

EDILTON DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI JUNIOR

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Psidium* spp. AO FITONEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobii* E ANÁLISE *IN SILICO* DE FATORES DE PARASITISMO.

RECIFE-PE

2017

EDILTON DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI JUNIOR

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Psidium* spp. AO FITONEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobii* E ANÁLISE *IN SILICO* DE FATORES DE PARASITISMO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Agronomia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Dra. Luiza Suely Semen Martins – Orientadora – UFRPE
Dr. Rômulo Maciel de Moraes Filho - PNP/UFPE
Dr. Edson Ferreira da Silva - UFRPE

RECIFE-PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C376r Cavalcanti Junior, Edilton de Albuquerque.
Reação de genótipos de *Psidium* spp. ao fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* e análise *in silico* de fatores de parasitismo / Edilton de Albuquerque Cavalcanti Junior. – 2017.
100 f.: il.

Orientadora: Luiza Suely Semen Martins.
Coorientadores: Rômulo Maciel de Moraes Filho, Edson Ferreira da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências e anexo(s).

1. Bioinformática 2. Calreticulina 3. Myrtaceae 4. Nematoides 5. Patogenicidade
6. Resistência I. Martins, Luiza Suely Semen, orient. II. Moraes Filho, Rômulo Maciel de, coorient. III. Silva, Edson Ferreira da, coorient. IV. Título

CDD 630

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Psidium* spp. AO FITONEMATÓIDE *Meloidogyne enterolobii* E ANÁLISE *IN SILICO* DE FATORES DE PARASITISMO.

EDILTON DE ALBUQUERQUE CAVALCANTI JUNIOR

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 05/12/2017.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dra. Luiza Suely Semen Martins
Departamento de Biologia / UFRPE

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Angélica Virgínia Valois Montarroyos
Departamento de Agronomia / UFRPE

Prof. Dr. Rafael Trindade Maia
Universidade Federal de Campina Grande / UFCG

RECIFE-PE

2017

Ofereço

A Deus, pela vida! Com suas dificuldades, decepções e alegrias, sem as quais não seria possível descobrir a força que se tem para exercitar a paciência, perseverança e alegria para ultrapassar as dificuldades a fim de alcançar os objetivos.

A minha mãe, Maria de Lourdes, por demonstrar a sua força pela vida, pelos conselhos e palavras de tranquilidade nas horas necessárias. Ao meu pai Edilton de Albuquerque, com eterna saudade. Por tudo que conseguiram oferecer com seus ensinamentos e com amor incondicional, certo que sempre estarão presentes em minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, sem a qual não seria possível concluir o projeto.

A minha orientadora Prof^a. Luiza Suely Semen Martins pela paciência, orientações e dedicação neste trabalho, tendo meu respeito e admiração.

Ao meu coorientador Dr. Rômulo Maciel de Moraes Filho, pelo aprendizado que proporcionou em bioinformática, os conselhos, as sugestões no planejamento da dissertação e pelos valiosos estímulos na vida acadêmica.

A Dra. Angélica Virgínia Valois Montarroyos pelo incentivo, palavras de conforto e por disponibilizar laboratório para realização das atividades.

Ao Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva, pelos ensinamentos e atenção.

Ao Prof. Dr. Francisco José de Oliveira por confiar em minha determinação e perseverança durante a graduação e mestrado, além disso, por acreditar em um bem maior, a valorização do ser humano! Tendo meu respeito, admiração e gratidão.

A Dra. Jacqueline Wanessa de Lima Pereira pelos incentivos, orientações e por disponibilizar equipamentos e sua equipe de trabalho nas atividades experimentais.

A Deise Silva por seu apoio diário, pela alegria e sorrisos que encantam meus dias. Pela paciência nas horas que estive ausente e, sobre tudo, pelo amor que nos une sem o qual seria difícil em minha jornada, eternamente grato.

As doutorandas Ana Maciel e Jaqueline Gadé pelas orientações e atividades que possibilitaram as condições viáveis para realização do experimento.

Aos meus colegas de mestrado Dulcineia, Gérsia, Jamile, Jaqueline Terto e Sérgio pelo companheirismo e ajuda nas horas necessárias.

Aos estagiários e bolsistas do Curso de Agronomia, certo que sem eles não seria possível à realização deste trabalho.

Aos funcionários permanentes e aos terceirizados da UFRPE que tanto ajudam nas atividades diárias, e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, minha enorme gratidão.

RESUMO

A cultura da goiabeira tem sido severamente atacada pelo fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* (Sin.: *M. mayaguensis*), que tem causado drástica redução de produtividade e, em alguns casos, até perda total de áreas cultivadas. Devido à sua grande gama de potenciais hospedeiros e fácil disseminação, *M. enterolobii* representa um perigo constante e tem se mostrado um dos maiores limitantes para o cultivo da goiabeira no Nordeste brasileiro. A calreticulina (CRT), uma proteína de excreção, altamente conservada em animais e plantas foi identificada nas secreções de diversos parasitas indicando que estão associadas à supressão da imunidade da planta. A bioinformática tem propiciado informações valiosas sobre as biomoléculas e através de análises *in silico*, tem fornecido dados de caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas, predição estrutural e funções das proteínas, além de possibilitar comparações de sequências biológicas de diversas espécies. Os objetivos desta pesquisa foram efetuar a avaliação do parasitismo de *M. enterolobii* em genótipos de araçazeiros e goiabeiras, para futuros estudos de compatibilidade para porta-enxerto de goiabeiras comerciais e caracterizar sequência da proteína calreticulina (CRT), verificar sua conservação filogenética identificando a funcionalidade, localização subcelular e o domínio conservado, bem como, representar por meio de modelagem *in silico* a homologia e estrutura terciária da CRT. Em condições de casa de vegetação, foram avaliados 44 genótipos de araçazeiros oriundos de populações naturais do Estado de Pernambuco e 6 genótipos de goiabeiras. Nas avaliações foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de galhas (IG), fator de reprodução (FR), número de ovos por grama de raiz (OGR) e redução do fator de reprodução (RFR). Considerando os critérios avaliados, os genótipos de araçazeiros REC-DI-A02 e REC-DI-A04 alcançaram os melhores resultados, podendo ser indicados como fonte de resistência à *M. enterolobii* e também como genótipos promissores para testes de enxertia em goiabeira. No estudo *in silico* da proteína CRT foram caracterizadas 15 sequências desta entre nematoides de vida livre, parasitas de plantas e animais, presentes em bancos de dados genômicos. Os resultados obtidos indicaram a presença de cinco domínios funcionais conservados entre as CRTs. Os parâmetros físico-químicos demonstraram que a proteína tem baixa atividade em pH ácido, afinidade em meio aquoso, sendo de caráter

hidrofílico. A análise de agrupamento apresentou consistência com a classificação taxonômica das espécies avaliadas. O modelo 3D da CRT apresentou estabilidade em nível energético, possibilitando a compreensão da estrutura da proteína. Os resultados obtidos sobre a CRT podem fornecer condições para futuros estudos de resistência em plantas contra ataques de nematoides. Os resultados também apontam perspectivas para o entendimento dos fatores de parasitismo do *M. enterolobii* e das proteínas envolvidas, bem como, à busca de porta-enxerto resistente em cultivos comerciais de goiabeira, especialmente na região Nordeste do Brasil, que é de fundamental importância para o agronegócio, tendo em vista as perdas ocorridas nos plantios com as cultivares “Paluma” e “Pedro Sato”.

