASM: acibenzolar-S-metil; MeJa: metiljasmonato; Etf: etefon. Colunas preenchidas de azul indicam tratamentos sem *Pochonia chlamydosporia*, enquanto àquelas preenchidas de vermelho indicam tratamentos com *P. chlamydosporia*. Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Colunas seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os indutores aplicados. Colunas seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro dos tratamentos referentes a cada indutor na ausência (-PC) ou presença (+PC) de *P. chlamydosporia*. A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

## Atividade das enzimas de defesa

### PFO

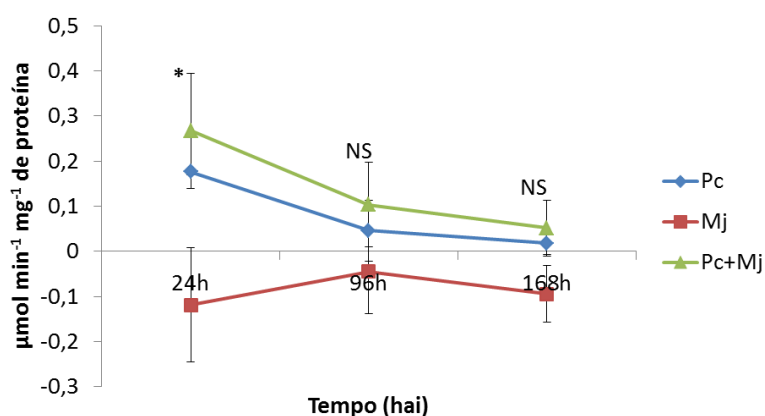
Às 24 hai, a PFO apresentou uma atividade elevada em Pc+Mj, diferenciando-se dos demais tratamentos, os quais apresentaram atividades similares às das plantas sadias (Figura 2). Às 96 hai, observa-se o aumento da atividade da PFO no tratamento Pc+Mj, enquanto que os tratamentos Pc e Mj aumentam relativamente pouco os níveis da PFO, continuando estatisticamente iguais ao controle. Em relação às 168 hai, a atividade da PFO em Pc+Mj foi reduzida quando comparada à medida anterior (96 hai), voltando ao patamar equivalente aquele observado às 24 hai. O tratamento Pc apresentou atividade estatisticamente igual à do tratamento Pc+Mj no tempo de 168 hai, enquanto que as plantas do tratamento Mj apresentam uma queda acentuada na atividade enzimática, chegando a níveis negativos (Figura 2).



**Figura 2.** Monitoramento, ao longo do tempo, da atividade enzimática da polifenoloxidase (PFO) às 24, 96 e 168 horas após a infestação (hai) do solo com 200 juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* (Mj). Os tratamentos consistiram de plantas de tomateiro em solo infestado apenas com *P. chlamydosporia* (Pc), com Mj, ou com ambos Pc e Mj. Os valores médios de atividade da PFO estão referenciados, em cada ponto, ao eixo das abscissas (valores médios do tratamento controle). Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos referentes a cada tempo de coleta. A barra em cada ponto representa o erro padrão da média.

## POX

Houve maior atividade da POX às 24 hai nos tratamentos Pc e Pc+Mj, as quais diferenciaram-se estatisticamente daquelas parasitadas apenas por Mj, destacando que neste último tratamento foi observada a repressão na atividade da referida enzima (Figura 3). Em relação ao padrão da atividade da POX nas coletas de 96 e 168 hai, estes são praticamente idênticos entre os tratamentos, não apresentando diferenças estatísticas quando comparadas às plantas saudias (Figura 3).

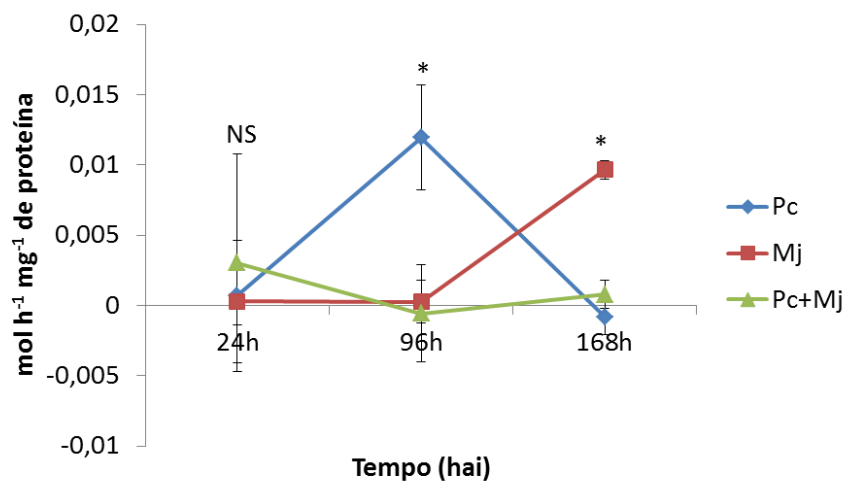


**Figura 3.** Monitoramento, ao longo do tempo, da atividade enzimática da peroxidase (POX) às 24, 96 e 168 horas após a infestação (hai) do solo com 200 juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* (Mj). Os tratamentos consistiram de plantas de tomateiro em solo infestado apenas com *P. chlamydosporia* (Pc), com Mj, ou com ambos Pc e Mj. Os valores médios de atividade da PFO estão referenciados, em cada ponto, ao eixo das abscissas (valores médios do tratamento controle). Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos referentes a cada tempo de coleta. A barra em cada ponto representa o erro padrão da média.

## FAL

A resposta da FAL, às 24 hai, foi estatisticamente igual para os tratamentos testados, sendo o seu nível de atividade próximo a zero (Figura 4). Todavia, às 96 hai, observou-se um pico na atividade da FAL nas plantas tratadas apenas com Pc. A atividade da FAL às 96h manteve-se estável e próximo a zero para os tratamentos Mj e Pc+Mj. O nível da produção da FAL às 168 hai manteve-se praticamente nulo nos tratamentos Pc

e Pc+Mj. Contudo, no tratamento Mj às 168 hai, ocorreu o aumento dos níveis dessa enzima nos tecidos radiculares (Figura 4).



**Figura 4.** Monitoramento, ao longo do tempo, da atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase (FAL) às 24, 96 e 168 horas após a infestação (hai) do solo com 200 juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* (Mj). Os tratamentos consistiram de plantas de tomateiro em solo infestado apenas com *P. chlamydosporia* (Pc), com Mj, ou com ambos Pc e Mj. Os valores médios de atividade da PFO estão referenciados, em cada ponto, ao eixo das abscissas (valores médios do tratamento controle). Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Os asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos referentes a cada tempo de coleta. A barra em cada ponto representa o erro padrão da média.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que *Pochonia chlamydosporia* (Pc) foi capaz de induzir resistência local ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* (Mj). Estudos demonstraram que indutores de AJ aplicados exogenamente desencadeiam resistência a *Meloidogyne* spp. em tomateiro (20, 33, 96, 117), soja (82) e a *Rotylenchulus reniformis* em abacaxi (86). Semelhantemente, nesse estudo, as plantas pulverizadas com MeJa apresentaram o menor NG. Os jasmonatos são derivados de moléculas de lipídeos provenientes do ácido  $\alpha$ -linolénico, sintetizadas através da rota

octadecanoide, e estão envolvidos em uma gama de processos de respostas a estresses bióticos e abióticos, bem como à resistência de plantas a insetos (79, 88). Ademais, o AJ em plantas está correlacionado com a produção de flavonoides, inibidores de proteinases, peróxido de hidrogênio, polifenoloxidasas e substâncias orgânicas voláteis com atividade antimicrobiana (33, 45, 71, 80, 95, 117), compostos estes que podem ter influenciado no ciclo de vida do nematoide nas raízes de tomateiro tecido vegetal.

Além do AJ, o AS possui um papel central na sinalização das respostas de defesa das plantas contra patógenos (99). No presente estudo, observou-se a redução não significativa do NG por meio da aplicação exógena do ASM. Embora o AS seja tipicamente ativo contra patógenos biotróficos (37), existem vários relatos contrastantes em relação à eficiência de elicitores desse hormônio na restrição da colonização do tecido vegetal pelos nematoides (15, 65, 81).

Em trabalho realizado por Sanz-Alfárez et al. (81) observou-se que a resistência não é obtida através da aplicação de elicitores do AS, sendo detectada apenas uma redução parcial do NG, fato esse ocorrido no presente estudo. Em contrapartida, Molinari & Baser (65) demonstraram que a aplicação de ácido salicílico e ASM foram eficientes como indutores de resistência em tomateiro a *M. incognita*, desde que observado o método de aplicação e a concentração do composto. Os autores dos trabalhos supracitados discutem que a eficácia dos ativadores em desencadear a resistência ao nematoide das galhas é dependente da quantidade e concentração aplicada do indutor, as quais determinam o montante do químico absorvido pela planta. Além disso, estudos demonstram a capacidade dos nematoides em suprimir a resistência (35, 112), podendo esse processo ser deferido por meio de silenciamento de genes da planta relacionados à defesa (81).

No presente trabalho, plantas tratadas com Etf, indutor de etileno, apresentaram comportamento similar às plantas tratadas com ASM. Analogamente ao AS, a discrepância da função de sinalização do etileno na resistência à doenças tem sido abordada em estudos com diferentes interações planta-patógeno (94). Em tomateiro, o etileno tem sido associado à indução de respostas de defesa do hospedeiro, bem como à promoção da doença. Porém, em relação à atividade desse hormônio volátil no desencadeamento de resistência à fitonematoides, os relatos na literatura são escassos. Recentemente, Mantelin et al. (59) constataram que a sinalização via etileno não é essencial na resistência de plantas de tomate portadoras do gene Mi mas, em compensação, contribui para a resistência basal em plantas suscetíveis. Os resultados do presente estudo comprovam a redução do NG quando aplicado Etf exogenamente mas, no entanto, tal diferença não foi significativa.

O tratamento Pc apresentou a menor média de NG, quando aplicado sozinho. Esse resultado comprova a eficiência de *P. chlamydosporia* em desencadear a resistência local em raízes de tomateiro ao parasitismo de *M. javanica*, visto que no presente estudo utilizou-se como inóculo a fase J2 do nematoide, a qual *P. chlamydosporia* não é capaz de predação (60). Além disso, o experimento teve 30 dias de duração, contados a partir da data da infestação do solo com Mj, fato esse que elimina a possibilidade de formação adicional de galhas resultantes de indivíduos provenientes da reprodução do inóculo inicial do nematoide.

Um fato interessante apontado na análise dos resultados é a redução da eficiência de PC em desencadear resistência quando da aplicação dos indutores químicos em plantas colonizadas previamente pelo fungo. Walters et al. (105) comentam que a indução de resistência configura-se como uma resistência de amplo espectro contra microrganismos e que, portanto, é razoável sugerir que isso possa

interferir com o mutualismo planta-micróbio. Ainda segundo esses autores, tomando-se como exemplo o impacto de indutores sobre a interação entre fungos e a planta, três respostas diferentes têm sido observadas: (i) a inibição da colonização das raízes (21, 32), (ii) a redução transitória da colonização (92) e (iii) a não resposta da planta à colonização do fungo (87). Portanto, a aplicação dos referidos indutores pode ter interferido no processo de colonização e estabelecimento, ou ainda no processo de desencadeamento de respostas da planta à colonização por *P. chlamydosporia*, prejudicando assim a indução de resistência a *Mj* promovida pela aplicação de *Pc* isoladamente.

Analisando-se o comportamento da atividade da PFO no tratamento *Pc+Mj* ao longo do tempo, nota-se que, às 24 hai, PFO apresenta uma maior atividade quando comparada aos demais tratamentos, os quais não diferenciam-se das plantas controle. Essa elevada atividade em *Pc+Mj* pode ter influenciado diretamente na penetração e na mobilidade do nematoide no interior da planta, visto que os componentes resultantes da atividade da PFO são altamente reativos, modificando as ligações cruzadas de vários constituintes celulares (4, 45, 56). Às 96 hai observa-se a duplicação da atividade da PFO, momento esse em que o nematoide está em pleno processo de estabelecimento do sítio de alimentação (76) e, portanto, mais suscetível ao sistema de defesa da planta devido ao seu hábito sedentário. Além de interferir com a estrutura celular, a PFO contribui para a defesa celular da planta por meio da oxidação dos compostos fenólicos e sua conversão em quinonas antimicrobianas (45, 68, 91), compostos esses tóxicos aos nematoides.

Vale destacar que, quando as plantas são tratadas apenas com *Pc* ou com *Mj* isoladamente, os níveis da PFO às 24 e 96 hai apresentaram-se no mesmo patamar das plantas sadias. Todavia, quando ambos organismos interagem com a planta de

tomateiro, ocorreu um aumento significativo da atividade desta enzima nos referidos tempos, podendo este fenômeno ser resultado de um estado de priming (17, 18) que, embora não apresente significância estatística entre os demais tratamentos, provavelmente possui papel fundamental no rápido acúmulo da referida enzima em Pc+Mj. Fato semelhante foi observado por Hao et al. (41) em relação à expressão dos genes da quitinase (CHI), shiquimate (ESPS) e integridade da membrana plasmática (HIP), em videira induzida por *Glomus intraradices* no controle de *Xiphinema index*, genes estes que só apresentaram regulação positiva na interação fungo-videira-nematoide.

Em relação às 168 hai, constatou-se a redução da atividade da PFO, da mesma forma como ocorreu no tratamento Mj, porém neste último a nível negativo. Esse comportamento pode ser reflexo da drástica alteração no padrão transcricional das plantas infectadas por *Meloidogyne* (27, 40, 76) que durante o parasitismo pode estar interferindo na atividade da PFO. Entretanto, como a atividade da enzima em plantas tratadas com Pc+Mj foi elevada, possivelmente o nematoide não conseguiu reduzi-la a ponto de torna-la nula ou negativa. Essa conclusão pode ser corroborada se compararmos o padrão da curva dos tratamentos Mj e Pc+Mj com aquele que possui apenas Pc.

A atividade da POX no tratamentos que possuíam Pc (Pc e Pc+Mj) foi elevada, diferenciando-se das plantas parasitadas apenas por Mj. Vale ressaltar que *P. chlamydosporia* induz a formação de papila na raiz durante sua interação com a planta (9, 31, 61), estrutura esta que funciona como barreira contra a penetração e a troca de metabólitos entre o hospedeiro e o patógeno, além de servir como um mecanismo de reparo da parede celular após a invasão (72), podendo esse processo conduzido pela POX (10).

Às 24 hai, observou-se uma baixa atividade da POX na raiz parasitada apenas por Mj. Este comportamento pode ser reflexo da repressão dos genes de defesa da planta referentes à POX pela ação de Mj, fato este relatado por diversos autores (7, 43, 52). Outra hipótese seria o atraso da defesa da planta resultante do não reconhecimento de Mj que é devido, pelo menos em parte, à alteração da composição da cutícula após cada ecdise. A cutícula contém proteínas denominadas lectinas, as quais ligam-se aos carboidratos do hospedeiro dificultando, assim o, reconhecimento do nematoide (25). Entretanto, até o presente momento, nenhum receptor PAMP foi identificado em plantas que estejam dirigidos a nematoides (113). Outra estratégia utilizada por *Meloidogyne* para suprimir a ação da POX é a produção da enzima peroxirredoxina, que é excretada durante a migração no tecido via poro excretor e situada por toda a periferia do corpo do nematoide quando estabelecido seu estado sedentário, protegendo-o durante o parasitismo (30).