Palavras-chave: Bioinformática, Calreticulina, Myrtaceae, Nematoides, Patogenicidade, Resistência.

ABSTRACT

The guava crop has been severely attacked by the phytonematode *Meloidogyne enterolobii* (Sin.: *M. mayaguensis*), which has caused drastic reduction of productivity and, in some cases, even total loss of cultivated areas. Due to its wide range of potential hosts and easy dissemination, *M. enterolobii* represents a constant danger and has been shown to be one of the major limitations for the guava cultivation in the Brazilian Northeast. Calreticulin (CRT), a highly conserved excretion protein in animals and plants, has been identified in the secretions of several parasites indicating that they are associated with suppression of plant immunity. Bioinformatics has provided valuable information on biomolecules and, through *in silico* analysis, has provided structural and functional characterization data of genomic sequences, structural prediction and protein functions, as well as comparisons of biological sequences of several species. The objective of this research was to evaluate the parasitism of *M. enterolobii* in *P. guineense* and guava genotypes for future compatibility studies for rootstocks of commercial guavas and to characterize the sequence of the calreticulin protein (CRT), to verify their phylogenetic conservation, identifying functionality, subcellular localization and presence of conserved domains, as well as, develop a tertiary structure model with *in silico* computational homology modeling tools. 44 *P. guineense* genotypes from natural populations of the State of Pernambuco and 6 guava genotypes were evaluated under greenhouse conditions. The genotypes were evaluated by the following parameters: gall index (GI), reproduction factor (RF), number of eggs per gram of root (OGR) and reduction of the reproductive factor (RFR). Considering the evaluated criteria, the *P. guineense* genotypes REC-DI-A02 and REC-DI-A04 achieved the best results and can be indicated as a source of resistance to *M. enterolobii* and also as promising genotypes for grafting tests in guava. In the *in silico* analysis of the CRT protein, 15 proteins sequences from free-living, plant and animal parasitic nematodes, present in genomic databases were characterized. The results also indicated the presence of five functional domains. The analysis of the physical-chemical parameters showed hydrophilic CRTs with low activity at acidic pH. The cluster analysis showed consistency with the taxonomic classification of the evaluated species. We also developed a stable CRT 3D model which may help the understanding of the structure of

this protein. The results obtained on CRT may provide insights for future resistance studies in plants against nematode attacks. The obtained results point out perspectives for understanding of the parasitism factors of *M. enterolobii* and, as well as the search for resistant rootstocks in guava commercial crops, especially in the Northeast region of Brazil, which is of fundamental importance for the agribusiness, in view of the losses occurred in the plantations with the cultivars "Paluma" and "Pedro Sato".

Key words: Bioinformatics, Calreticulin, Myrtaceae, Nematoids, Pathogenicity, Resistance.

.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

%	porcento
µm	micrometro
°Bx	grau Brix
°C	grau Celsius
aa	Aminoácido
<i>ab initio</i>	Método que é capaz de prever a estrutura tridimensional de uma proteína a partir de sua estrutura primária
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local)
ClustalW	Programas de alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos.
cm	centímetro
CRT	Calreticulina
C-score	Ponto de saída do peptídeo sinal
EMBL-EBI	The European Bioinformatics Institute
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FASTA	Formato de arquivo em texto que pode representar códigos de sequências de nucleotídeos ou aminoácidos
FR	Fator de Reprodução
g	grama
GRAVY	Grand average of hydropathicity
ha	hectare
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IG	Índice de Galhas
In	Intracelular
<i>In silico</i>	Experimentação através da simulação computacional, que modela um fenômeno natural
kDa	kilodaltons
L	litro

LSc	Localização Subcelular
m	metro
mL	mililitro
mm	milímetro
ModBase	Database of Comparative Protein Structure Models
NCBI	National Center for Biotechnology Informations
OEPP/EPPO	Organisation Européenne et Méditerranéenne Pour la Protection des Plantes/ European and Mediterranean Plant Protection Organizations
OGR	Ovos por Grama de Raiz
PDB	Protein Data Bank
Pa	Parasita de animal
Pf	População final
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
Pi	População inicial
Pp	Parasita de plantas
RE	Retículo Endoplasmático
RFR	Redução do Fator de Reprodução
SCPS	Sítio de Conservação de Peptídeo Sinal
S-score	Região que contém o peptídeo sinal e a região sem o peptídeo sinal da proteína
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VL	Vida Livre
Y-score	Indica o pico C-score e a região de inclinação sem o peptídeo sinal
Z-score	Indica o nível de energia, informando a qualidade geral do modelo e reconhecimento de possíveis erros

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Páginas

Tabela 1. Cultivares de <i>Psidium guajava</i> L. de maiores representatividades no mercado de Fruticultura	10
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Avaliação de Patogenicidade do <i>Meloidogyne enterolobii</i> Yang e Eisenback em araçazeiros e goiabeiras da região da Zona da Mata do Estado de Pernambuco. UFRPE, Recife-PE, 2017	50
---	----

Tabela 2. Resultado da reação das espécies <i>Psidium guajava</i> L. e <i>Psidium guineense</i> Swartz a ação de parasitismo ao <i>Meloidogyne enterolobii</i> Yang e Eisenback. UFRPE, Recife-PE, 2017	51
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Quinze sequências da Calreticulina (CRT) e suas espécies de origem, obtidas do banco de dados do NCBI	62
--	----

Tabela 2. Estruturas primárias, peptídeo sinal e localização subcelular da Calreticulina (CRT)	63
---	----

Tabela 3. Domínios funcionais identificados pelo servidor ProDom em Calreticulina (CRT)	66
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

	Páginas
Figura 1. Sintomas do parasitismo de <i>Meloidogyne enterolobii</i> : Bronzeamento e amarelecimento das folhas de <i>Psidium</i> spp.	08
Figura 2. Araçá (<i>Psidium guineense</i> Swartz): Aspectos do hábito da planta.	13
Figura 3. Araçá (<i>Psidium guineense</i> Swartz): A - Flores brancas nas regiões axilares da planta; B e C - Frutos em fase de amadurecimento.	13

CAPÍTULO II

Figura 1. Sintomas de infecção causados pelo fitonematóide <i>Meloidogyne enterolobii</i> Yang e Eisenback: Setas verdes indicam a presença de galhas nas raízes dos genótipos araçazeiro (A), Engrossamento de raízes na goiabeira (B), Redução de crescimento do genótipos de araçazeiro 1, 2, 3, 4, 5 e 6, em contraste com o genótipo 7 não inoculado (C) e presença de ovos (setas vermelhas) e J2 (seta amarela) no extrato de raízes dos genótipos inoculados (D).	49
Figura 2. Índice de galhas e fator de reprodução em genótipos de araçazeiro e goiabeira por ação do <i>Meloidogyne enterolobii</i> Yang e Eisenback (A) e correlação entre as variáveis Fator de Reprodução (FR) e Índice de Galhas (IG) (B).	52

CAPÍTULO III

Figura 1. Sequências de aminoácidos com seus pontos de clivagem de peptídeo sinal das espécies pelo servidor SignalP de: <i>Meloidogyne enterolobii</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Caenorhabditis brenneri</i> e	63/64
--	-------

Wuchereria bancrofti. Pontuações de saída: C-score (Ponto de saída do peptídeo sinal), S-score (região que contém o peptídeo sinal e a região sem o peptídeo sinal da proteína), Y-score (indica o Pico C e a região de inclinação sem o peptídeo sinal).