Embora os valores da atividade da POX nos tratamentos Pc e Pc+Mj às 24 hai não diferenciem estatisticamente, pode-se inferir o efeito de priming devido ao aumento da atividade desta enzima quando na presença do nematoide. O mesmo ocorreu para as demais coletas, onde o comportamento da atividade da POX desses dois tratamentos às 96 e 168 hai são semelhantes. Ainda que não haja diferenças entre todos os tratamentos testados nas coletas de 96 e 168 hai, pode-se observar a atividade positiva da POX nos tratamentos Pc e Pc+Mj, enquanto que no tratamento Mj àquela foi sempre negativa.

Ao final, se analisarmos o comportamento da atividade enzimática da POX em plantas colonizadas por Pc e Pc+Mj, notar-se-á que as curvas são praticamente idênticas entre si e reguladas positivamente, enquanto que no tratamento Mj apresentou-se reprimida em todos os tempos, respaldando assim a mudança no padrão da atividade dessa enzima nessas interações e no desencadeamento da resistência. Devido à

complexidade das reações mediadas pela POX, efeitos adicionais sobre a produção de outros compostos de defesa podem ocorrer quando a expressão da referida enzima é alterada (89). Além disso, algumas isoformas de POX possuem a capacidade de inativar compostos derivados do nematoide, a exemplo da oxidação de toxinas e da degradação de enzimas hidrolíticas, tornando-as compostos neutros (116). Dessa forma, caso a POX induzida por *P. chlamydosporia* não esteja agindo diretamente sobre o patógeno (62), esta pode estar atuando como catalizador na produção de compostos que reforçam a parede celular tais como lignina, suberina e papilas (57, 97).

O AS é um composto fenólico que pode ser sintetizado pela planta a partir do corismato, utilizando-se duas vias distintas, as quais envolvem a isocorismato sintase e ou a fenilalanina amônia liase (99). Esse tipo de sinalização é desencadeada principalmente em interações com patógenos biotróficos (75). Observou-se que às 24 hai, atividade da FAL foi praticamente nula em todos os tratamentos, ocorrendo às 96 hai, uma elevação na atividade dessa enzima em Pc. Tal fato pode ser decorrente da resposta da planta à interação com Pc ser mediada, possivelmente, pela produção de FAL, o que limitaria a colonização de seus tecidos pelo fungo via AS. Entretanto, a planta permite a colonização das células da epiderme e do córtex (31, 58), não permitindo que o fungo atinja os vasos condutores, o que certamente o tornaria um agente patogênico.

A atividade da FAL nos tratamentos que possuíam Mj às 96 hai, foi reprimida quando comparada ao tratamento que continha apenas Pc. Esse comportamento pode estar relacionado à supressão da defesa da planta induzidas por Mj. Trabalhos recentes demonstram que *Meloidogyne* induz uma drástica alteração no padrão transcricional das plantas infectadas (27, 40, 76), inclusive com a regulação negativa de genes relacionados com a defesa da planta, estando entre estes a repressão da ativação da rota

do AS (76). Vale salientar que a resistência de tomateiros portadores do gene Mi é consequência da produção de AS, uma vez que plantas deficientes na produção desse composto foram suscetíveis ao parasitismo do nematoide (11), sendo possível restaurar a resistência a partir da aplicação exógena de benzotiadiazole (55). Dessa forma, a regulação negativa do AS pode ter auxiliado a colonização de *P. chlamydosporia* na raiz, visto que uma das formas de defesa planta, como já discutido anteriormente, é relacionada com a produção desse composto (38, 99, 118).

Às 168 hai, o nematoide está no processo final de estabelecimento do sítio de alimentação, o qual já apresenta a formação de células gigantes contendo vários núcleos, resultado de repetidas cariocineses sem citocinese (26, 53), tornando-se, portanto, mais difícil a limitação dos danos causado por esse fitopatógeno. Portanto, os resultados do presente trabalho indicam o acúmulo de FAL não participa da resposta de defesa induzida por *P. chlamydosporia* a *M. javanica*. Comportamento semelhante foi observado por Siddiqui & Shaukat (84), os quais observaram que *Pseudomonas* spp. induziram resistência contra *M. javanica* por meio de uma via de transdução de sinal, a qual é independente do acúmulo de AS nas raízes.

Esse é o primeiro relato de *P. chlamydosporia*, fungo amplamente estudado no controle de nematoides, induzindo resistência a um fitopatógeno. Parte do repertório da defesa elicitada baseia-se na atividade da polifenoloxidase e peroxidase, enzimas estas que podem contribuir pela ação direta no patógeno ou contribuindo para a formação de barreiras para o reforço da estrutura celular (45, 68). A FAL aparentemente, não atua diretamente no desencadeamento da resistência local a *M. javanica*. Dessa forma, além do parasitismo direto do fungo sobre ovos de *M. javanica*, *P. chlamydosporia* possui ainda um modo de ação adicional, o qual está relacionado com indução de resistência local e a ativação do estado de priming na planta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, P.; Gouzy, J.; Aury, J. M.; Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G.; Deleury, E.; Perfus-Barbeoch, L.; Anthouard, V.; Artiguenave, F.; Blok, V. C.; Caillaud, M. C.; Coutinho, P. M.; Dasilva, C.; De Luca, F.; Deau, F.; Esquibet, M.; Flutre, T.; Goldstone, J. V.; Hamamouch, N.; Hewezi, T.; Jaillon, O.; Jubin, C.; Leonetti, P.; Magliano, M.; Maier, T. R.; Markov, G. V.; McVeigh, P.; Pesole, G.; Poulain, J.; Robinson-Rechavi, M.; Sallet, E.; Segurens, B.; Steinbach, D.; Tytgat, T.; Ugarte, E.; van Ghelder, C.; Veronico, P.; Baum, T. J.; Blaxter, M.; Bleve-Zacheo, T.; Davis, E. L.; Ewbank, J. J.; Favery, B.; Grenier, E.; Henrissat, B.; Jones, J. T.; Laudet, V.; Maule, A. G.; Quesneville, H.; Rosso, M. N.; Schiex, T.; Smant, G.; Weissenbach, J.; Wincker, P. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915.
2. Abrantes, I.; Santos, S. A.; Bourne, J.; Ciancio, A.; Lopez-Llorca, L.; Kerry, B.; Mota, M.; Tzortzakakis, E.; Verdejo-Lucas, S. 2002. The use of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent. In: Kerry, B. R.; Bourne, J. M. (Ed.) **A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*: a potential biological control agent for root-knot nematodes** Gent: IOBC/WPRS. p. 1-12.
3. Ahmad, S.; Gordon-Weeks, R.; Pickett, J.; Ton, J. 2010. Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 6, p. 817-827.
4. Almoneafy, A. A.; Ojaghian, M. R.; Xu, S. F.; Ibrahim, M.; Xie, G. L.; Shi, Y.; Tian, W. X.; Li, B. 2013. Synergistic effect of acetyl salicylic acid and DL- $\beta$ -aminobutyric acid on biocontrol efficacy of *Bacillus* strains against tomato bacterial wilt. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 102-113.
5. Atkinson, H. J.; Lilley, C. J.; Urwin, P. E. 2012. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 251-256.
6. Baernmann, G. 1917. Eine einfache method zur auffindung con ankvlostomum (Nematoden) larven in erproben. **Ned. Indie**, v. 57, p. 131-137.
7. Beneventi, M.; da Silva, O.; de Sa, M. E.; Firmino, A. A.; de Amorim, R. M.; Albuquerque, E. V.; da Silva, M. C.; da Silva, J.; Campos, M. d. A.; Lopes, M. J.; Togawa, R.; Pappas, G.; Grossi-de-Sa, M. 2013. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1-17.
8. Bird, D. M.; Kaloshian, I. 2003. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 115-123.
9. Bordallo, J. J.; Lopez-Llorca, L. V.; Jansson, H. B.; Salinnas, J.; Persmarl, L.; Asensio, L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, v. 154, p. 491-499.

10. Botella, M. A.; Quesada, M. A.; Hasegawa, P. M.; Valpuesta, V. 1993. Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) **Plant Physiology**, v. 103, p. 665-666.
11. Branch, C.; Hwang, C. F.; Navarre, D. A.; Williamson, V. M. 2004. Salicylic acid is part of the Mi-1-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 4, p. 351-356.
12. Caillaud, M.-C.; Dubreuil, G.; Quentin, M.; Perfus-Barbeoch, L.; Lecomte, P.; de Almeida Engler, J.; Abad, P.; Rosso, M.-N.; Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 104-113.
13. Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G. J.; Perfus-Barbeoch, L.; Abad, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 203-220.
14. Chance, B.; Maehley, A. C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764-775.
15. Chinnasri, B.; Sipes, B. S. 2005. Effect of a systemic acquired resistance inducer on nematodes infecting pineapple. **Acta Horticulturae**, v. 666, p. 213-222.
16. Collange, B.; Navarrete, M.; Peyre, G.; Mateille, T.; Tchamitchian, M. 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1251-1262.
17. Conrath, U.; Beckers, G. J. M.; Flors, V.; García-Agustín, P.; Jakab, G.; Mauch, F.; Newman, M.-A.; Pieterse, C. M. J.; Poinssot, B.; Pozo, M. J.; Pugin, A.; Schaffrath, U.; Ton, J.; Wendehenne, D.; Zimmerli, L.; Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071.
18. Conrath, U.; Thulke, O.; Katz, V.; Schwindling, S.; Kohler, A. 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 113-119.
19. Contreras-Cornejo, H. A.; Macías-Rodríguez, L.; Beltrán-Peña, E.; Herrera-Estrella, A.; López-Bucio, J. 2011. Trichoderma-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 10, p. 1554-1563.
20. Cooper, W. R.; Jia, L.; Goggin, L. 2005. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1953-1967.
21. Costa, H. S.; Ríos-Ruiz, W. F.; Lambais, M. R. 2000. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 19-25.

22. Dababat, A. E. F. A.; Sikora, R. A. 2007. Induced resistance by the mutualistic endophyte, *Fusarium oxysporum* strain 162, toward *Meloidogyne incognita* on tomato. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 969-975.
23. Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L. G.; Lopes, E. A.; Pereira, O. L.; Zooca, R. J. F.; Ferraz, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, v. 42, p. 102-107.
24. Dallemole-Giaretta, R.; Freitas, L. G. d.; Caixeta, L. d. B.; Xavier, D. M.; Ferraz, S.; Fabry, C. D. F. S. 2011. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 314-321.
25. Davies, K. G.; Curtis, R. H. C. 2011. Cuticle surface coat of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 135-156.
26. de Almeida Engler, J.; Favery, B. 2011. The plant cytoskeleton remodelling in nematode induced feeding sites. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer p. 369–394.
27. de Deus Barbosa, A. E. A.; Rocha Fragoso, R.; Lima e Souza, D. d. S.; Freire, É.; Oliveira Neto, O. B.; Viana, A. A. B.; Togawa, R. C.; Guimarães, L. M.; Martins, N. F.; Cia, E.; Fernandez, D.; de Lima, L. m.; Silva, M. C. M.; Rocha, T. L.; Grossi-de-Sa, M. F. 2009. Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. **Plant Science**, v. 177, n. 5, p. 492-497.
28. de la Pena, E.; Echeverria, S. R.; van der Putten, W. H.; Freitas, H.; Moens, M. 2006. Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. **New Phytologist**, v. 169, n. 4, p. 829-840.
29. Dias-Arieira, C. R.; Santana, S. M.; Freitas, L. G.; Cunha, T. P. L.; Biela, F.; Puerari, H. H.; Chiamolera, F. M. 2011. Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). **Food, Agriculture and Environment**, v. 9, n. 3-4, p. 561-563.
30. Dubreuil, G.; Deleury, E.; Magliano, M.; Jaouannet, M.; Abad, P.; Rosso, M.-N. 2011. Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 385-396.
31. Escudero, N.; Lopez-Llorca, L. V. 2012. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Symbiosis**, v. 57, n. 1, p. 33-42.
32. Faessel, L.; Nassr, N.; Lebeau, T.; Walter, B. 2009. Chemically-induced resistance on soybean inhibits nodulation and mycorrhization. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1-2, p. 259-268.
33. Fujimoto, T.; Tomitaka, Y.; Abe, H.; Tsuda, S.; Futai, K.; Mizukubo, T. 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum*

lycopersicum) after foliar treatment with methyl jasmonate. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1084-1097.

34. Gaige, A. R.; Ayella, A.; Shuai, B. 2010. Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 5-6, p. 412-418.

35. Gheysen, G.; Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 191-219.

36. Gheysen, L.; Jones, J. T. 2006. Molecular aspects of plant-nematode interactions. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.) **Plant Nematology**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 234-254.

37. Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. 1, p. 205-227.

38. Halim, V. A.; Vess, A.; Scheel, D.; Rosahl, S. 2006. The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogen Defence. **Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 307-313.

39. Hallman, J.; Davies, K. G.; Sikora, R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p. 380-411.

40. Hamamouch, N.; Li, C.; Seo, P. J.; Park, C.-M.; Davis, E. L. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 355-364.

41. Hao, Z.; Fayolle, L.; van Tuinen, D.; Chatagnier, O.; Li, X.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. 2012. Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3657-3672.

42. Hermosa, R.; Rubio, M. B.; Cardoza, R. E.; Nicolás, C.; Monte, E.; Gutiérrez, S. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balance the costs of plant growth and defence. **International Microbiology**, v. 16, p. 69-80.

43. Hewezi, T.; Baum, T. J. 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 9-16.

44. Hussey, R. S.; Janssen, G. J. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J. L.; Cook, R.; Bridge, J. (Ed.) **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International.

45. Jaiti, F.; Verdeil, J. L.; El Hadrami, I. 2009. Effect of jasmonic acid on the induction of polyphenoloxidase and peroxidase activities in relation to date palm resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 84-90.

46. Kar, M.; Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319.

47. Karssen, G.; Moens, M. 2006. Root-knot Nematodes. In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.) **Plant Nematology**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 59-90.
48. Kerry, B. R. 1975. Fungi and the decrease of cereal-cyst nematode population in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**, v. 5, p. 353-361.
49. Kerry, B. R.; Crump, D. H.; Mullen, L. A. 1982. Studies of the cereal cereal-cyst nematode, *Heterodera avenae*, under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. **Annals of Applied Biology**, v. 100, p. 489-499.
50. Kohli, A.; Sreenivasulu, N.; Lakshmanan, P.; Kumar, P. P. 2013. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 945-957.
51. Kumar, P. P. 2013. Regulation of biotic and abiotic stress responses by plant hormones. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 943-943.
52. Kyndt, T.; Denil, S.; Haegeman, A.; Trooskens, G.; Bauters, L.; van Criekinge, W.; De Meyer, T.; Gheysen, G. 2012. Transcriptional reprogramming by root-knot and migratory nematode infection in rice. **New Phytologist**, v. 196, p. 887-900.
53. Kyndt, T.; Vieira, P.; Gheysen, G.; Almeida-Engler, J. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. **Planta**, v. 238, n. 5, p. 807-818.
54. Li, H. Y. 2005. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene *VCH3*. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 1, p. 154-163.
55. Li, Q.; Xie, Q. G.; Smith-Becker, J.; Navarre, D. A.; Kaloshian, I. 2006. Mi-1-Mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v. 19, n. 6, p. 655-664.
56. Li, S. J.; Zhu, T. H.; Sturrock, R. N. 2013. Biochemical response and induced resistance against anthracnose (*Colletotrichum camelliae*) of camellia (*Camellia pitardii*) by chitosan oligosaccharide application. **Forest Pathology**, v. 43, p. 67-76.
57. Lucena, M. A.; Romero-Aranda, R.; Mercado, J. A.; Cuartero, J.; Valpuesta, V.; Quesada, M. A. 2003. Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 3, p. 422-429.
58. Macia-Vicente, J. G.; Jansson, H. B.; Talbot, N. J.; Lopez-Llorca, L. V. 2009. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 213-228.
59. Mantelin, S.; Bhattarai, K. K.; Jhaveri, T. Z.; Kaloshian, I. 2013. Mi-1-mediated resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato may not rely on ethylene but hormone perception through ETR3 participates in limiting nematode infection in a susceptible host. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1-8.