Figura 2. Alinhamento múltiplo de sequências de Calreticulina (CRT). 64

Figura 3. Função Molecular (A) e Processos Biológicos (B) de Calreticulina (CRT). 65

Figura 4. Domínio funcional com relação à Calreticulina (CRT) observados pelo servidor ProDom. 65

Figura 5. Previsão dos efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor (SNAP2). Seta em vermelho indica a posição do aminoácido cisteína (C), seta em amarelo indica a posição do aminoácido triptofano (W). 66

Figura 6. Agrupamento encontrado no cladograma das espécies relacionadas com base na Calreticulina (CRT). Nematoides fitoparasitas são indicados por círculos verdes, nematoides de vida livre por círculos azuis e parasitas de animais por círculos vermelhos. 67

Figura 7. Estrutura tridimensional predita pelo servidor Phyre2 para a Calreticulina (CRT) da espécie *Meloidogyne enterolobii*. 68

Figura 8. Validação do modelo Me-CRT. 69

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A CULTURA DA GOIABEIRA.....	4
2.1.1 Aspectos botânicos.....	4
2.1.2 O Gênero <i>Psidium</i>	5
2.1.3 A espécie <i>Psidium guajava</i> L., aspectos botânicos e econômicos.....	6
2.1.4 Meloidoginose na goiabeira.....	7
2.1.5 Recursos genéticos e melhoramento genético da goiabeira.....	9
2.2 A CULTURA DO ARAÇAZEIRO.....	11
2.2.1 Aspectos botânicos, morfológicos e climáticos.....	11
2.2.2 <i>Psidium guineense</i>	13
2.2.3 Recursos genéticos do araçazeiro.....	14
2.3 FITONEMATÓIDES.....	15
2.3.1 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.....	17
2.3.2 Meloidoginose.....	18
2.4 ANÁLISES IN SILICO.....	21
2.4.1 Fatores de Parasitismo.....	26
2.4.2 Calreticulina.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
CAPÍTULO II - REAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GÊNERO <i>PSIDIUM</i> spp. AO FITONEMATÓIDE <i>MELOIDOGYNE ENTEROLOBII</i>	43
ABSTRACT.....	44

RESUMO	45
INTRODUÇÃO	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	53
LITERATURA CITADA.....	53
CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE CALRETICULINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE NEMATÓIDES COM USO DE FERRAMENTAS <i>in silico</i>	57
RESUMO	58
ABSTRACT	59
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
RESULTADOS.....	62
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	76
Normas do Capítulo I	77
Normas do Capítulo II	80
Normas do Capítulo III	81

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* possui aproximadamente 150 espécies destacando-se, principalmente, pela espécie *Psidium guajava* L. (goiaba), devido a sua grande importância econômica, e tendo o Brasil como um de seus maiores produtores comerciais (Rodríguez et al. 2010). Destacam-se também dentro do gênero as espécies *P. cattleianum* Sabine (araçá-doce, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa) e *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (araçá-verdadeiro ou araçá azedo) (Pereira e Nachtigal 2003).

A goiabeira é uma frutífera perene que possui frutos ricos em vitamina C e sais minerais, bastante apreciados no mercado nacional e internacional (Gonzaga Neto 2007). O araçazeiro, encontrado em diversas regiões geográficas do território nacional, possui frutos menores, mais ácidos, com diversas propriedades farmacológicas e com aroma mais acentuados (Vieira et al. 2006).

Tanto as goiabas quanto os araçás podem ser consumidos *in natura* ou processados (Franzon et al. 2009). Apesar das diversas qualidades nutricionais dos araçás, a espécie é pouco explorada comercialmente. A grande maioria dos pomares são encontrados de forma espontânea em diversas regiões do país. Entretanto, a expansão urbana vem ameaçando sua preservação e ocasionando à perda deste material genético tão pouco estudado (Brandão et al. 2002). Iniciativas de produção comercial de araçazeiros tem sido implementadas com o lançamento de novos cultivares. A Embrapa Clima Temperado desenvolveu duas cultivares: Ya-cy e Irapuã que estão sendo testadas em escala experimental por empresas privadas para a produção de sorvetes (Coradin et al. 2011).

A fruticultura nacional tem sofrido perdas decorrentes de ataques de pragas e doenças. No que concerne à cultura da goiabeira, o nematoide das galhas, *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback (Sin.: *M. mayaguensis*) tem se destacado devido à sua agressividade, ocasionando perdas de até 100% da produção e redução significativa dos pomares (Maranhão et al. 2003, Torres et al. 2005, Macedo et al. 2013, Souza et al. 2014a). Observa-se nas plantas atacadas a formação de galhas,

morte das pontas das raízes e paralisação do crescimento. Também se observa depauperamento e declínio lento das plantas, deficiência nutricional, diminuição do tamanho das folhas e frutos e a consequente redução da produtividade (Martins et al. 2013). As medidas convencionais de controle da meloidoginose como o uso de nematicidas, têm demonstrado pouca eficácia, ocasionando custo elevado para o produtor e danos ao meio ambiente (Sharma 2003). O uso de variedades resistentes pode ser uma alternativa vantajosa e econômica. Para tanto, espécies pertencentes à família Myrtaceae resistentes a *M. enterolobii* possibilitariam seu uso como porta-enxerto para as cultivares comerciais de goiabeira (Souza et al. 2014a).

Diversas pesquisas envolvendo melhoramento genético de fruteiras têm associado técnicas clássicas e ferramentas biotecnológicas objetivando aumentar a eficiência de seleção e caracterização de germoplasma. Trabalhos sobre caracterização molecular de acessos de goiabeira e araçazeiros a reação ao *M. enterolobii* apontam a possibilidade desses serem utilizados como porta-enxertos para cultivares comerciais de goiabeira (Souza et al. 2014b).

Apesar das perdas causadas por fitopatógenos, o agronegócio é uma das áreas da economia mundial que mais tem crescido e fomentado divisas, sendo a fruticultura uma vertente que a cada ano alcança bons índices de produtividade (OCDE/FAO 2015). Uma das regiões do território nacional que merece destaque é o Nordeste, principalmente, a região do Submédio do Vale do São Francisco, com excelentes condições climáticas para fruticultura.

O polo irrigado de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) tem correspondido a 50% das exportações de frutas brasileiras, destacando-se manga (*Mangifera indica*) e uva (*Vitis* spp.) com percentuais de 95% de exportação (Reetz et al. 2015). A produção de uva tem impulsionado a de outras frutas, como a goiaba (*P. guajava*), cuja produção nacional, em 2016, alcançou a ordem de 414.960 toneladas/fruta utilizando-se de uma área produtiva de 17.179 hectares, no qual o Nordeste contribuiu com 191.078 toneladas/fruta em uma área de 8.412 hectares, onde a maior quantidade da produção nacional foi destinada ao mercado interno (IBGE, 2016).