60. Manzanilla-Lopez, R. H.; Esteves, I.; Finetti-Sialer, M. M.; Hirsch, P. R.; Ward, E.; Devonshire, J.; Hidalgo-Diaz, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1-7.
61. Manzanilla-López, R. H.; Esteves, I.; Powers, S. J.; Kerry, B. R. 2011. Effects of crop plants on abundance of *Pochonia chlamydosporia* and other fungal parasites of root-knot and potato cyst nematodes. **Annals of Applied Biology**, v. 159, n. 1, p. 118-129.
62. Melillo, M. T.; Leonetti, P.; Bongiovanni, M.; Castagnone-Sereno, P.; Blevè-Zacheo, T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, v. 170, n. 3, p. 501-512.
63. Moens, M.; Perry, R. N.; Starr, J. L. 2009. Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 1-17.
64. Molinari, S. 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 311-323.
65. Molinari, S.; Baser, N. 2010. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, v. 29, n. 11, p. 1354-1362.
66. Moosavi, M.-R.; Zare, R.; Zamanizadeh, H.-R.; Fatemy, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 2, p. 125-133.
67. Muthulakshmi, M.; Kumar, S.; Subramanian, S.; Anita, B. 2012. Compatibility of *Pochonia chlamydosporia* with other biocontrol agents and carbofuran. **Journal of Biopesticides**, v. 5 p. 243 -245.
68. Ngadze, E.; Icishahayo, D.; Coutinho, T. A.; van der Waals, J. E. 2012. Role of Polyphenol Oxidase, Peroxidase, Phenylalanine Ammonia Lyase, Chlorogenic Acid, and Total Soluble Phenols in Resistance of Potatoes to Soft Rot. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 186-192.
69. Nicol, J. M.; Turner, S. J.; Coyne, D. L.; den Nijs, L.; Hockland, S.; Maafi, Z. T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer. p. 21-43.
70. Nyczepir, A. P.; Thomas, S. H. 2009. Current and future management strategies in Intensive crop production systems. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing. p. 412-443.
71. Orozco-Cardenas, M. L. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell Online**, v. 13, n. 1, p. 179-191.

72. Pascholati, F. S. 2011. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. v. 1, Piracicaba-SP: Agronômica Ceres.
73. Pastor, V.; Luna, E.; Mauch-Mani, B.; Ton, J.; Flors, V. 2013. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46-56.
74. Perry, R. N.; Moens, M. 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer p. 3-20.
75. Pieterse, C. M. J.; Van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; Van Wees, S. C. M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 489-521.
76. Portillo, M.; Cabrera, J.; Lindsey, K.; Topping, J.; Andrés, M. F.; Emiliozzi, M.; Oliveros, J. C.; García-Casado, G.; Solano, R.; Koltai, H.; Resnick, N.; Fenoll, C.; Escobar, C. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with Arabidopsis: a functional role for gene repression. **New Phytologist**, v. 197, n. 4, p. 1276-1290.
77. Quentin, M.; Abad, P.; Favery, B. 2013. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-7.
78. Radwan, M. A.; Farrag, S. A. A.; Abu-Elamayem, M. M.; Ahmed, N. S. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied Soil Ecology**, v. 56, p. 58-62.
79. Robert-Seilaniantz, A.; Grant, M.; Jones, J. D. G. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 317-343.
80. Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 112-121.
81. Sanz-Alférez, S.; Mateos, B.; Alvarado, R.; Sánchez, M. 2008. SAR induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, n. 4, p. 417-425.
82. Shimizu, M. M.; Mazzafera, P. 2007. Polyphenoloxidase is induced by methyljasmonate and *Meloidogyne javanica* in soybean roots but is not involved in resistance. **Nematology**, v. 9, n. 5, p. 625-634.
83. Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. S. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of systemic resistance in tomato against root-knot nematode. **Plant Pathology Journal**, v. 4, n. 1, p. 21-25.
84. Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 1, p. 48-54.

85. Sikora, R. A.; Pocasangre, L.; Felde, A. z.; Niere, B.; Vu, T. T.; Dababat, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 15-23.
86. Soler, A.; Marie-Alphonsine, P.-A.; Corbion, C.; Quénehervé, P. 2013. Differential response of two pineapple cultivars (*Ananas comosus* (L.) Merr.) to SAR and ISR inducers against the nematode *Rotylenchulus reniformis*. **Crop Protection**, v. 54, p. 48-54.
87. Sonnemann, I.; Finkhaeuser, K.; Wolters, V. 2002. Does induced resistance in plants affect the belowground community? **Applied Soil Ecology**, v. 21, n. 2, p. 179-185.
88. Sun, J. Q.; Jiang, H. L.; Li, C. Y. 2011. Systemin/jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. **Molecular Plant**, v. 4, n. 4, p. 607-615.
89. Suzuki, H.; Dowd, P. F.; Johnson, E. T.; Hum-Musser, S. M.; Musser, R. O. 2012. Effects of elevated peroxidase levels and corn earworm feeding on gene expression in tomato. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 10, p. 1247-1263.
90. Thaler, J. S.; Humphrey, P. T.; Whiteman, N. K. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 260-270
91. Thipyapong, P.; Hunt, M. D.; Steffens, J. C. 2004. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 105-117.
92. Tosi, L.; Zizzerini, A. 2000. Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 8, p. 735-744.
93. Trudgill, D. L.; Blok, V. C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 53-77.
94. van Loon, L. C.; Geraats, B. P. J.; Linthorst, H. J. M. 2006. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 4, p. 184-191.
95. van Poecke, R. M.; Dicke, M. 2004. Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 387-401.
96. Vasyukova, N. I.; Zinovieva, S. V.; Udalova, Z. V.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskoykaya, O. L.; Sonin, M. D. 2009. Jasmonic acid and tomato resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Doklady Biological Sciences**, v. 428, n. 1, p. 448-450.
97. Vercauteren, I.; Van Der Schueren, E.; Van Montagu, M.; Gheysen, G. 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 288-299.

98. Vieira dos Santos, M. C.; Esteves, I.; Abrantes, I. 2012. In vitro water stress bioassays with the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*: Effects on growth and parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 3, p. 310-319.
99. Vlot, A. C.; Dempsey, D. M. A.; Klessig, D. F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, n. 1, p. 177-206.
100. Vos, C.; Schouteden, N.; van Tuinen, D.; Chatagnier, O.; Elsen, A.; De Waele, D.; Panis, B.; Gianinazzi-Pearson, V. 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 60, p. 45-54.
101. Vos, C. M.; Tesfahun, A. N.; Panis, B.; De Waele, D.; Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 1-6.
102. Walters, D.; Heil, M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 1-3, p. 3-17.
103. Walters, D.; Walsh, D.; Newton, A.; Lyon, G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, v. 95, n. 12, p. 1368-1373.
104. Walters, D. R.; Newton, A. C.; Lyon, G. D. 2005. Induced resistance: Helping plants to help themselves. **Biologist**, v. 52, p. 28-33.
105. Walters, D. R.; Ratsep, J.; Havis, N. D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280.
106. Wang, F.; Cui, X.; Sun, Y.; Dong, C.-H. 2013. Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 1099-1109.
107. Wang, Y.-Y.; Li, B.-Q.; Qin, G.-Z.; Li, L.; Tian, S.-P. 2011. Defense response of tomato fruit at different maturity stages to salicylic acid and ethephon. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 2, p. 183-188.
108. Warburg, O.; Christian, W. 1941. Isohering und kristallisation des gōrungs fermerts enolase. **Biochemistry Zoology**, v. 310, p. 384-421.
109. Ward, E.; Kerry, B. R.; Manzanilla-Lopez, R. H.; Mutua, G.; Devonshire, J.; Kimenju, J.; Hirsch, P. R. 2012. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35657.
110. Wasternack, C.; Stenzel, I.; Hause, B.; Hause, G.; Kutter, C.; Maucher, H.; Neumerkel, J.; Feussner, I.; Miersch, O. 2006. The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 297-306.

111. Willcox, J.; Tribe, H. T. 1974. Fungus parasitism in cysts of Heterodera. I preliminary investigations. **Transactions of British Mycological Society**, v. 62, n. 3, p. 585-594.
112. Williamson, V. M.; Gleason, C. A. 2003. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 4, p. 327-333.
113. Wondafrash, M.; Van Dam, N. M.; Tytgat, T. O. G. 2013. Plant systemic induced responses mediate interactions between root parasitic nematodes and aboveground herbivorous insects. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-15.
114. Yang, J. I.; Loffredo, A.; Borneman, J.; Becker, J. O. 2012. Biocontrol efficacy among strains of *Pochonia chlamydosporia* obtained from a root-knot nematode suppressive soil. **Journal of Nematology**, v. 44, n. 1, p. 67-71.
115. Yedidia, I.; Shores, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7343-7353.
116. Zinoveva, S. V.; Vasyukova, N. I.; Ozeretskovskaya, O. L. 2004. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 111-119.
117. Zinovieva, S. V.; Vasyukova, N. I.; Udalova, Z. V.; Gerasimova, N. G. 2013. The participation of salicylic and jasmonic acids in genetic and induced resistance of tomato to *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919). **Biology Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 297-303.
118. Zinovieva, S. V.; Vasyukova, N. I.; Udalova, Z. V.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskovskaya, O. L. 2011. Involvement of salicylic acid in induction of nematode resistance in plants. **Biology Bulletin**, v. 38, n. 5, p. 453-458.
119. Zucker, M. I. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. . **Plant Physiology**, v. 40, p. 779-784.

## **CAPÍTULO 2**

---

**Aspectos moleculares e herdabilidade da resistência induzida por *Trichoderma atroviride* em tomateiro ao nematoide das galhas**

## RESUMO

MEDEIROS, Hugo Agripino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Aspectos moleculares e herdabilidade da resistência induzida por *Trichoderma atroviride* em tomateiro ao nematoide das galhas.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

No presente estudo foi avaliada a capacidade de *Trichoderma atroviride* T11 (Ta) em desencadear resistência sistêmica a *Meloidogyne javanica* (Mj) em plantas de tomateiro, utilizando o sistema de raiz bipartida. Desenvolveram-se três ensaios sendo, o ensaio I avaliou a resistência e a expressão dos genes PR1, LOX1, TPX1, LERBOH1 e LECHS2 ao longo do tempo na interação tomateiro-Ta-Mj. O ensaio II analisou o número total de nematoides na raiz (NTNR) e os estádios de desenvolvimento destes. Por fim, o ensaio III teve como escopo avaliar, a partir do plantio de sementes derivadas das plantas do ensaio I, a herdabilidade da resistência induzida por Ta. Com base nos resultados, pode-se concluir que Ta induz resistência sistêmica à Mj em plantas de tomateiro por meio da via do ácido salicílico, tendo como um dos fatores determinantes a produção de lignina, espécies reativas de oxigênio e fitoalexinas. Tais fatores tiveram efeito principalmente no desenvolvimento do ciclo de vida e do sítio de alimentação do nematoide, resultando na manutenção de estádios mais jovens de Mj e conseqüentemente na redução do número de galhas (NG). Porém, a indução de resistência, no ensaio I, não interferiu na reprodução de Mj. A resistência induzida por Ta foi herdada pela progênie e esta apresentou a ativação da mesma rota sinalizadora que às plantas parentais, entretanto de forma mais intensa, o que resultou na redução do NG e interferiu na reprodução de Mj, diminuindo o número de massas de ovos (NMO). Os genes TPX1 e LERBOH1 apresentaram expressão elevada, enquanto que LECHS2 não participou do desencadeamento da resistência. Esse é o primeiro relato de *Trichoderma* induzindo resistência a um nematoide fitoparasita, bem como a aquisição da resistência induzida por esse referido fungo pela progênie de plantas de tomateiro.

**Palavras-chave:** *Meloidogyne javanica*, expressão de genes de defesa, mecanismos epigenéticos, herdabilidade, priming.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Meloidogyne* Göldi, compreende um grupo de parasitas obrigatórios de plantas altamente polípagos, amplamente distribuído e responsável por perdas significativas na agricultura mundial (50, 66, 73). No entanto, é geralmente admitido que quatro espécies principais *Meloidogyne* incognita, *M. arenaria*, *M. javanica* e *M. hapla*, bem como algumas espécies emergentes como *M. enterolobii* Yang & Eisenback e *M. chitwoodi* Golden et al., são responsáveis pela maioria dos danos causados às culturas (17).

As espécies do gênero *Meloidogyne*, vulgarmente denominado como nematoide das galhas, alimentam-se em células parenquimáticas radiculares, nas quais estabelecem seu sítio de alimentação por meio da indução de repetidas cariocineses sem que haja citocineses, tornando-as multinucleadas. Na sequência, ocorre hiperplasia e hipertrofia das células que levarão à formação do sintoma típico de galhas (16, 23, 58). Estas modificações são mediadas, pelo menos em parte, por meio de secreções do estilete, as quais são produzidas pelas glândulas esofágicas do nematoide (42, 81). Estas glândulas liberam moléculas denominadas efetores, que possuem como funções bloquear o sistema de defesa da planta, bem como modificar a célula do hospedeiro, tornando-a uma fonte permanente de alimento (34, 46, 65).

O manejo de nematoides constitui uma tarefa difícil e tem sido baseado, nos últimos 50 anos, na aplicação de nematicidas químicos. Entretanto, apesar desses nematicidas serem moderadamente eficientes, seu uso tem sido questionado devido à crescente preocupação referente à contaminação ambiental e riscos à saúde humana, bem como ao alto custo de aplicação (67, 73, 74). Dessa forma, estudos sobre o uso de microrganismos antagonistas estão recebendo atenção cada vez maior (26, 36, 73),

sendo os fungos organismos particularmente interessantes para o manejo de nematoides (100).

O fungo *Trichoderma* tem sido amplamente estudado no controle de fitopatógenos e, dentre estes, nematoides (2, 30, 54, 72, 85, 89, 92, 95, 102). Os mecanismos de parasitismo, antibiose e competição de *Trichoderma* spp. tem sido explorados em diversos trabalhos (22, 91) e, segundo Szabó et al. (102), mais de 100 diferentes metabólitos com atividade antimicrobiana tem sido descritos, estando incluídas várias enzimas degradadora de parede celular (glucanases, quitinase, proteases e lipases).

Além da ação direta do fungo sobre fitopatógenos, *Trichoderma* também é capaz de induzir, durante a interação com a planta, uma intensa resposta de defesa desta contra organismos invasores (10, 39, 61, 71, 97). A resistência desencadeada por *Trichoderma* é resultante da produção de uma variedade de padrões moleculares associados a micróbios, MAMPs a exemplo da hidrofobina SM1 (24, 25), da xilanase Xyn2/Eix (83) e da endopoligalacturonase ThPG1 (69). Esses MAMPs atuam estimulando diversos tipos de defesa na planta, tais como a imunidade desencadeada por micróbios (MAMP-triggered immunity, MTI)(59).

A resistência induzida por *Trichoderma* em diferentes interações envolve vários aspectos, destacando-se entre eles a ativação de diferentes componentes de defesa da planta, à citar: ácido salicílico (AS) (19, 63, 86, 87, 105), ácido jasmônico (AJ) e etileno (56, 77, 88), quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase (93, 109), peroxidase (87, 93), bem como o acúmulo de fitoalexinas (19, 86, 114).

Nos últimos anos, a indução de defesa sistêmica a fitonematoides, promovida por diferentes organismos a partir da colonização das raízes, tem sido relatada em várias culturas, incluindo *Xiphinema index* em videira (38), *Pratylenchus coffeae* e

*Radopholus similis* em bananeira (27) e *Meloidogyne* spp. em tomateiro (53, 94, 112). Entretanto, não se dispõe de dados na literatura sobre resistência desencadeada por *Trichoderma* ao nematoide das galhas, sendo esse aspecto importante para o entendimento da relação nematoide-planta-fungo e para a implantação de uma nova estratégia de manejo com a otimização da aplicação do biocontrolador.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de indução de resistência sistêmica de *Trichoderma atroviride* em tomateiro a *Meloidogyne javanica*, assim como a herdabilidade da resistência induzida na progênie das plantas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho consistiu de três ensaios individuais nos quais: ensaio I consistiu em avaliar o nível de doença da planta, a reprodução de Mj e a expressão de genes relacionados com a sinalização/defesa da planta. Em seguida, para complementar o ensaio I, elaborou-se o ensaio II com o intuito de mensurar a penetração e o desenvolvimento do nematoide no tecido hospedeiro. Por fim, para a montagem do ensaio III, foi realizada a partir da coleta e plantio das sementes de todos os tratamentos do ensaio I, com o escopo de avaliar a herdabilidade da resistência induzida. Abaixo, seguem em detalhes os procedimentos adotados nos ensaios supracitados.

### **Material vegetal**

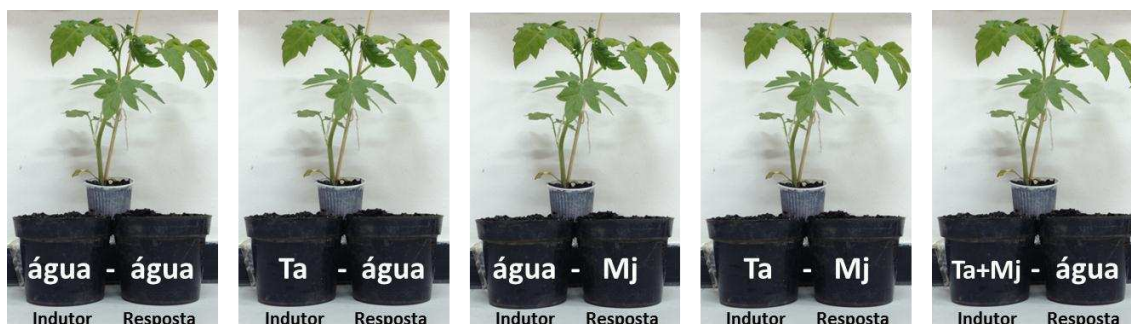
No ensaio I, foram utilizadas sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Marmande). Procedeu-se a desinfestação destas imergindo-as em solução de etanol a 70% sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o etanol e adicionou-se uma solução de hipoclorito de sódio a 50%, submetendo-se novamente à agitação durante 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, descartou-se a solução de hipoclorito

e realizou-se a lavagem das sementes por três vezes com água destilada esterilizada. Por fim, as sementes foram armazenadas a 4°C, por 12 h, em tubo de ensaio contendo água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram semeadas em vasos de 1/2 litro contendo substrato organomineral Tref<sup>®</sup> previamente autoclavado por 2 vezes à 121°C.

Foram utilizadas plantas de tomateiro de cinco semanas transplantadas sob o sistema de raiz bipartida, como descrito por Moreno et al. (70), sendo cada porção da raiz depositada em um vaso de 1/2 litro, contendo substrato Tref<sup>®</sup> e vermiculita, na proporção 3:1 previamente autoclavado por duas vezes a 121°C.

### **Ensaio I: Indução de resistência**

O substrato em torno de uma das porções das raízes, de acordo com o tratamento, foi infestado uma semana após o transplante pela deposição de 1 mL da suspensão de  $10^7 \text{ml}^{-1}$  esporos de *T. atroviride* T11 (Ta). Cinco dias após a infestação do solo com Ta, a outra porção da raiz foi inoculada com 500 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* (Mj) obtidos segundo metodologia proposta por Baermann (7). Cada unidade experimental foi composta por uma planta com o sistema radicular bipartido, sendo os tratamentos desenhados da seguinte forma: (vaso 1 = indutor e vaso 2 = resposta): água-água, Ta-água, água-Mj, Ta-Mj, Ta+Mj-água (Figura 1).



**Figura 1: Modelo esquemático de raiz bipartida aplicado nos ensaios I e II.** Foram utilizadas plantas de tomateiro de cinco semanas. Os tratamentos consistiram em plantas em solo o qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água).

Às 24, 96 e 144 horas após a infestação (hai) do solo com Mj, realizou-se coletas de cinco raízes-resposta/tratamento para a análise da expressão gênica. Aos 30 dias após a infestação, foram coletadas, nos tratamentos que continham o Mj, cinco raízes/tratamento para avaliação do número de galhas (NG), número de massas de ovos (NMO). Os dados obtidos foram utilizados para calcular o NMO/NG. Para a análise do NMO, procedeu-se a coloração das massas de ovos utilizando fucsina ácida, de acordo com Silva et al. (96).

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com dez repetições por tratamento. Os dados foram transformados, quando necessário, para atender as pressuposições estatísticas de normalidade e homogeneidade de variâncias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o software Statistica 7.

## **Ensaio II: Penetração e estádios de desenvolvimento**

Os procedimentos de instalação do ensaio III foram semelhantes ao do ensaio I, alterando-se apenas o número de J2 aplicado ao solo (300 J2 neste caso) e o momento da coleta para as análises de penetração e estádios de desenvolvimento, o qual foi realizada ao décimo quinto dia após a infestação do solo com Mj. Quatro raízes por

tratamento foram coletadas e submetidas ao processo de coloração utilizando fucsina ácida de acordo com Bybd et al. (15). Após a coloração, as análises do número total de nematoides na raiz (NTNR) e dos estádios de desenvolvimento (J2, J3, J4 e adulto) foram realizadas segundo Abad et al. (1). O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram transformados, quando necessário, visando atender as pressuposições estatísticas de normalidade e homogeneidade de variâncias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o software Statistica 7.

### **Análise da expressão gênica**

Para a análise da expressão gênica, cinco raízes/tratamento do ensaio I foram coletadas, lavadas com água para retirada do substrato e armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, sendo em seguida, purificado com RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen). A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 µL (1.000 ng) de RNA utilizando-se Transcriptor PrimeScript RT reagente Kit<sup>®</sup> conforme recomendação do fabricante. A transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real (qRT-PCR) foi realizada utilizando Kapa Sybr<sup>®</sup> Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems) em um sistema detector de sequências (Step One Plus<sup>®</sup>, Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. Os ciclos de temperatura foram programados da seguinte forma: um ciclo de 20 s a 95°C, 40 ciclos de 3 s a 95°C e 30 s a 60°C. Os dados foram analisados no software Step One<sup>®</sup> v.2.2.2 (Applied Biosystems), e os dados foram normalizados tomando como base a expressão endógena da actina (ACT). Os primers utilizados nesse estudo são listados na Tabela 1.

**Tabela 1. Lista dos primers utilizados na análise de qRT-PCR**

Primers (sequência 5'-3')			
Genes	Forward	Reverse	Referência
LOX1	GCCTCTCTTCTTGATGGAG	GTAGTGAGCCACTTCTCAA	Monte, E.*
PR1	CCTCAAGATTATCTTAACGCTC	TACCATTGCTTCTCATCAACC	Monte, E.*
TPX1	GCTTTGTCAGGGGTTGTGAT	TGCATCTCTAGCAACCAACG	(31)
LERBOH1	GTCAGGCTTCTACAGAAAAC	GTTGATTACAGTAGCCGGTTC	(84)
LECHS2	TTCGGTTAAGCGGCTCATGA	CTCGAGCACCCCTGTTGTTCTC	(4)
MYC2	CTGAAAAGAAGCCGAGGAAGC	GCATCTCCAAGAAGTGATGCC	Este trabalho
ACT	CACCACTGCTGAACGGGAA	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT	Monte, E.*

LOX1: lipoxigenase 1; PR1: proteína-PR1; TPX1: peroxidase; LERBOH1: NADPH oxidase; LECHS2: chalcona sintase; MYC2: fator transcricional; ACT: actina; \* primers cedidos pelo professor Enrique Monte (não publicado).

### Ensaio III: Herdabilidade da resistência induzida

Para avaliar a herdabilidade da resistência induzida desencadeada por Ta, coletaram-se dois frutos provenientes de plantas distintas dentro de cada tratamento no ensaio I. As sementes retiradas dos frutos, foram lavadas e armazenadas a 4°C por 12 h. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas seguindo o mesmo procedimento supracitado, procedendo-se o plantio destas em vasos de 1/2 litro contendo substrato comercial Tref® previamente autoclavado por 2 vezes à 121°C. Aos 15 dias após o plantio efetuou-se a coleta de dez plantas por tratamento para análise da expressão dos genes PR1, LOX1, TPX1, LERBOH1, LECHS2 e MYC2, a qual foi realizada seguindo a mesma metodologia do utilizada no ensaio I. Aos 21 dias após o plantio, infestou-se o substrato com 1000 ovos de Mj. Aos 30 dias após a infestação do substrato, foram avaliados o NG, NMO e, a partir desses dados, calculou-se o NMO/NG.

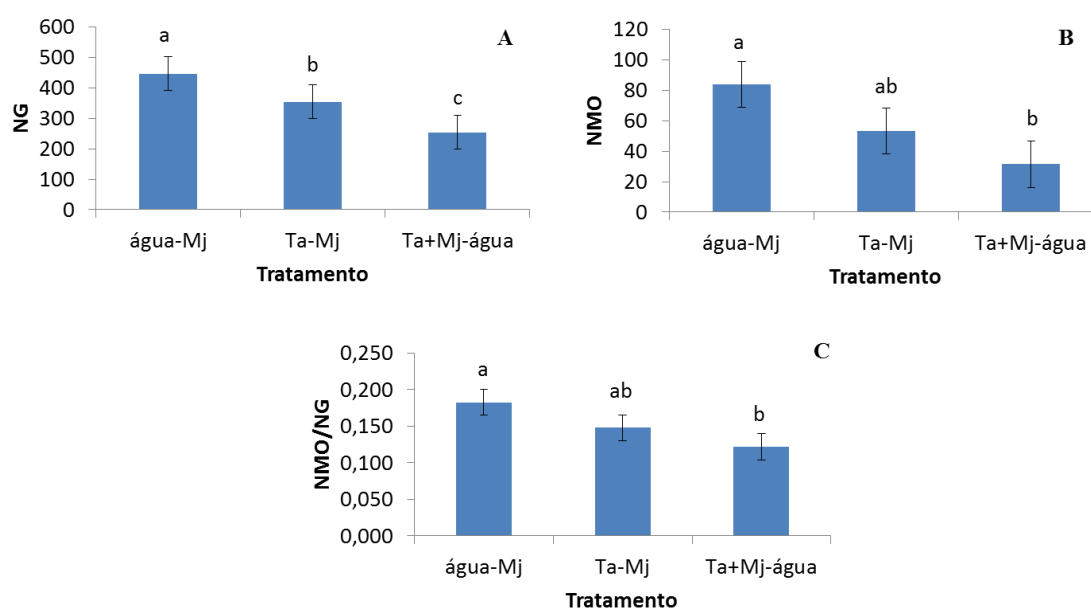
O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram transformados, quando necessário, visando atender as pressuposições estatísticas de normalidade e homogeneidade de variância. Os resultados

obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ) utilizando o software Statistica 7.

## RESULTADOS

### Ensaio I: Indução de resistência

Foram observadas diferenças significativas entre as análises das médias referentes às variáveis NG, NMO e NMO/NG no ensaio I. Em relação ao NG, o tratamento controle (água-Mj) apresentou a maior média, enquanto Ta-Mj e Ta+Mj-água obtiveram os menores valores, diferenciando-se do tratamento controle, assim como entre si (Figura 2A). No que concerne ao NMO, a média do tratamento Ta-Mj foi estatisticamente igual à de água-Mj bem como à de Ta+Mj-água. Contudo, houve diferença significativa entre água-Mj e Ta+Mj-água (Figura 2B). No tocante ao NMO/NG, esta seguiu a mesma tendência da variável NMO (Figura 2C).

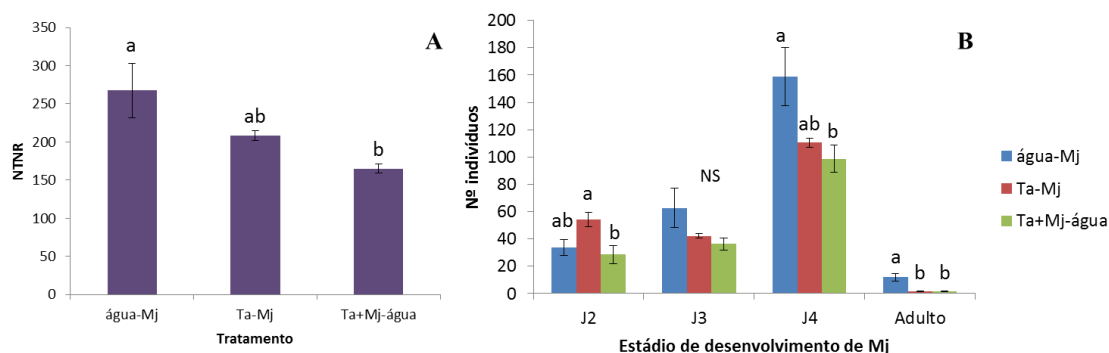


**FIGURA 2.** Análise da resistência e da reprodução decorrente do parasitismo de *Meloidogyne javanica* em tomateiro aos 30 dias após a infestação do solo (Ensaio I). **A:** Número de galhas (NG); **B:** número de massas de ovos (NMO) e **C:** número de massas de ovos/número de galhas (NMO/NG). Os tratamentos consistiram de plantas em solo o qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água). A unidade experimental foi constituída por uma planta com o sistema radicular bipartido. Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ;  $n=5$ ). Colunas seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos. A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

## Ensaio II. Penetração e estádios de desenvolvimento

Diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos em relação à variável NTNR, bem como entre as fases do ciclo de vida do patógeno, após 15 dias a infestação do solo com Mj (Figuras 3A e 3B). A análise dos dados demonstra que o NTNR de água-Mj foi estatisticamente igual ao de Ta-Mj e maior do que Ta+Mj-água. Estes dois últimos tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 3A).