Com o advento da bioinformática, um ramo multidisciplinar das ciências, que une esforços da informática, biologia, estatística, química e física, entre outras áreas, a partir da análise de suas sequências com ferramentas e programas específicos é possível comparar genes de organismos relacionados, traçar perfis de expressão de genes e vias de interesse, fazer previsões da estrutura e função de proteínas, entre outros. Assim sendo, análises *in silico* (experimentação através da simulação computacional, que modela um fenômeno natural) são indispensáveis para a identificação, caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas, possibilitando assim a previsão de estruturas e funções de proteínas. Este tipo de experimentação representa uma alternativa de baixo custo para estudos sobre funções biológicas com modelos computacionais bastante precisos, quando comparados com as condições naturais, e mais especificamente, podem auxiliar na busca de genes ligados ao parasitismo e à resistência nas espécies hospedeiras (Darabi e Seddigh 2015, Moraes Filho e Martins 2016).

Os objetivos desta pesquisa foram avaliar o parasitismo de *M. enterolobii* sob genótipos de araçazeiros e goiabeiras, para futura avaliação de compatibilidade para porta-enxerto de goiabeiras comerciais e proceder análises *in silico* de sequências de proteínas de fatores de parasitismo de *M. enterolobii* depositadas em bancos de dados públicos, visando uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção do fitonematóide.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA GOIABEIRA

2.1.1 Aspectos botânicos

A goiabeira (*P. guajava* L.), pertencente à classe das dicotiledôneas, família da Myrtaceae, é uma frutífera bastante apreciada e cultivada em diversas regiões do mundo. Provavelmente originada das regiões Tropicais da América, a espécie foi levada por espanhóis do Pacífico para as Filipinas, posteriormente para Índia e Arquipélago Malaio, chegando ao Havaí e África do Sul. Devido a fácil dispersão de suas sementes por pássaros, animais e o próprio homem, a goiabeira pode ser

encontrada em áreas quentes da América Tropical e Subtropical (Pommer et al. 2013). Possui duas grandes subfamílias a Myrtoideae, com ampla distribuição, sendo o gênero *Psidium* um dos representantes e a Leptospermoideae, encontrada na Austrália, Malásia e Polinésia, tendo como representantes os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Syzygium*. (Costa e Costa 2003).

Com o avanço dos estudos moleculares uma nova classificação infrafamiliar foi proposta, levando em consideração análise molecular em Myrtaceae com seus parentes próximos, onde foi analisado as bases de sequências parciais do gene matK, apresentando as sub-famílias Myrtideae (com frutos bacóides e filotaxia oposta), e a Psiloxylloideae (com frutos capsulados secos e filotaxia alterna) (Wilson et al. 2001, 2005).

A família Myrtaceae possui cerca de 140 gêneros e mais de 3100 espécies (Soares-Silva 2000). Algumas espécies dentro desses gêneros merecem ser destacadas. A Feijoa (*Acca sellowiana* Berg), conhecida popularmente como goiabasserrana ou goiaba-do-mato, sendo a única representante do gênero; No gênero *Eugenia*, encontra-se a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), sendo seu fruto bastante apreciado para consumo *in natura*, polpa e sucos; No gênero *Plinia*, temos a jaboticabeira ou jaboticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.)); O gênero *Psidium* contempla a goiabeira (*P. guajava* L.) e o araçazeiro (*Psidium* spp.) como principais representantes (Manica et al. 2000). Além de frutos para consumo à família Myrtaceae também pertence o eucalipto (*Eucalyptos* spp.), muito utilizado em reflorestamento, na produção de madeira com exploração comercial sustentável, na fabricação de móveis e extração de aromatizantes (Sampaio et al. 2011).

2.1.2 O Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* tem como principal representante a goiabeira, entretanto, outras espécies merecem destaque, como *P. cattleyanum* Sabine (araçá-comum, araçá-de-praia ou araçá-de-coroa); *P. guineense* Swartz ou *P. araçá* Raddali (araçá-verdadeiro ou araçá azedo) (Soares-Silva 2000). O genoma básico do gênero *Psidium* possui n=11 cromossomos, logo, a fase diplóide corresponde a 2n=22 cromossomos. Estudos genéticos, também, comprovaram a existência de aneuploides com 2n=21 e

$2n=30$ (Costa e Costa 2003). Outras pesquisas mencionam a ocorrência de tetraplóides com $4n=44$ cromossomos em *P. guajava* L. (Manica et al. 2000).

2.1.3 A espécie *Psidium guajava* L., aspectos botânicos e econômicos

A goiabeira, frutífera perene, considerada um arbusto ou árvore de pequeno porte podendo atingir de 3 a 10 m de altura, por 5 a 6 m de copa, tais dimensões podem variar em virtude das condições nutricionais e edafoclimáticas da região que, conseqüentemente, interferem no desenvolvimento vegetativo (Manica et al. 2000). O sistema radicular é constituído por 77% das raízes de diâmetro fino, o que facilita a penetração no solo para absorção de nutrientes (Medina 1998). O caule tem coloração castanho-roxo, liso, fino com 15 a 25 cm de diâmetro e brilhante, contendo de 28 a 30% de tanino, composto utilizado nas indústrias farmacêuticas como cicatrizante, antidiarreicos e antioxidante, também sendo utilizado nas indústrias de calçados para curtir couro (Manica et al. 2000).

As folhas variam entre 5 a 15 cm de comprimento, por 3 a 7 cm de largura com coloração verde-amarelada, opostas, oblongo e semicaducifolias (Piza Junior 1994, Pereira 1996, Kavati 1997). As flores são hermafroditas, perfeitas, de cor branca (com quatro ou cinco pétalas), androceu com estames longos e numerosos (340 em média), pistilo central, cálice resistente, gineceu com ovário ínfero, plurilocular, com vários óvulos. Inflorescência dicásio, podendo haver autofecundação (devido à condição hermafrodita) ou fecundação cruzada com auxílios dos agentes polinizadores (Sampaio et al. 2011).

Os frutos possuem diversas formas (globosa, ovóide ou periforme), peso entre 50 a 800 g e sementes monoembriônicas (Gonzaga Neto 2007). São aromáticos e doces, apresentam compostos fenólicos, vitamina C e betacarotenos que auxiliam a cicatrização de feridas, atuam na absorção de ferro, combatem os radicais livres e impedem a formação de coágulos sanguíneos nas artérias (Gutiérrez et al. 2008).

A goiabeira possui ampla distribuição no território nacional devido a sua fácil adaptabilidade às condições de cada região. Contudo, seus domínios fitogeográficos dão-se na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Adequa-se a solos arenos-argilosos, profundos e bem drenados com pH entre 5,5 a 6,8. Suporta algum déficit

hídrico, podendo ser encontrada em regiões ao nível do mar ou a altitudes de 1700 m. A temperatura média para o cultivo é de 25 °C, pois não tolera frio ou geada (Gonzaga Neto et al. 2001). Segundo Natale et al. (2009), a temperatura é um dos fatores fundamentais no desenvolvimento do fruto e de sua qualidade.

Os países, além do Brasil, que se destacam na produção de goiaba são Austrália, África do Sul, Egito, Jamaica, México, Paquistão e Quênia. No Brasil os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco (região do Submédio do Vale do São Francisco) são os maiores produtores desse fruto (Gonzaga Neto 2007, Reetz et al. 2015).

O Semiárido do Nordeste brasileiro tem demonstrado condições propícias para as atividades do agronegócio, nesta região fatores climáticos favoráveis como alto índice de luminosidade/dia, solo bem drenado e utilização de sistemas de irrigação têm-se alcançado altos índices de produtividade, sendo, atualmente, chamado por alguns de oásis da fruticultura. A produção brasileira de goiaba destina-se quase que totalmente ao mercado interno na produção de doces, sucos, geleias e polpa congeladas, que vem aumentando significativamente nos últimos anos (Jesus 2015). Segundo Reetz et al. (2015), o Brasil exportou em 2014 um volume de 170.776 kg de goiaba, correspondendo a uma receita de US\$ 443.961.

Entretanto, segundo dados da Sociedade Brasileira de Nematologia o agronegócio em 2015 sofreu perdas consideráveis, de até R\$ 35 bilhões, causadas pelo ataque de fitonematóides. Um exemplo disso foi na produção de soja (*Glycine max*) com queda de R\$ 16,2 bilhões (Machado 2015).

2.1.4 Meloidoginose na goiabeira

Doenças e pragas têm acarretado grande prejuízo para diversas culturas, não sendo diferente na goiabicultura, onde todas as fases fenológicas são suscetíveis a tais ações. Entre as principais doenças encontradas na goiabeira destacam-se: a meloidoginose (*M. enterolobii*), a bacteriose (*Erwinia psidii*), a ferrugem (*Puccinia psidii*), antracnose (*Glomerella cingulata*), pinta-preta (*Guignardia psidii*) e podridão apical (*Dothiorella dominicana*) (Sampaio et al. 2011). As principais pragas da goiabeira são

lagarta da broca-das-mirtáceas (*Timocratica albella* Zeller), coleobroca (*Trachyderes thoracicus* Oliv.), gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshal), as moscas-das-frutas (*Anastrepha obliqua* Macq. e *Ceratitis capitata* Wied.), psílideo (*Triozioida limbata*), entre outras (Natale et al. 2009).

Na cultura da goiabeira são encontrados diversos limitadores que afetam a produtividade, entre esses o nematoide *M. enterolobii* tem-se destacado e provocado grandes danos a essa cultura, e quando ocorre a associação sinérgica entre *M. enterolobii* e o *Fusarium solani* (Mart) acarretam enormes prejuízos econômicos chegando, inclusive, a perda de 100% dos pomares (Natale et al. 2009, Sampaio et al. 2011).

O parasitismo de *M. enterolobii*, que leva a formação de galhas, acarreta o engrossamento das raízes paralisando o crescimento da planta, deste modo, limitando o desenvolvimento da parte aérea que vem a apresentar bronzeamento, amarelecimento (Figura 1), queda das folhas, comprometendo todo processo fotossintético que levam à planta a morte (Gomes et al. 2008b).



Fonte: Acervo Pessoal

Figura 1. Sintomas do parasitismo de *Meloidogyne enterolobii*: Bronzeamento e amarelecimento das folhas de *Psidium* spp.

Inicialmente, este fitoparasita foi classificado como *M. mayaguensis*, porém através de estudos morfológicos realizados por Xu et al. (2004), utilizando uma vasta quantidade de hospedeiros, pelo uso de marcadores isoenzimáticos, com as enzimas Esterase (EST) e Malato Desidrogenase (MDH), e uso de sequências de mtDNA, propuseram uma nova denominação desse fitoparasita: *Meloidogyne enterolobii* YANG e EISENBACK.

2.1.5 Recursos genéticos e melhoramento genético da goiabeira

O banco de sementes Svalbard Global Seed Vault, considerado o maior do mundo, na Noruega, com apoio da FAO, até o ano 2020 pretende ter um quarto de todas as espécies botânicas do mundo para preservação da biodiversidade. Entretanto, a realidade no Brasil é diferente. Espécies do gênero *Psidium* não são bem representadas em Bancos de Germoplasmas, apenas o Instituto Agrônomo de Campinas – IAC mantêm coleções de goiabeira. Nas coleções de araçazeiros em BAG destacam-se as coleções da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas-RS e da Embrapa do Semiárido de Pernambuco (Pommer et al. 2013).

No campo de pesquisa e melhoramento genético devem-se ressaltar os trabalhos realizados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que pesquisaram técnicas de práticas culturais e fitossanitárias para o controle de doenças bacterianas e produção em larga escala da goiabeira (Pereira e Kavati 2011). Projetos realizados pela UNESP (Jaboticabal-SP) utilizando a técnica de seleção massal, com materiais genéticos de goiaba, de diversas regiões, possibilitaram a criação de variedades que atenderam as indústrias de transformação. Tais pesquisas resultaram no lançamento das variedades Paluma e Rica. Nos projetos de pesquisa em cruzamento controlado entre as melhores plantas, obteve-se a variedade Século XXI. Na questão da produtividade, como a produção de mudas por sementes não foram obtidas a fixação de variedades, consequentemente novas técnicas de propagação foram estudadas, entre elas a estaquia (Pereira e Kavati 2011).

Foram lançadas várias cultivares e/ou variedades de goiabeiras, porém algumas poucas dezenas são exploradas para o comércio. Algumas foram popularizadas apenas

em determinadas regiões onde são comercializadas. Na Tabela 1 estão listadas as cultivares que possuem maiores representatividade nos mercados consumidores devido a suas características (Watlington 2006, Mendonça 2012).

Tabela 1 – Cultivares de *Psidium guajava* L. de maiores representatividades no mercado de fruticultura

Cultivares	
<p>Paluma - Planta selecionada de população segregante de polinização aberta de Rubi-Supreme (UNESP, Brasil). Tendo como característica alta produtividade, vigorosa, boa tolerância à ferrugem (<i>Puccinia psidii</i> Wint.). Os Frutos são grandes, peso de 200 g ou mais, piriforme; com casca lisa, cor amarela quando madura; polpa de intenso vermelho escuro, firme, grossa (1,3 a 2,0 cm); muito bom sabor, graças ao alto teor de sólidos solúveis (10 °Bx), tem poucas sementes. É a cultivar mais plantada no Brasil.</p>	<p>Rica - Planta de polinização aberta de Supreme (UNESP, Brasil), plantas vigorosas e altamente produtivas, frutos ovais a piriformes, com um peso médio de 100 a 250 g; casca verde-amarela, levemente rugosa; polpa vermelha, espessa e firme; sabor muito agradável (11 °Bx) e baixa acidez; poucas e pequenas sementes.</p>
<p>Pedro Sato - Cultivar selecionada por produtores a partir de pomares constituídos por plantas propagadas por sementes, provavelmente de Ogawa Vermelha N° 1, no Rio de Janeiro. Plantas vigorosas com produções relativamente altas; frutos levemente ovais, boa aparência (150 a 280 g), algumas vezes alcançando 400 g em ramos raleados; casca bem rugosa; polpa rosada, espessa e firme; sabor agradável e poucas sementes.</p>	<p>Ruot hong da lang – Os frutos têm formato de pera, 400 g, com casca lisa, espessura da polpa de 1,3 a 1,4 cm, sabor agridoce, quantidade de sementes pequena a média, polpa rosa.</p>
<p>Kumagai – Cultivar de mesa predomina nos pomares de São Paulo, frutos arredondados a oblongos de 300 g a 400 g, polpa branca.</p>	<p>Século XXI – A seleção obtida através do cruzamento entre Supreme-2 e Paluma, realizada na UNESP em 2003, obtiveram uma cultivar com grande produtividade apresentando ciclo de apenas 130 dias do florescimento a colheita. Fruto saboroso, pesando em média 200 g, polpa rósea-avermelhada e suas sementes são pequenas.</p>
<p>Lalit – Os frutos são de tamanho médio (185 g), tendo como atrativo a cor amarelo-açafrão a vermelho. Sua polpa é firme e rosada com bom equilíbrio agridoce.</p>	<p>Sassaoka – Cultivar de mesa, frutos arredondados, grandes, casca grossa, polpa rosa-claro, firme e com poucas sementes.</p>
	<p>Xa ly nghe - Os frutos têm formato de pera, 260 g, com casca rugosa, polpa branca de 1,5 a 1,6 cm de espessura, sabor agridoce e sementes pequena a média.</p>
	<p>Xa ly don - Os frutos são arredondados, peso de 270 g, com casca meio áspera, espessura da polpa de 1,4 a 1,5 cm, sabor agridoce, quantidade de sementes pequena a média, polpa branca.</p>