Quanto aos estádios de desenvolvimento, o número de J2 foi estatisticamente semelhante entre água-Mj e Ta-Mj, e maior neste último do que em Ta+Mj-água (Figura 3B). Com relação ao estágio J3, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Tendo-se em consideração o estágio J4, o número de nematoides em água-Mj foi maior do que em Ta+Mj-água, mas estatisticamente semelhante a Ta-Mj. Quanto à fase adulta, as médias de Ta-Mj e Ta+Mj-água foram significativamente menores do que no tratamento controle (Figura 3B).



**FIGURA 3.** Número de juvenis e fases de desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* que penetraram à raiz aos 15 dias após a infestação do solo com 300 J2 (Ensaio II). **A:** Número total de nematoides na raiz (NTNR); **B:** Estádio de desenvolvimento de *M. javanica* (J2= juvenil de segundo estágio, J3 = juvenil de terceiro estágio, J4 = juvenil de quarto estágio). Os tratamentos consistiram em plantas em solo o qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água). A unidade experimental foi constituída por uma planta com o sistema radicular bipartido. Os dados das variáveis J3 e J4 foram transformados para  $\text{Log}_{10}$  e da variável Adulto foram transformados para  $\text{Log } x+1$ , sendo apresentados nos gráficos os valores não transformados. Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ;  $n=4$ ). Colunas seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos. A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

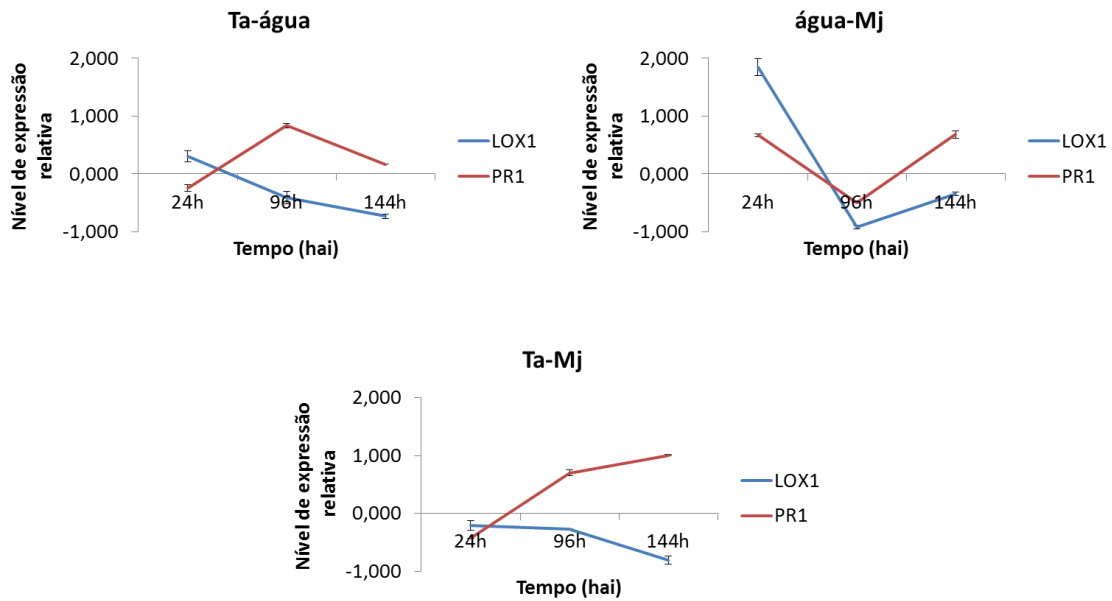
## **Análises da expressão gênica**

### **Ensaio I: Análise da rota de sinalização**

De forma holística, quando se analisa a expressão de PR1 ao longo do tempo, nota-se que nos tratamentos que contém Ta, ocorre o aumento da expressão desse gene ao longo do tempo sendo, de forma geral, regulado positivamente. Já a análise da expressão de LOX1 permitiu inferir que o mesmo só foi expresso positivamente às 24 hai, nos tratamentos Ta-água e água-Mj, sendo reprimido em todos os tratamentos nos demais tempos, resultando em níveis negativos (Figura 4).

Analisando-se cada tratamento isoladamente, verificou-se que em Ta-água, às 24 hai, ocorre a expressão de LOX1 e a repressão de PR1. Não obstante, constata-se a inversão desse panorama às 96 hai, quando observa-se a elevada expressão de PR1 e a manutenção de sua regulação positiva às 144 hai, contrastando com LOX1 que reduz significativamente nos referidos tempos (Figura 4). Em referência a água-Mj, nota-se que às 24 hai os valores da expressão dos genes LOX1 e PR1 foram positivos e semelhantes entre si. Porém, às 96 hai houve uma redução nos níveis negativos em ambas expressões, sendo esta mais acentuada em LOX1, o qual continua sendo regulado negativamente às 144 hai, enquanto que em PR1 aumenta a sua expressão, alcançando níveis positivos (Figura 4).

Tendo em consideração plantas do tratamento Ta-Mj coletadas às 24 hai, constatou-se a regulação negativa de ambos os genes LOX1 e PR1. Contudo, às 96 hai, ocorre uma superexpressão do gene PR1 elevando-o a níveis positivos, enquanto que a expressão de LOX1 permanece reprimida e praticamente inalterada, sendo reduzida ainda mais às 144 hai. Neste mesmo tempo, a expressão de PR1 apresenta um pequeno aumento (Figura 4).



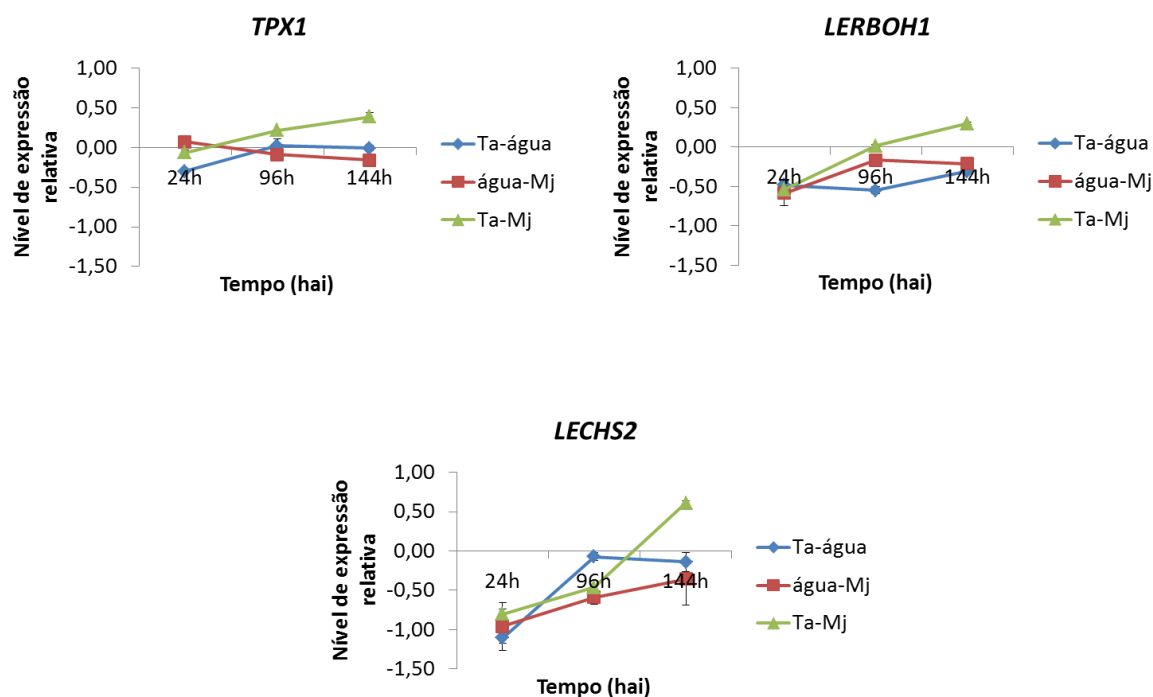
**FIGURA 4.** Monitoramento, ao longo do tempo, da expressão gênica de LOX1 (marcador do ácido jasmônico) e de PR1 (marcador do ácido salicílico) no ensaio I. Os tratamentos consistiram em plantas em solo no qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj). A unidade experimental foi constituída por uma planta com o sistema radicular bipartido. Os valores médios do nível de expressão relativa foram quantificados a partir de extração do RNA de cinco plantas/tratamento, e referenciados ao eixo das abscissas (média da expressão relativa do tratamento controle). A barra em cada ponto representa o erro padrão da média.

### Ensaio I: Análise de genes de defesa

O nível de expressão de TPX1 em Ta-Mj foi negativo às 24 hai, sofrendo significativo aumento com o decorrer do tempo. Plantas do tratamento Ta-água apresentaram comportamento semelhante ao tratamento supracitado, embora apresentando níveis mais baixos de expressão. Em relação ao tratamento água-Mj, este exibiu valores positivos às 24 hai, sendo suprimidos nos demais tempos analisados, alcançando níveis negativos (Figura 5).

Houve regulação negativa do gene LERBOH1 nos tratamentos água-Mj e Ta-água em todos os tempos analisados, sendo àquela mais intensa em Ta-água. O tratamento Ta-Mj apresentou níveis de regulação de LERBOH1 semelhantes aos dos demais tratamentos às 24 hai mas, a partir das 96 hai, houve um incremento em sua

expressão a qual atingiu níveis positivos (Figura 5). Já em relação a LECHS2, observou-se a supressão da expressão desse gene em praticamente todos os tratamentos e tempos analisados, à exceção de Ta-Mj, o qual apresentou níveis positivos às 144 hai (Figura 5).

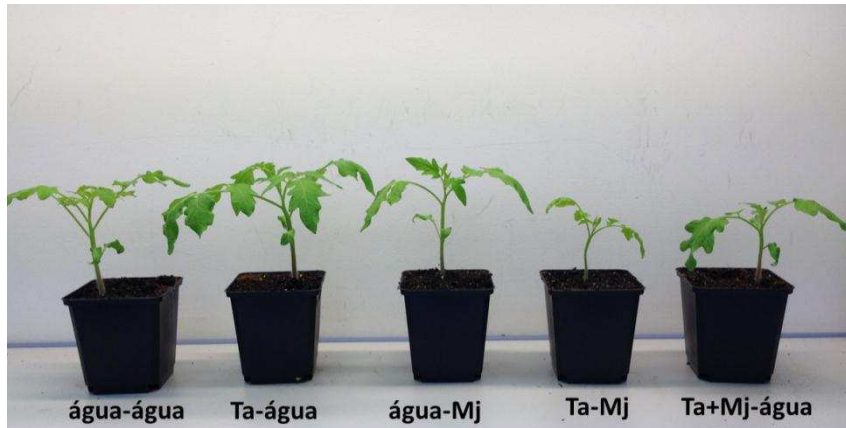


**FIGURA 5.** Monitoramento, ao longo do tempo, da expressão gênica de TPX1: peroxidase; LERBOH1: NADPH oxidase; LECHS2: chalcona sintase no ensaio I. Os tratamentos consistiram em plantas em solo no qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj). Os valores médios do nível de expressão relativa foram quantificados a partir de extração do RNA de cinco plantas/tratamento, e referenciados ao eixo das abscissas (média da expressão relativa do tratamento controle). A barra em cada ponto representa o erro padrão da média.

### Ensaio III: Herdabilidade da resistência induzida

#### Análise da resistência

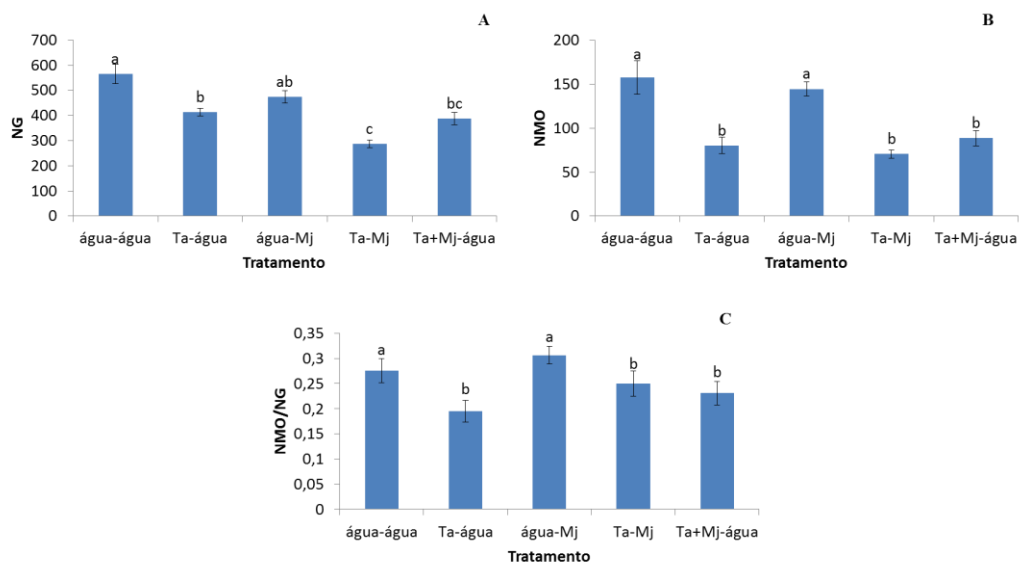
As plantas do tratamento Ta-Mj e Ta+Mj-água apresentaram, aos 15 dias após o semeio, menor desenvolvimento das partes aéreas quando comparadas com os demais tratamentos (Figura 6).



**FIGURA 6.** Plantas F1 aos 15 dias após a sementeira. Os tratamentos consistiram no plantio de sementes proveniente das plantas do Ensaio I, constituído por plantas em solo no qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água).

Com base nos resultados do ensaio III, constatou-se diferença significativa entre as médias referentes às variáveis NG, NMO e NMO/NG. Com relação à NG, os tratamentos água-água e água-Mj apresentaram as maiores médias. Ta-água e Ta+Mj-água foram iguais entre si, enquanto que Ta-Mj apresentou a menor média, não diferenciando de Ta+Mj-água (Figura 7A).

No tocante à NMO, os tratamentos água-água e água-Mj obtiveram as maiores médias, não diferenciando estatisticamente entre si, mas sim em relação aos demais tratamentos. Ta-água, Ta-Mj e Ta+Mj-água não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 7B). No que diz respeito à NMO/NG, o comportamento dos tratamentos relativos à essa variável foi semelhante ao de NMO (Figura 7C).