A análise das diferenças morfológicas encontradas em *P. guajava* L, justificam a quantidade de cultivares que são utilizados no mercado mundial. A forma da copa, a produtividade, a época de produção (precoce, meia estação e tardia), o número, tamanho e formato do fruto, coloração da polpa, aspectos físico-químicos e a resistência às doenças e pragas, são elementos que evidenciam tal diversidade (Sampaio et al. 2011). No Brasil as cultivares Pedro Sato, Kamugai, Sassaoka e Cortibel têm maiores representatividades no Sudeste, enquanto a Paluma e Pedro Sato no Nordeste, onde seus frutos são comercializados para consumo *in natura* (Flori 2016).

Outro ponto de grande relevância é quanto ao destino da produção no mercado de frutas *in natura*. A preferência dá-se por frutas firmes, com casca grossa e resistente, polpa espessa, baixa acidez e um bom tempo em prateleira. (Costa e Costa 2003, Natale et al. 2009, Sampaio et al. 2011). Dados do IBGE (2016), demonstram que o mercado internacional tem comercializado goiabas de polpa branca e de polpa vermelha, enquanto no mercado interno a preferência dá-se pelo fruto de polpa vermelha ou rosada. Há uma demanda para exportação de goiabas de polpa branca no mercado de frutas frescas e derivados do processamento de goiabas vermelhas. Fato que em 2013, o Brasil foi o terceiro em exportação de goiabas para os Estados Unidos, ficando atrás do Equador e a República Dominicana (Flori 2016).

2.2 A CULTURA DO ARAÇAZEIRO

2.2.1 Aspectos botânicos, morfológicos e climáticos

O araçá encontrado em diversas regiões geográficas do território nacional é originário da América do Sul. O termo araçá é de origem tupi guarani onde “Ará = fruta e açá = olhos”, significando frutas que tem olhos. Referindo-se também às sépalas persistentes que parecem formar cílios (Brandão et al. 2002). Seus frutos, menores e mais ácidos que a goiaba podem ser consumidos *in natura*, como também usados na produção de doces, geleias, marmeladas de araçá e compotas (Franzon et al. 2009).

Dentre as principais espécies destacam-se *Psidium guineense* Swartz e *Psidium cattleyanum* Sabine, (Manica et al. 2000, Vieira et al. 2006). O destaque a essas duas espécies dão-se em virtude das características de seus frutos, cujo sabor exótico e alto

teor de vitamina C, substâncias antioxidantes e óleos essenciais têm tido grande aceitação ao mercado consumidor, conseqüentemente, despertando a atenção da indústria farmacêutica (Franzon et al. 2009). Devido à diversidade de espécies do gênero *Psidium*, muitas podem ser utilizadas com fins comerciais na produção de doces, polpas e derivados ou consumidas *in natura* como: *P. australe* Cambess., *P. acutangulum* DC., *P. longipetiolatum* Legrand e *P. cinereum* Mart. ex DC. (Demattê 1997).

A distribuição geográfica dessas espécies é bastante ampla podendo ser encontrada na América do Sul, Sul do México até Norte da Argentina, América Tropical, Uruguai, Antilhas (Brandão et al. 2002). *Psidium acutangulum*, conhecido como araçá-pera, araçá-pitanga e araçanduba, é espécie nativa da Bacia da Amazônia, estando presente na Colômbia, Peru, Guianas Inglesa e Francesa (Donadio et al. 2002). *P. guyanense* e *P. riparium*, segundo Bezerra et al. (2006), são conhecidas como goiabada-praia ou araçá-da-mata, ocorrem na transição com a Floresta Amazônica; *P. striatum* ocorre na Bacia Amazônica e também na Bacia do Rio da Prata; *P. rufum*, conhecido como araçá-roxo e *P. myrtoides* são espécies florestais que ocorrem na Floresta Atlântica e em matas de galeria da Região Sul do Cerrado e *P. oligospermum* ocorre na transição com a Caatinga (Bezerra et al. 2006).

Uma das características dessas espécies é resistência a ambiente com pouca condição hídrica, entre essas temos o *P. myrsinites* DC. e *P. hians* (Mart.), esse conhecido como araçá da caatinga. Possibilitando, inclusive, seu uso para a recuperação de ambientes degradados (Franzon et al. 2009). Contudo, essas espécies têm perdido espaço para crescimento urbano e explorações agrícolas no País, sem que haja estudos que assegurem esse patrimônio genético (Brandão et al. 2002).

A morfologia do gênero *Psidium*, é caracterizada por apresentar folhas simples e opostas, flores pentâmeras, dicásio, solitárias em pequenos racenos ou axilares, botões florais, quando maduros, variam de 4 mm a 15 mm; cálice capuliforme, caliptrato, e algumas vezes, apendiculado; pétalas livres e alternadas, de cor branca ou creme, muitos estames (60 até 320), ovário ínfero, com 2 ou 5 lóbulos podendo haver muitos óvulos por lóculos e frutos com muitas sementes (Soares-Silva e Proença 2008).

2.2.2 *Psidium guineense*

Arbusto de pequeno porte, podendo chegar a 1,5 metros de altura, com caule de casca lisa, folhas simples com nervuras salientes e margens onduladas, possui flores brancas nas regiões axilares (Figura 2 e 3). Seus frutos de cor amarela, em forma de bagas ovoides ou oblongas, têm polpa de ótima palatabilidade, e possui de 22 a 250 sementes. O período de floração do *P. guineense* está inter-relacionado com as condições edafoclimáticas (Franzon et al. 2009, Damiani et al. 2012).



Figura 2. Araçá (*Psidium guineense* Swartz): Aspectos do hábito da planta.

Sua distribuição geográfica é bastante ampla, sendo encontrada na América do Sul, Guatemala, Caribe, Peru, Argentina, México, Nicarágua e Madagascar. No Brasil é distribuída em todas as regiões. No Nordeste apresenta-se no litoral, Zona da Mata e tabuleiros costeiros (Mattos 1993, Demattê 1997).



Figura 3. Araçá (*Psidium guineense* Swartz): A - Flores brancas nas regiões axilares da planta; B e C – Frutos em fase de amadurecimento.

Segundo Melo et al. (2013), em estudo de caracterização física e química dos frutos de *P. guineense*, relatam que os estádios de maturação não alteram os parâmetros relacionados à massa de frutos inteiro e de rendimento de polpa, não exigindo, portanto, uma classificação dos frutos por tamanho. Entretanto, o rendimento da polpa do fruto maduro é baixo em comparação com outros do mesmo gênero sendo de 39,98%, 67,93% e 68,6% a 74,4% para *P. guineense*, *P. acutangulum* (araçá-pera) e *P. guajava* (goiaba), respectivamente.