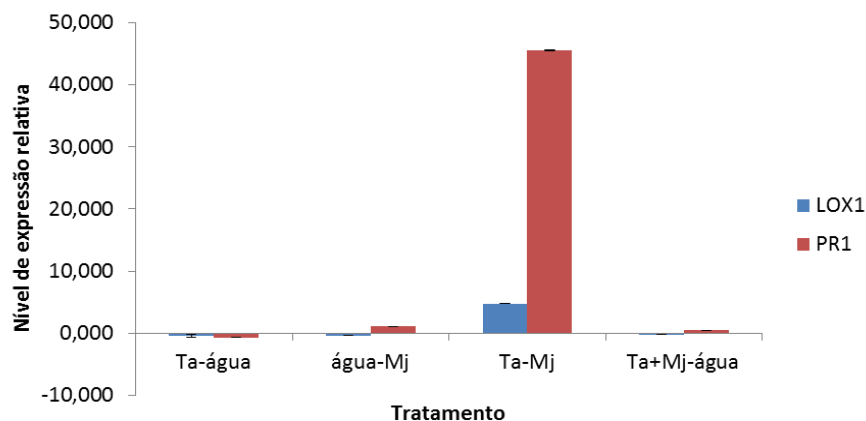


**FIGURA 7.** Análise da resistência na progênie de tomateiros submetidos à indução de resistência e da reprodução decorrente do parasitismo de *Meloidogyne javanica* em tomateiro aos 30 dias após a infestação do solo (Ensaio III). **A:** Número de galhas (NG); **B:** número de massas de ovos (NMO) e **C:** número de massas de ovos/número de galhas (NMO/NG) resultante do parasitismo de *M. javanica* aos 30 dias após a inoculação. Os tratamentos consistiram no plantio de sementes proveniente das plantas do Ensaio I, o qual foi constituído por plantas em solo o qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água). A unidade experimental foi constituída por uma planta por vaso. Os dados da variável NMO foram transformados para  $\text{Log}_{10}$ , sendo apresentado no gráfico os valores não transformados. Os dados foram submetidos à ANOVA e à comparação de médias pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ;  $n=5$ ). Colunas seguidas de diferentes letras indicam diferença significativa entre tratamentos. A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

### Análise da rota de sinalização

As plantas F1 apresentaram expressão diferencial entre LOX1 e PR1 para todos os tratamentos, sendo observada a maior discrepância na expressão desses genes em Ta-Mj, no qual a expressão de PR1 foi maior do que a de LOX1 (Figura 8).

A expressão de ambos os genes foi negativa em Ta-água, enquanto que nos tratamentos água-Mj e Ta-Mj-água a expressão de PR1 foi induzida e a de LOX1 reprimida (Figura 8).



**FIGURA 8.** Análise da expressão gênica de LOX1 (marcador do ácido jasmônico) e de PR1 (marcador do ácido salicílico) aos 15 dias após o plantio (Ensaio III). Os tratamentos consistiram no plantio de sementes proveniente das plantas do Ensaio I, constituído por plantas em solo no qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água). A unidade experimental foi composta por uma planta por vaso. Os valores médios do nível de expressão relativa foram quantificados a partir de extração do RNA de dez plantas/tratamento, e referenciados ao eixo das abscissas (média da expressão relativa do tratamento controle). A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

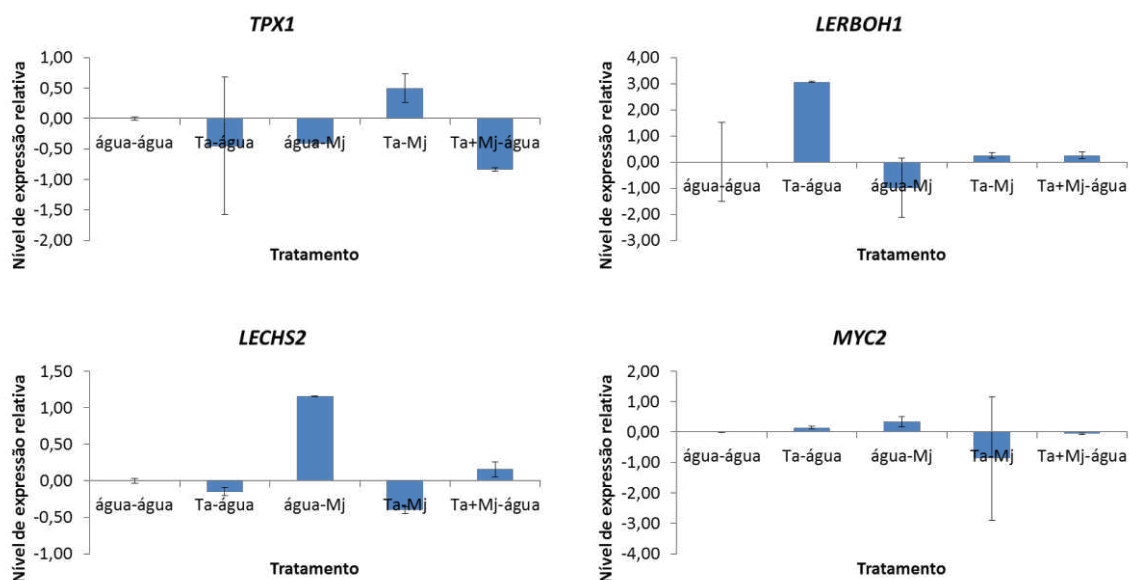
### Análise dos genes de defesa

A expressão do gene TPX1 foi reprimida em quase todos os tratamentos, à exceção de Ta-Mj, o qual apresentou regulação positiva (Figura 8). No que se refere a LERBOH1, os tratamentos que continham Ta apresentaram regulação positiva, enquanto que em água-Mj ocorreu a repressão da expressão desse gene, resultando em níveis negativos. Com relação a LECHS2, as plantas do tratamento água-Mj exibiram o nível mais elevado de expressão do gene LECHS2, seguida por Ta-Mj-água, diferentemente do que foi observado em Ta-água e Ta-Mj os quais apresentaram valores negativos (Figura 9).

### Análise do fator de transcrição MYC2

O fator de transcrição MYC2 teve sua expressão reprimida em Ta+Mj-água e Ta+Mj, observando-se maior nível de repressão neste último tratamento. Nos demais

casos, a expressão desse gene foi positiva, ocorrendo o maior nível de expressão em água-Mj (Figura 9).



**FIGURA 9.** Análise da expressão gênica de TPX1: peroxidase; LERBOH1: NADPH oxidase; LECHS2: chalcona sintase; MYC2: fator de transcrição; aos 15 dias após o plantio (Ensaio III). Os tratamentos consistiram no plantio de sementes proveniente das plantas do Ensaio I, constituído por plantas em solo no qual foi aplicado apenas água (água-água), plantas em solo infestado apenas com *T. atroviride* (Ta-água) ou com *M. javanica* (água-Mj), bem como plantas em solo infestado com *T. atroviride* e *M. javanica* separadamente (Ta-Mj) ou no mesmo vaso (Ta+Mj-água). A unidade experimental foi composta por uma planta por vaso. Os valores médios do nível de expressão relativa foram quantificados a partir de extração do RNA de dez plantas/tratamento, e referenciados ao eixo das abscissas (média da expressão relativa do tratamento controle). A barra em cada coluna representa o erro padrão da média.

## DISCUSSÃO

### Indução de resistência

Os resultados do presente estudo demonstram que *Trichoderma atroviride* (Ta) foi capaz de induzir resistência sistêmica ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* (Mj), além de confirmar a ação direta do fungo sobre o nematoide ou ainda uma possível indução de resistência local. O principal efeito via planta desencadeado por Ta foi a redução do NG, podendo-se supor que a indução de resistência comprometeu a penetração/migração do nematoide no tecido vegetal ou prejudicou o estabelecimento

do sítio de alimentação, diminuindo assim a formação do sintoma típico de galha. Observando-se o comportamento das variáveis NMO e NMO/NG no tratamento Ta-Mj, infere-se que a indução da resistência não interfere de forma significativa na reprodução do nematoide, uma vez que as médias das referidas variáveis, embora menores, não apresentaram diferenças significativas em relação à água-Mj.

À parte da resistência induzida, constatou-se que em Ta+Mj-água, tratamento que continha o fungo e o nematoide no mesmo vaso, as variáveis NG, NMO e NMO/NG apresentaram valores menores do que àqueles encontrados nas plantas controle, ficando evidente a atuação direta de Ta sobre Mj. Vários estudos apontam o efeito deletério de diferentes espécies de *Trichoderma* sobre *Meloidogyne* spp. (12, 45, 71, 75, 90, 92), atuando por meio do parasitismo de ovos e de J2, assim como por antibiose (89, 92, 101). Tais fatores somados diminuíram os danos causados por Mj às plantas de tomate.

Visando avaliar a possível causa da redução do NG encontrado em Ta-Mj no ensaio I, realizou-se um ensaio para estimar o NTNR e os diferentes estádios de desenvolvimento de Mj no interior do tecido (ensaio II). Os valores de NTNR foram estatisticamente iguais entre Ta-Mj e o tratamento controle, concluindo-se consequentemente que a indução de resistência não interfere na penetração do nematoide na raiz. Não obstante, os resultados da análise das fases de desenvolvimento de Mj demonstram que ocorre um atraso no ciclo do nematoide em Ta-Mj, observando-se com maior frequência estádios J2 e, com menor frequência, estádios de desenvolvimento mais avançados (J3 – adulto), quando comparados com o tratamento controle. Vos et al. (111) observaram comportamento semelhante em raízes de tomateiro colonizadas por *Glomus mosseae*, onde foi constatado o menor número de J3 e J4 bem como de fêmeas adultas quando comparado às plantas controle. Dessa forma,

fica explícito que o menor NG encontrado em Ta-Mj no ensaio I é resultado do atraso no desenvolvimento do ciclo de Mj, que acaba por não induzir a formação da célula gigante no tempo analisado.

Ainda referente ao ensaio II, foi relatado em Ta-Mj-água valores estatisticamente menores de NTNR, bem como em praticamente todos os estádios de desenvolvimento, quando comparado com o controle. Esse fato vem corroborar o efeito direto do fungo sobre o nematoide, o qual influenciou a penetração de Mj no tecido da planta, resultando assim no menor NTNR, bem como nas variáveis NG, NMO e NMO/NG do ensaio I. É importante frisar que *Trichoderma* possui a capacidade de alterar os exsudados radiculares de plantas, fazendo com que a composição destes tenha influência direta no comportamento de organismos patogênicos presentes na rizosfera (6, 32, 47, 117). Adicionalmente, Vos et al. (110) relataram que a adição dos exsudados de raízes de plantas de tomate colonizadas por *Glomus mosseae* reduziu a penetração de *M. incognita* e paralisou temporariamente os J2. Analogamente aos estudos supracitados, Ta pode ter interferido, via alteração dos exsudados, no movimento do nematoide na rizosfera e, conseqüentemente, impossibilitado a sua penetração na raiz.

Buscando-se uma explicação, ao nível genético/fisiológico, para os fatos acima discutidos, avaliou-se a expressão de genes relacionados às rotas do ácido salicílico e do ácido jasmônico, para os quais foram utilizados os marcadores PR1 e LOX1, respectivamente. Um dos objetivos dessa análise foi identificar qual seria a rota de sinalização predominante da indução de resistência na interação tomateiro-*Trichoderma-Meloidogyne*, uma vez que *Trichoderma* pode induzir, na planta, diferentes vias de sinalização hormonal, bem como promover a síntese de compostos característicos de ambas resistência sistêmica adquirida (do inglês: “Systemic Acquired Resistance” - SAR) e resistência sistêmica induzida (do inglês: “Induced Systemic

Resistance” - ISR) (19, 29, 41, 76, 86). De forma complementar, outro ponto a ser discutido a partir dos dados de expressão é o tipo de defesa desencadeada contra Mj, uma vez que vários estudos comprovam a eficiência de elicitores de SAR e de ISR na indução de resistência a *Meloidogyne* (28, 68).

Visto os resultados, conclui-se que a rota desencadeada pela interação entre o tomateiro-Ta-Mj é a do ácido salicílico, dada a regulação positiva do gene PR1 em detrimento aos níveis quase sempre negativos da expressão de LOX1. Interessantemente, a expressão de PR1 referente a Ta-água e a Ta-Mj possui praticamente o mesmo comportamento às 24 e 96 hai. A diferença entre ambos tratamentos é notada quando, às 144 hai, o tratamento que não possui o nematoide (Ta-água) apresenta uma redução no nível de expressão de PR1, enquanto que Ta-Mj, o qual contém o patógeno, a expressão do referido gene aumenta significativamente. Esse comportamento evidencia o efeito priming e ratifica a sinalização da defesa via ácido salicílico.

A elevada expressão de genes tais como PR1 e, ou, AS foram observados por diversos autores em diferentes interações planta-Trichoderma-patógeno (19, 86, 116). Contudo, Hermosa et al. (41) comentam que a indução de respostas das plantas por Trichoderma é um fenômeno dependente do tempo, da concentração, e do genótipo de ambos os organismos. Segarra et al. (87) constataram que a concentração de Trichoderma influi diretamente na produção de AS e de peroxidase em plantas de pepino parasitadas por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Os autores observaram o aumento na expressão desses compostos após o tratamento com *T. asperellum* na concentração de  $10^7$ , concentração esta utilizada no presente trabalho.

Em relação à expressão do gene LOX1, notou-se valores positivos somente às 24 hai nos tratamentos Ta-água e água-Mj, sendo a mesma reprimida nos demais tempos e

tratamentos. A regulação negativa de LOX1 pode ser devida ao antagonismo entre as rotas de sinalização, o qual pode ser observado claramente em todos os gráficos de expressão gênica dos referidos marcadores. Apesar das interações entre as vias de resposta do AS e AJ possam ser antagonísticas, sinérgicas ou neutras, o primeiro tipo de interação parece prevalecer (78). A interação entre essas duas rotas aperfeiçoa a resposta imune contra patógenos individuais (99) embora, na natureza, as plantas sejam simultaneamente ou sequencialmente atacadas por múltiplos patógenos com diferentes estratégias de parasitismo e estilos de vida. Assim, a comunicação entre as rotas do AS e AJ constitui-se em um importante mecanismo para, dependendo da sequência e tipo de organismo patogênico em questão, priorizar a atividade de uma rota à outra (55, 79).

Uma vez concluído, a partir da expressão de PR1, que o AS participa diretamente na ativação de defesa desencadeada por Ta a Mj, buscou-se avaliar a expressão de genes de defesa que resultassem no atraso do desenvolvimento de Mj e, ou, na formação da célula gigante. Assim, foram selecionados os genes TPX1, referente à peroxidase que atua especificamente na lignificação dos tecidos da raiz de tomateiro (14, 60), e LERBOH1, gene correspondente à NADPH oxidase, que compreende um dos fatores que governam a produção de ROS, as quais participam na sinalização celular associada a ferimentos (48), à reação de hipersensibilidade (115) e à defesa contra fitopatógenos (104). Além destes, selecionou-se o gene LECHS2, responsável pela produção de chalcona sintase (ChS), um dos precursores das fitoalexinas (21, 33, 35).

Com base nos resultados, constatou-se que TPX1 apresentou, em Ta-Mj, uma regulação próxima a zero às 24 hai, possuindo maior expressão nos tempos posteriores (96 e 144 hai). Por conseguinte, deduz-se que devido ao reconhecimento do nematoide no ato da penetração e migração no sistema radicular, a planta ativou o mecanismo de defesa que já encontrava-se em estado de priming devido à ação de Ta, conduzido a

rápida elevação dos níveis de TPX1. O estado de priming pode ser ratificado pelo comportamento do gráfico do tratamento Ta-água, no qual não há o contato da planta com o patógeno e a expressão de TPX1, embora em níveis inferiores de expressão, é semelhante ao do tratamento Ta-Mj até às 96 hai. Esse tipo de reação é característico de plantas sob estado de priming (3, 18, 107).

Quando parasitadas por Mj, as plantas referentes ao tratamento Ta-Mj aumentam a produção de TPX1 significativamente no período entre 96 e 144 hai. Pelo fato de TPX1 mediar a formação e deposição da lignina na parede celular (60), é razoável inferir que as paredes celulares da raiz tornaram-se mais lignificadas e, conseqüentemente, mais resistentes à migração e ao estabelecimento do sítio de alimentação por parte de Mj. A lignina é um termo genérico utilizado para um grande grupo de polímeros aromáticos resultante da oxidação de 4-hidroxifenilpropanoídes (11, 108). Estes polímeros são depositados, por meio de estímulos bióticos e abióticos, na parede celular tornando-a rígida e impermeável (13), sendo essa uma característica típica de HR e da resistência sistêmica adquirida (SAR) em interações planta-patógeno (52). Em recente trabalho, Portillo et al. (80) relataram que expressão de TPX1 foi reprimida na interação compatível e induzida na interação incompatível (cultivar portadora do gene Mi-1), impedindo assim o desenvolvimento da célula gigante em raízes de tomateiro. Ademais, a superexpressão de TPX1 em plantas suscetíveis impediu a reprodução do nematoíde e expansão da célula gigante, indicando a importância da repressão desse gene durante o estabelecimento do nematoíde. De forma complementar, determinadas isoformas da peroxidase são capazes de suprimir as enzimas hidrolíticas e oxidar as toxinas derivadas do nematoíde, tornando-as compostos neutros (118).

De forma complementar, em água-Mj, ocorre a supressão da expressão de TPX1, a qual foi regulada positivamente às 24 hai, sendo em seguida reprimida. Supõe-se que

tal fato seja devido à interferência de Mj que, uma vez presente nas raízes do hospedeiro, induz à repressão do gene codificador da peroxidase, bloqueando assim uma das linhas de defesa da planta. Diversos autores comprovaram que *Meloidogyne* possui a capacidade de modular a expressão de genes que são normalmente expressos pela planta durante a defesa (9, 37, 43, 44, 57), estando entre outros, àqueles relacionados ao AS, peroxidases e ROS (10, 42, 58)

LERBOH1 é o gene responsável pela NADPH oxidase, a qual participa dos sistemas enzimáticos de geração de ROS mais bem estudados (62). No presente estudo, Ta-Mj foi o único tratamento que apresentou regulação positiva de LERBOH1, sendo sua maior expressão obtida às 144 hai. A geração de ROS a partir de RBOHs (do inglês: “respiratory burst oxidase homologues”) está associada com o reconhecimento do patógeno durante a explosão oxidativa relacionada à percepção de MAMPs/PAMPs durante a resposta de hipersensibilidade (103). Melillo et al. (64) apontam que a produção transiente de ROS em tecidos radiculares durante a penetração de *M. incognita* em ambos genótipos suscetíveis e resistentes (gene *Mi*) de tomateiro, refletindo provavelmente uma resposta geral da planta à ferimentos. Entretanto, a manutenção do acúmulo de ROS foi somente detectada em plantas resistentes, onde ROS foi especificamente localizado em células e espaços intercelular circunvizinho à região anterior do nematoide, onde uma reação de hipersensibilidade foi observada.

No que diz respeito a LECHS2, gene responsável pela produção da ChS, observou-se expressão positiva apenas em Ta-Mj às 144 hai, sendo este gene reprimido nos demais tratamentos. A ChS é o membro mais bem estudado da superfamília policetídeos sintase, sendo esta enzima responsável por fornecer os materiais de partida para um conjunto diverso de metabólitos, principalmente flavonoides (35), dando origem a compostos antimicrobianos denominados fitoalexinas e fitoantecipinas, os

quais atuam na resposta de defesa da planta a estresses bióticos e abióticos (21). O acúmulo de fitoalexinas em resposta ao ataque de patógenos já foi relatado em várias interações planta-patógeno (33, 49, 113), interferindo principalmente na respiração e motilidade de fitonematoides (8, 51, 82). Assim, o nível de expressão de LECHS2 observado nesse estudo pode refletir um mecanismo adicional desencadeado por Ta quando na presença de Mj, limitando a colonização do tecido pelo patógeno.

Estudos recentes têm analisado a herdabilidade, pela progênie de plantas, da resistência induzida bem como a durabilidade desta (5, 106). No presente trabalho, a indução de resistência ao parasitismo de Mj desencadeada por Ta foi herdada, pela geração F1 de Ta-Mj, a qual apresentou elevada expressão de componentes do seu sistema de defesa, destacando-se principalmente a expressão do gene PR1, o mesmo ativado nas plantas parentais.

Interessantemente, corroborando o fato já mencionado por Slaughter et al. (98), a resistência induzida foi repassada à geração seguinte com maior intensidade. Esse aumento está refletido nas variáveis NMO e NMO/NG, referentes ao tratamento Ta-Mj, que no ensaio com as plantas parentais não apresentaram diferença em relação à água-Mj, enquanto que no ensaio com as plantas F1, os seus valores foram estatisticamente menores do que nos referidos tratamentos controle (água-água e água-Mj). O nível de expressão de PR1 encontrado em plantas F1 derivadas de Ta-Mj, não foi constatado nos demais tratamentos que continham Ta (Ta-água e Ta-Mj), ficando a expressão destes no mesmo patamar das plantas controle. Estudos recentes têm começado a analisar como mecanismos epigenéticos podem influenciar na duração da expressão gênica e imunidade da planta (5, 106).

Observa-se que, aos 15 dias após o semeio, a plantas derivada de Ta-Mj apresentou um desenvolvimento muito aquém daquelas advindas dos outros

tratamentos. Nota-se também um atraso no desenvolvimento da planta referente a Ta+Mj-água. Esse fato pode ser explicado se analisarmos a expressão do gene MYC2, o qual foi reprimido nos referidos tratamentos. Segundo Hermosa et al. (40), MYC2 constitui um dos fatores responsáveis pelo balanço entre o desenvolvimento vegetativo e a atividade do sistema de defesa da planta. Esses mesmos autores explicam que, quando há uma redução na expressão de MYC2, este então não se liga às proteínas JAZ, as quais acabam formando um complexo com as proteínas DELLA, desencadeando assim a ativação da defesa da planta. Assim, devido às plantas parentais terem sido submetidas à interação com Ta e Mj concomitantemente, esta repassou a informação à progênie para que priorizassem a ativação de sua defesa ao desenvolvimento vegetativo.

As regulações positivas de TPX1 e LERBOH1 também foram verificadas nas plantas F1 do ensaio III. A expressão do gene TPX1, apresentou regulação positiva apenas em Ta-Mj enquanto que LERBOH1 apresentou expressão positiva derivadas dos tratamentos que continham Ta, diferentemente daquelas derivadas de água-Mj, que exibiram regulação negativa. Dessa forma a mesma base da resistência induzida parece se manter na geração seguinte, em parte, devido à mesma resposta de defesa.

Não obstante, parece que a herdabilidade da regulação positiva observada em TPX1 e LERBOH1 não ocorre com o gene LECHS2, um dos responsáveis pela produção de fitoalexinas (20, 21). A expressão de LECHS2 mostrou-se maior nas plantas derivadas do tratamento água-Mj, sendo levemente positiva em Ta+Mj-água e regulada negativamente em Ta-água e Ta-Mj. Esse dado abre uma lacuna para que possa avaliar quais os mecanismos de resistência induzida são capazes de ser repassados à geração seguinte.

O presente trabalho relata pela primeira vez a capacidade de *Trichoderma* em induzir resistência a um fitonematoide, bem como a herdabilidade da resistência

desencadeada por esse fungo. A resistência em plantas de tomateiro se deu por meio da indução da expressão dos genes da peroxidase, NADPH oxidase e chalcona sintase. A interação proporcionou a redução do NG devido ao atraso do ciclo do nematoide e estabelecimento do sítio de alimentação. Além disso, comprovou-se a herdabilidade do estado de priming, o qual foi repassado com maior intensidade, fazendo com que a planta, através da repressão do fator de transcrição MYC2, reduzisse o seu desenvolvimento vegetativo e primasse pela ativação do sistema de defesa. A resistência nas plantas F1 apresentou níveis mais altos, o que afetou a reprodução do nematoide.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, P.; Castagnone-Sereno, P.; Rosso, M.-N.; de Almeida Engler, J.; Favery, B. 2009. Invasion, feeding and development. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p. 163-181.
2. Affokpon, A.; Coyne, D. L.; Htay, C. C.; Agbèdè, R. D.; Lawouin, L.; Coosemans, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 600-608.
3. Ahmad, S.; Gordon-Weeks, R.; Pickett, J.; Ton, J. 2010. Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 6, p. 817-827.
4. Alkan, N.; Gadkar, V.; Coburn, J.; Yarden, O.; Kapulnik, Y. 2004. Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. **New Phytologist**, v. 161, n. 3, p. 877-885.
5. Alvarez, M. E.; Nota, F.; Cambiagno, D. A. 2010. Epigenetic control of plant immunity. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 563-576.
6. Aziz, N. H.; El-Fouly, M. Z.; El-Essawy, A. A.; Khalaf, M. A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 38, n. 1, p. 33-39.
7. Baernmann, G. 1917. Eine einfache method zur auffindung con ankvlostomum (Nematoden) larven in erproben. **Ned. Indie**, v. 57, p. 131-137.
8. Baldrige, G. D.; O'Neill, N. R.; Samac, D. A. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: Defense-response gene

mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 999-1010.

9. Barcala, M.; García, A.; Cabrera, J.; Casson, S.; Lindsey, K.; Favery, B.; García-Casado, G.; Solano, R.; Fenoll, C.; Escobar, C. 2010. Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. **The Plant Journal**, v. 61, n. 4, p. 698-712.

10. Beneventi, M.; da Silva, O.; de Sa, M. E.; Firmino, A. A.; de Amorim, R. M.; Albuquerque, E. V.; da Silva, M. C.; da Silva, J.; Campos, M. d. A.; Lopes, M. J.; Togawa, R.; Pappas, G.; Grossi-de-Sa, M. 2013. Transcription profile of soybean-root-knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1-17.

11. Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. 2003. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519-546.

12. Bokhari, F. M. 2009. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, n. 4, p. 361-369.

13. Bonawitz, N. D.; Chapple, C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: Connecting genotype to phenotype. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 337-363.

14. Botella, M. A.; Quesada, M. A.; Hasegawa, P. M.; Valpuesta, V. 1993. Nucleotide sequences of two peroxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) **Plant Physiology**, v. 103, p. 665-666.

15. Bybd, D. W.; Kirkpatrick, T.; Barker, K. R. 1983. An Improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology** v. 15, n. 1, p. 142-143.

16. Caillaud, M.-C.; Dubreuil, G.; Quentin, M.; Perfus-Barbeoch, L.; Lecomte, P.; de Almeida Engler, J.; Abad, P.; Rosso, M.-N.; Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 104-113.

17. Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G. J.; Perfus-Barbeoch, L.; Abad, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: New insights from the genomic era. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 203-220.

18. Conrath, U.; Beckers, G. J. M.; Flors, V.; García-Agustín, P.; Jakab, G.; Mauch, F.; Newman, M.-A.; Pieterse, C. M. J.; Poinssot, B.; Pozo, M. J.; Pugin, A.; Schaffrath, U.; Ton, J.; Wendehenne, D.; Zimmerli, L.; Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071.

19. Contreras-Cornejo, H. A.; Macías-Rodríguez, L.; Beltrán-Peña, E.; Herrera-Estrella, A.; López-Bucio, J. 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 10, p. 1554-1563.

20. Creelman, R. A.; Tierney, M. L.; Mullet, J. E. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 11, p. 4938-4941.
21. Dao, T. T. H.; Linthorst, H. J. M.; Verpoorte, R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397-412.
22. Davies, K. G.; Spiegel, Y. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: Towards understanding field variation through molecular mechanisms. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fennol, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. London: Springer. p. 493-516.
23. de Almeida Engler, J.; Gheysen, G. 2013. Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 17-24.
24. Djonovic, S.; Pozo, M. J.; Dangott, L. J.; Howell, C. R.; Kenerley, C. M. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 838-853.
25. Djonovic, S.; Vargas, W. A.; Kolomiets, M. V.; Horndeski, M.; Wiest, A.; Kenerley, C. M. 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 875-889.
26. Dong, L. Q.; Zhang, K. Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1-2, p. 31-45.
27. Elsen, A.; Gervacio, D.; Swennen, R.; Waele, D. 2008. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, v. 18, n. 5, p. 251-256.
28. Fujimoto, T.; Tomitaka, Y.; Abe, H.; Tsuda, S.; Futai, K.; Mizukubo, T. 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1084-1097.
29. Gallou, A.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 219-230.
30. Golzary, H.; Ahmadzadeh, M.; Panjehkeh, N.; Salari, M.; Sedaghati-khoravi, E. 2011. The effects of some biocontrol agents and their combination on root-knot disease on tomato. **Insight Plant Disease**, v. 1, p. 1-11.
31. Gómez-Ariza, J.; Balestrini, R.; Novero, M.; Bonfante, P. 2009. Cell-specific gene expression of phosphate transporters in mycorrhizal tomato roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 8, p. 845-853.

32. Green, H.; Heiberg, N.; Lejbølle, K.; Jensen, D. F. 2001. The use of a GUS transformant of *Trichoderma harzianum*, strain T3a, to study metabolic activity in the spermosphere and rhizosphere related to biocontrol of *Pythium damping-off* and root rot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 349–359.
33. Guetsky, R.; Kobilier, I.; Wang, X.; Perlman, N.; Gollop, N.; Avila-Quezada, G.; Hadar, I.; Prusky, D. 2005. Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and Its effect on pathogenicity on avocado fruits. **Phytopathology**, v. 95, n. 11, p. 1341-1348.
34. Haegeman, A.; Mantelin, S.; Jones, J. T.; Gheysen, G. 2012. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 19-31.
35. Hahlbrock, K.; Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 347-369.
36. Hallman, J.; Davies, K. G.; Sikora, R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot Nematodes**. Wallingford, UK: CAB International. p. 380 - 411.
37. Hamamouch, N.; Li, C.; Seo, P. J.; Park, C.-M.; Davis, E. L. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 355-364.
38. Hao, Z.; Fayolle, L.; van Tuinen, D.; Chatagnier, O.; Li, X.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. 2012. Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3657-3672.
39. Harel, Y. M.; Mehari, Z. H.; Rav-David, D.; Elad, Y. 2014. Systemic resistance to gray mold induced in tomato by benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* T39. **Phytopathology**, v. 104, n. 2, p. 150-157.
40. Hermosa, R.; Rubio, M. B.; Cardoza, R. E.; Nicolás, C.; Monte, E.; Gutiérrez, S. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balance the costs of plant growth and defence. **International Microbiology**, v. 16, p. 69-80.
41. Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 17-25.
42. Hewezi, T.; Baum, T. J. 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 9-16.
43. Ibrahim, H. M. M.; Hosseini, P.; Alkharouf, N. W.; Hussein, E. H. A.; Gamal El-Din, A. E. K. Y.; Aly, M. A. M.; Matthews, B. F. 2011. Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. **BMC Genomics**, v. 12, p. 1-16.
44. Jammes, F.; Lecomte, P.; Almeida-Engler, J.; Bitton, F.; Martin-Magniette, M.-L.; Renou, J. P.; Abad, P.; Favery, B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host

response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 44, n. 3, p. 447-458.