De acordo com Lederman et al. (1997), a produção do *P. guineense* no Estado de Pernambuco se concentra na Zona da Mata, cujo índice pluviométrico é, em média, 1.900 mm anuais. Essa espécie possui duas safras, uma nos meses de fevereiro a março, outra em agosto a setembro. O florescimento pode ocorrer durante todo o ano, com picos na época de menor pluviosidade.

2.2.3 Recursos genéticos do araçazeiro

Pesquisas relacionadas à preservação dos recursos genéticos dos araçazeiros têm sido desenvolvidas pela Embrapa Semiárido, principalmente visando à obtenção de híbridos de araçá com goiabas resistentes ao *M. enterolobii*. O pesquisador Dr. Carlos Antônio Fernandes Santos junto ao projeto International guavamap desenvolvido pela Embrapa, CNPq e Comunidade Europeia, realizaram 1200 cruzamentos com espécies de *Psidium* (goiabas e araçás) coletadas em várias regiões do Brasil, resultando um híbrido assinalado como resistente ao *M. enterolobii* (BRASIL 2014).

Desses acessos, seis de goiabas e seis de araçazeiros foram cruzados e demonstraram que 10 plantas do cruzamento entre GUA 161 PE x ARA 138 RR todas foram resistentes ao nematoide, e entre os cruzamentos GUA 161 PE x ARA153 BA, sete foram consideradas como suscetíveis. Confirmando que existe variabilidade entre e dentro de acessos de *P. guineense* para a resistência ao *M. enterolobii*, e que os híbridos interespecíficos resistentes apresentam crescimento similar ao da goiabeira, bem como alta compatibilidade com a Paluma (Costa et al. 2012).

2.3 FITONEMATÓIDES

A produção de goiabas no Brasil, em 2016, alcançou a margem de 414.960 toneladas em uma área produtiva de 17.179 hectares. Tendo destaque à região Nordeste cuja produção foi de 191.078 toneladas, enquanto, a região Sudeste foi inferior, alcançando 186.100 toneladas da fruta (IBGE, 2016).

Considerando a expressiva produtividade de frutos nas diversas regiões brasileiras, fatores fitossanitários tem se tornado limitadores para o aumento da produção, o que tem ocasionado grandes desafios a serem superados. Entre eles destacam-se as pragas como a lagarta da broca-das-mirtáceas (*Timocratica albella* Zeller), coleobroca (*Trachyderes thoracicus* Oliv.), gorgulho-da-goiaba (*Conotrachelus psidii* Marshal), as moscas-das-frutas (*Anastrepha obliqua* Macq., *Ceratitidis capitata* Wied.), e quanto às doenças, além da ferrugem e da antracnose, os nematoides do gênero *Meloidogyne* veem afetando consideravelmente a produção de goiaba no Brasil (Natale et al. 2009).

Nematoides são vermes cilíndricos e alongados que podem ser divididos em três grupos: os de vida livre, os zooparasitas e os fitoparasitas. Os fitonematóides correspondem 15% das espécies descritas dentro do filo Nematoda (Ferraz e Brown 2016). Classificados como migratórios ou sedentários, se reproduzem e alimentam-se em plantas vivas podendo migrar no interior das raízes ou na rizosfera (Nunes et al. 2010). Tendo como alvo preferencial o sistema radicular das plantas ou órgãos subterrâneos como tubérculos e rizomas, alguns, atacam as partes aéreas (caule, folhas e frutos), porém, em menor proporção comparada com as outras (Trigiano et al. 2010).

Apesar da necessidade de parasitismo, os fitonematóides possuem a capacidade de se moverem livremente entre as partículas do solo pela água, tal capacidade é influenciada pelas propriedades morfológicas do solo como: tamanho das partículas, diâmetro dos poros, espessura do filme de água no solo e textura. A movimentação do juvenil (J2) entre as partículas do solo diminui à medida que a percentagem de argila e silte aumentam na textura, quando há 30% de argila, além do silte, tal mobilidade cessa

(Barros et al. 2016). Tais informações corroboram com Trigiano et al. (2010) e Fajardo et al. (2011), que também afirmam que a textura do solo é um dos principais fatores que influenciam a distribuição das espécies *Meloidogyne*.

As espécies do gênero *Meloidogyne*, possuem dimensões microscópicas que variam entre 300 μm a 400 μm de comprimento por 15 μm – 35 μm de diâmetro, existindo dimorfismos entre as fêmeas e machos, sendo esses menores que as fêmeas (Trigiano et al. 2010). Tendo ampla gama de hospedeiros, podem atacar importantes culturas na agricultura, olericultura, fruticultura e ornamentais. Os ataques são mais frequentes em regiões de climas quentes e úmidos, devido ao fato dos nematoides não poderem regular a temperatura interna do seu corpo (Campos 2000).

As primeiras informações sobre os nematoides parasitas de plantas datam de 1743, quando Turbevil Needham descreveu um organismo encontrado em grãos de trigo anormais (cockles - cor escura e tamanho reduzido) após a dessecação do cereal, sendo tal parasita descrito como *Vibrio tritici*, atualmente classificado como *Anguina tritici* (Ferraz e Brown 2016). Em 1855, M.J. Berkeley relatou vermes associados à formação de engrossamento das raízes de plantas, classificando-os como nematoides das galhas (*Heterodera radiculicola*). Em 1877, Jobert em estudos sobre a diminuição da produção nos cafezais no Rio de Janeiro associou a doença ao ataque deste fitonematóide. No mesmo ano, Emílio A. Goldi, no Brasil, propôs que tal agente patogênico fosse classificado como *Meloidogyne exigua*, o que não foi muito bem aceita na época, tornando a ter nova classificação em 1939 como *Heterodera marioni*. Só em 1949 que Chitwood classificou os quatro principais representantes do gênero *Meloidogyne* (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica*), separando-os pelas marcas cuticulares na região perineal (Freitas 2009, Ferraz e Brown 2016).

Os corpos dos fitonematóides são arranjados em forma de tubo contido dentro de uma cutícula flexível. A forma do corpo é predominante filiforme (ou fusiforme), entretanto, pode-se encontrar em fêmeas maduras outros formatos aberrantes (como rim, esfera, limão). No gênero *Meloidogyne*, o juvenil de segundo estágio (J2), fase em que já parasita o hospedeiro, muda à forma para salsichoide, por induzir sítios especiais

de alimentação nos órgãos parasitado, que em seguida tornam-se sedentários (Ferraz e Brown 2016).

Sem sistema respiratório e circulatório, a parede do corpo (tegumento) atua como uma barreira protegendo-o de substâncias nocivas do meio, e ainda, regulando a entrada e saída de substâncias, realizando as trocas gasosas. A morfologia é constituída por cutículas (e suas subdivisões), epiderme, pseudoceloma, e os sistemas digestivos, sistema excretor-secretor e sistema nervoso, sendo frequentemente referida como um tubo dentro de outro tubo (Ferraz e Brown 2016).

2.3.1 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

O tempo necessário para que os fitonematóides completem seu ciclo de vida varia desde poucas semanas até mais de um ano, dependendo da espécie, do estado das plantas hospedeiras e da temperatura ambiente (Trigiano et al. 2010). Em *M. enterolobii*, o ciclo dura de 28 a 35 dias, período no qual acontecem quatro ecdises, denominados de estádios. A fêmea pode depositar na raiz de 400 a 500 ovos formando uma massa aglomerada (Freitas 2009).