45. Jamshidnejad, V.; Sahebani, N.; Etebarian, H. 2013. Potential biocontrol activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Trichoderma harzianum* BI against *Meloidogyne javanica* on tomato in the greenhouse and laboratory studies. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n. 13, p. 1632-1640.

46. Jaouannet, M.; Magliano, M.; Arguel, M. J.; Gourgues, M.; Evangelisti, E.; Abad, P.; Rosso, M. N. 2012. The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 1, p. 97-105.

47. Jash, S.; Pan, S. 2007. Variability in antagonistic activity and root colonizing behaviour of *Trichoderma* isolates. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 45, n. 1-2, p. 29-35.

48. Jih, P. J. 2003. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 381-389.

49. Johnson, G.; Maag, D. D.; Johnson, D. K.; Thomas, R. D. 1976. The possible rôle of phytoalexins in the resistance of sugarbeet (*Beta vulgaris*) to *Cercospora beticola*. **Physiological Plant Pathology**, v. 8, n. 3, p. 225-230.

50. Jones, J. T.; Haegeman, A.; Danchin, E. G. J.; Gaur, H. S.; Helder, J.; Jones, M. G. K.; Kikuchi, T.; Manzanilla-López, R.; Palomares-Rius, J. E.; Wesemael, W. M. L.; Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946-961.

51. Kaplan, D. T.; Keen, N. T.; Thomason, I. J. 1980. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiology and Plant Pathology** v. 16, p. 319-325.

52. Keen, N. T. 1992. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology**, v. 19, n. 1, p. 109-122.

53. Khan, Z.; Son, S. H.; Akhtar, J.; Gautam, N. K.; Kim, Y. H. 2012. Plant growth-promoting rhizobacterium (*Paenibacillus polymyxa*) induced systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 82, n. 7, p. 603-607.

54. Khattak, B. 2008. **Biological management of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Treub) with *Trichoderma harzianum* Rifai in tomato**. NWFP Agricultural University Peshawar, Peshawar, Pakistan. 157 pp.

55. Koornneef, A.; Pieterse, C. M. J. 2008. Cross Talk in Defense Signaling. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 839-844.

56. Korolev, N.; Rav David, D.; Elad, Y. 2008. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **BioControl**, v. 53, n. 4, p. 667-683.

57. Kyndt, T.; Denil, S.; Haegeman, A.; Trooskens, G.; Bauters, L.; van Criekinge, W.; De Meyer, T.; Gheysen, G. 2012. Transcriptional reprogramming by root-knot and migratory nematode infection in rice. **New Phytologist**, v. 196, p. 887–900.
58. Kyndt, T.; Vieira, P.; Gheysen, G.; Almeida-Engler, J. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. **Planta**, v. 238, n. 5, p. 807-818.
59. Lorito, M.; Woo, S. L.; Harman, G. E.; Monte, E. 2010. Translational research on Trichoderma: From 'omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 395-417.
60. Lucena, M. A.; Romero-Aranda, R.; Mercado, J. A.; Cuartero, J.; Valpuesta, V.; Quesada, M. A. 2003. Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. **Physiologia Plantarum**, v. 118, n. 3, p. 422-429.
61. Maag, D.; Kandula, D. R. W.; Müller, C.; Mendoza-Mendoza, A.; Wratten, S. D.; Stewart, A.; Rostás, M. 2013. Trichoderma atroviride LU132 promotes plant growth but not induced systemic resistance to Plutella xylostella in oilseed rape. **BioControl**, v. 58, n. 6, p. 1-12.
62. Marino, D.; Dunand, C.; Puppo, A.; Pauly, N. 2012. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 1, p. 9-15.
63. Martinez, C.; Blanc, F.; Le Claire, E.; Besnard, O.; Nicole, M.; Baccou, J. C. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from Trichoderma longibrachiatum. **Plant Physiology**, v. 127, n. 1, p. 334-344.
64. Melillo, M. T.; Leonetti, P.; Bongiovanni, M.; Castagnone-Sereno, P.; Blevè-Zacheo, T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, v. 170, n. 3, p. 501-512.
65. Mitchum, M. G.; Hussey, R. S.; Baum, T. J.; Wang, X.; Elling, A. A.; Wubben, M.; Davis, E. L. 2013. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. **New Phytologist**, v. 199, n. 4, p. 879-894.
66. Moens, M.; Perry, R. N.; Starr, J. L. 2009. Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford-UK: CABI Publishing. p. 1-17.
67. Molinari, S. 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 311-323.
68. Molinari, S.; Baser, N. 2010. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, v. 29, n. 11, p. 1354-1362.
69. Moran-Diez, E.; Hermosa, R.; Ambrosino, P.; Cardoza, R. E.; Gutierrez, S.; Lorito, M.; Monte, E. 2009. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the Trichoderma harzianum-plant beneficial interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 8, p. 1021-1031.

70. Moreno, C. A.; Castillo, F.; González, A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro, M.; González, C.; Rodríguez, F.; Restrepo, S.; Cotes, A. M. 2009. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 111-120.
71. Mukhtar, T.; Arshad Hussain, M.; Zameer Kayani, M. 2013. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, n. 1, p. 66-76.
72. Naserinasab, F.; Sahebani, N.; Etebarian, H. R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato. **African Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 276-280.
73. Nicol, J. M.; Turner, S. J.; Coyne, D. L.; den Nijs, L.; Hockland, S.; Maafi, Z. T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.; Gheysen, G.; Fenoll, C. (Ed.) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode Interactions**. London: Springer. p. 21-43.
74. Nyczepir, A. P.; Thomas, S. H. 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. (Ed.) **Root-knot nematodes**. Wallingford, UK: CABI Publishing. p. 412-443.
75. Pandey, R.; Mishra, A. K.; Tiwari, S.; Kalra, A. 2011. Nematode inhibiting organic materials and a strain of *Trichoderma harzianum* effectively manages *Meloidogyne incognita* in *Withania somnifera* fields. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 1495-1499.
76. Perazzolli, M.; Dagostin, S.; Ferrari, A.; Elad, Y.; Pertot, I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. **Biological Control**, v. 47, n. 2, p. 228-234.
77. Perazzolli, M.; Roatti, B.; Bozza, E.; Pertot, I. 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. **Biological Control**, v. 58, n. 1, p. 74-82.
78. Pieterse, C. M. J.; Leon-Reyes, A.; Van der Ent, S.; Van Wees, S. C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308-316.
79. Pieterse, C. M. J.; Van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; Van Wees, S. C. M. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, n. 1, p. 489-521.
80. Portillo, M.; Cabrera, J.; Lindsey, K.; Topping, J.; Andrés, M. F.; Emiliozzi, M.; Oliveros, J. C.; García-Casado, G.; Solano, R.; Koltai, H.; Resnick, N.; Fenoll, C.; Escobar, C. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with *Arabidopsis*: a functional role for gene repression. **New Phytologist**, v. 197, n. 4, p. 1276-1290.

81. Quentin, M.; Abad, P.; Favery, B. 2013. Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-7.
82. Rich, J. R.; Keen, N. T.; J., T. I. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. **Physiology and Plant Pathology** v. 10, p. 105–116.
83. Rotblat, B.; Enshell-Seijffers, D.; Gershoni, J. M.; Schuster, S.; Avni, A. 2002. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. **Plant Journal**, v. 32, n. 6, p. 1049-1055.
84. Sagi, M. 2004. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. **The Plant Cell**, v. 16, n. 3, p. 616-628.
85. Sahebani, N.; Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2016-2020.
86. Salas-Marina, M. A.; Silva-Flores, M. A.; Uresti-Rivera, E. E.; Castro-Longoria, E.; Herrera-Estrella, A.; Casas-Flores, S. 2011. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 15-26.
87. Segarra, G.; Casanova, E.; Bellido, D.; Odena, M. A.; Oliveira, E.; Trillas, I. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. **Proteomics**, v. 7, n. 21, p. 3943-3952.
88. Segarra, G.; Van der Ent, S.; Trillas, I.; Pieterse, C. M. J. 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. **Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 90-96.
89. Sharon, E.; Bar-Eyal, M.; Chet, I.; Herrera-Estrella, A.; Kleifeld, O.; Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 687-693.
90. Sharon, E.; Chet, I.; Spiegel, Y. 2009. Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 3, p. 291-299.
91. Sharon, E.; Chet, I.; Spiegel, Y. 2010. *Trichoderma* as a biocontrol agent. In: Davies, K. G.; Spiegel, Y. (Ed.) **Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms**. Berlin: Springer.
92. Sharon, E.; Chet, I.; Viterbo, A.; Bar-Eyal, M.; Nagan, H.; Samuels, G. J.; Spiegel, Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, v. 118, n. 3, p. 247-258.

93. Shores, M.; Yedidia, I.; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v. 95, n. 1, p. 76-84.
94. Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. S. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of systemic resistance in tomato against root-knot nematode. **Plant Pathology Journal**, v. 4, n. 1, p. 21-25.
95. Siddiqui, I. A.; Zareen, A.; Zaki, M. J.; Shaukat, S. S. 2001. Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica* root-knot nematode in okra and mungbean. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 846-848.
96. SILVA, G. S.; SANTOS, J. M.; FERRAZ, S. 1988. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. **Nematologia Brasileira**, v. 12, p. 6-7.
97. Singh, B. N.; Singh, A.; Singh, B. R.; Singh, H. B. 2013. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1-13.
98. Slaughter, A.; Daniel, X.; Flors, V.; Luna, E.; Hohn, B.; Mauch-Mani, B. 2012. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. **Plant Physiology**, v. 158, n. 2, p. 835-843.
99. Spoel, S. H.; Koornneef, A.; Claessens, S. M. C.; Korzelius, J. P.; Van Pelt, J. A. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. **Plant Cell** v. 15, p. 760-770.
100. Stirling, G. R. 1991. **Biological control of plant parasitic nematodes : progress, problems and prospects / by Graham R. Stirling**. Wallingford :: C.A.B International.
101. Suarez, B.; Rey, M.; Castillo, P.; Monte, E.; Llobell, A. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 46-55.
102. Szabó, M.; Csepregi, K.; Gálber, M.; Virányi, F.; Fekete, C. 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p. 121-128.
103. Torres, M. A. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 373-378.
104. Torres, M. A.; Dangl, J. L.; Jones, J. D. G. 2001. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 1, p. 517-522.
105. Tucci, M.; Ruocco, M.; De Masi, L.; De Palma, M.; Lorito, M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 341-354.

106. van den Burg, H. A.; Takken, F. L. W. 2009. Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? **Trends in plant science**, v. 14, n. 5, p. 286-294.
107. van Hulten, M.; Pelsler, M.; van Loon, L. C.; Pieterse, C. M. J.; Ton, J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5602-5607.
108. Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905.
109. Vargas, W. A.; Djonovic, S.; Sukno, S. A.; Kenerley, C. M. 2008. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 28, p. 19804-19815.
110. Vos, C.; Claerhout, S.; Mkandawire, R.; Panis, B.; de Waele, D.; Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce root-knot nematode penetration through altered root exudation of their host. **Plant and Soil**, v. 354, n. 1-2, p. 335-345.
111. Vos, C.; Geerinckx, K.; Mkandawire, R.; Panis, B.; de Waele, D.; Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi affect both penetration and further life stage development of root-knot nematodes in tomato. **Mycorrhiza**, v. 22, n. 2, p. 157-163.
112. Vos, C. M.; Tesfahun, A. N.; Panis, B.; De Waele, D.; Elsen, A. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 1-6.
113. Wegulo, S. N.; Yang, X.-B.; Martinson, C. A.; Murphy, P. A. 2005. Effects of wounding and inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* on isoflavone concentrations in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 4, p. 749-760.
114. Yedidia, I.; Shores, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7343-7353.
115. Yoshioka, H. 2003. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. **The Plant Cell Online**, v. 15, n. 3, p. 706-718.
116. Yoshioka, Y.; Ichikawa, H.; Naznin, H. A.; Kogure, A.; Hyakumachi, M. 2011. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. **Pest Management Science**, v. 68, n. 1, p. 60-66.
117. Zhang, F.; Zhu, Z.; Yang, X.; Ran, W.; Shen, Q. 2013. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 41-48.
118. Zinoveva, S. V.; Vasyukova, N. I.; Ozeretskovskaya, O. L. 2004. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 111-119.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

---

## CONCLUSÕES GERAIS

*Pochonia chlamydosporia*, isolado Pc-10, induz resistência local em raízes de tomateiro à *Meloidogyne javanica*, resultando na redução do número de galhas;

As enzimas polifenoloxidase e peroxidase participam diretamente na resposta de defesa local induzida por *P. chlamydosporia* em raízes de tomateiro à *M. javanica*;

A enzima fenilalanina amônia liase não participa da defesa induzida por *P. chlamydosporia* em raízes de tomateiro à *M. javanica*;

*Trichoderma atroviride*, isolado T11, possui efeito deletério direto sobre *M. javanica*, diminuindo sua penetração no tecido hospedeiro;

*T. atroviride* induz resistência sistêmica à *M. javanica* por meio de colonização das raízes de tomateiro;

A resistência sistêmica interfere no ciclo de *M. javanica* e na formação do sítio de alimentação do patógeno, culminando na redução do número de galhas em raízes de tomateiro;

A sinalização via ácido salicílico (marcada pelo gene PR1) é desencadeada durante a resistência induzida na planta por *T. atroviride*;

A rota do ácido jasmônico (marcada pelo gene LOX1) não participa diretamente na resistência induzida por *T. atroviride* à *M. javanica* em tomateiro;

Os genes TPX1, LERBOH1 e LECHS2, correspondentes à peroxidase, NADPH oxidase e chalcona sintase, respectivamente, participam diretamente da defesa induzida por *T. atroviride* à *M. javanica* em tomateiro;

A resistência induzida por *T. atroviride* é herdada pela progênie das plantas colonizadas pelo fungo, sendo tal resistência mais intensa do que àquela observada nas plantas parentais;

A resistência induzida herdada pelas plantas F1 interfere na formação das galhas e na oviposição de *M. javanica*;

As plantas F1 ativam a sinalização via ácido salicílico, semelhantemente às plantas parentais;

A rota do ácido salicílico atua em maior intensidade nas plantas em ambas gerações analisadas, quando comparada à do ácido jasmônico, fazendo com que os níveis deste se mantenham sempre em patamares menores do que daquele;

Os genes TPX1 e LERBOH1 apresentam-se em estado de priming e participam da resposta de defesa herdada pelas plantas F1 ao parasitismo de *M. javanica*, enquanto

que o estado de priming do gene LECHS2 não foi repassado à progênie das plantas de tomateiro;

As plantas F1 resultantes daquelas que interagiram com ambos organismos (*T. atroviride* e *M. javanica*) prezam pela ativação do seu sistema de defesa em detrimento ao seu desenvolvimento vegetativo, por meio da repressão do gene MYC2.