Com estruturas chamadas de estilete, os fitonematóides utilizam-na para penetrar diretamente no tecido da planta, permitindo que eles escavem e se movam em direção aos sítios de alimentação. Glândulas esofagianas secretam compostos, através do estilete, nas células das plantas acarretando modificações estruturais de hipertrofia ou hiperplasia que provocam distúrbios fisiológicos e aparecimento de galhas, essas afetam a absorção de nutrientes e água, conseqüentemente, refletindo no desenvolvimento vegetativo da planta (Trigiano et al. 2010). De acordo com Ferraz e Brown (2016), o aparecimento das galhas, envolvendo espécies de *Meloidogyne*, não são sintomas obrigatórios, pois em *M. coffeicola* elas estão ausentes. Segundo Freitas (2009) e Ferraz e Brown (2016), no ciclo de vida das espécies do gênero *Meloidogyne* ocorrem às mudanças descritas a seguir.

Com o fim da embriogênese, ocorre a formação do primeiro estádio juvenil (J1) dentro do ovo, em seguida o J1 sofrerá uma segunda ecdise tornando-se o J2. Através de ação mecânica do J2 contra a casca, esse eclode do ovo passando para o estádio

infectante. No estágio J2 (pré-parasita) o nematoide migra para o solo e movimenta-se em busca das raízes da planta hospedeira, onde penetrará através da coifa. Uma vez realizada a penetração, os juvenis migram ao longo do córtex até encontrar o local adequado para estabelecer o sítio de alimentação, então, as células parasitadas formam um grupo chamadas de nutridoras, formando um tecido especial, o cenócito, que irá produzir material nutritivo para o desenvolvimento do nematoide.

O J2 ao alimentar-se de substâncias produzidas pela planta, ocasionará mudanças morfológicas; diante das alterações ocasionadas nas células da planta, às mesmas multiplicam-se de forma desordenada, a raiz engrossa e há formação de nós, chamados de galhas. O engrossamento do J2 faz com que ele perca a mobilidade tornando-se sedentário e sofrendo alterações morfológicas passando a forma alongada e grossa. Após essa fase, o nematoide passará por duas ecdises chegando aos estádios J3 e J4, respectivamente, e depois para forma adulta (fêmea ou macho). Nos estádios J3 e J4, os nematoides não se alimentam em virtude de não possuírem estilete bucal e ter uma má formação do esôfago, o que só cessará na fase adulta.

O macho formado adquire a forma alongada, e abandona a raiz. A fêmea passa a ter a forma de pera e não tendo a capacidade de locomover-se, continuará a engrossar até obter um formato esférico e completar seu amadurecimento com a postura dos novos ovos.

2.3.2 Meloidoginose

Várias regiões produtoras de goiabas têm sofrido com a ação do parasitismo de *M. enterolobii*, levando a grandes perdas na fruticultura. Informações sobre a ação de *M. enterolobii* em pomares de goiabeiras na região de Petrolina-PE em 2006 e 2007 dão conta de redução de área plantada de 6.000 ha para 2.000 ha, estimando-se uma redução de 70% dos pomares (Carneiro et al. 2006 e 2007). Uma vez presente em áreas produtivas, esses fitoparasitas, poderão rapidamente trazer grandes prejuízos e chegando a dizimar completamente os pomares (Maranhão et al. 2003, Torres et al. 2005, Martins et al. 2013, Macedo et al. 2013, Souza et al. 2014a).

O *M. enterolobii* possui alta virulência e alto potencial reprodutivo quando comparado com outras espécies de nematoides com *M. incognita* ou *M. arenaria* (Kiewnick et al. 2009). Tal especificidade consegue quebrar a resistência do tomateiro cv. Rossol, da batata-doce (*Ipomoea batata*) cv. CDH e da soja (*Glycine max*) cv. Forest, todas resistentes ao *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Carneiro et. al. 2001). Portanto, estudos sobre esses fitoparasitas e busca de materiais resistentes são essenciais para aumentar a vida útil dos pomares de goiabeiras do país.

Quanto à utilização de materiais resistentes à ação dos nematoides têm-se inúmeras vantagens com relação a outros métodos de controle. O plantio de variedades resistentes reduz os custos; sendo de fácil uso; alta eficácia; ecologicamente mais correto, por não empregar uso de produtos químicos. Contudo, a busca por tais materiais não é tarefa fácil, em virtude de que nem sempre é possível obter variedades resistentes a todos os patógenos (Mizubuti e Maffia 2006).

Variedades diferentes, porém com mesma intensidade de doença poderão ter diferentes níveis de produção, em decorrência do fator de tolerância diferenciado. Pois a tolerância independe da resistência e está relacionada à habilidade da planta hospedeira em resistir ou se recuperar da ação do patógeno. Já a resistência é uma característica da planta que restringe o desenvolvimento do patógeno (Mizubuti e Maffia 2006).

Estudos de resistência em cultivares de goiaba como Paluma, Pedro Sato, Século XXI e Tailandesa, correspondente à ação do *M. enterolobii*, apontaram níveis diferentes de multiplicação do mesmo, ocorrendo menor multiplicação do nematoide na cultivar Tailandesa, comparada com as outras, a qual apresentou maiores valores de altura, massa fresca da parte aérea e das raízes e maior vigor. Tal explicação pode ser dada por uma possível poliploidia, entretanto, os resultados obtidos não são caracterizados como resistência devido ao alto fator de reprodução dos nematoides encontrados (Pereira et al. 2016).

O *M. enterolobii* foi detectado pela primeira vez na Ilha de Haiman, na China em 1983, posteriormente em outros países como África do Sul, França, Cuba, Guatemala,

Venezuela e Brasil (OEPP/EPPO 2011). No Brasil foi assinalada em Petrolina (PE), Curaça e Maniçoba (BA), período em que recebeu a designação *M. mayaguensis* (Carneiro et al. 2001).

Em outros Estados brasileiros também foram relatadas ocorrência da presença de *M. enterolobii*, como Rio de Janeiro (Lima et al. 2003 e 2005), Rio Grande do Norte (Torres et al. 2004), Ceará (Torres et al. 2005), Piauí (Silva et al. 2006), São Paulo (Almeida et al. 2006), Paraná (Carneiro et al. 2006), Espírito Santo (Lima et al. 2007), Mato Grosso (Soares et al. 2007), Mato Grosso do Sul (Asmus et al. 2007), Paraíba (Gomes et al. 2007), Minas Gerais (Oliveira et al. 2007; Silva et al. 2008b; Neves e Monteiro 2010), Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Gomes et al. 2008a), Maranhão (Silva et al. 2008a), Goiás (Carneiro et al. 2008) e Tocantins (Charchar et al. 2009).

Diferentes famílias botânicas sofrem ataques do *M. enterolobii*, o que comprova o alto grau de polifagismo dessa espécie. De acordo com Marques et al. (2012), em estudos de espécies vegetais quanto a hospedabilidade ao *M. enterolobii*, constataram que na família Myrtaceae o *P. guineense* Sw. (araçá), apresentou reação de suscetibilidade, enquanto, *Psidium cattleianum* Sab. (araçá amarelo) e *Eucalyptus grandis* W. Hill (eucalipto) mostram-se resistentes e o *Eucalyptus tereticornis* Sm. imune. Entre as espécies suscetíveis diversas famílias foram citadas como: Solanaceae, *Dolanum melongena* L. (berinjela), *Solanum lycopersicum* L. (tomate cv. Trural I) e *Solanum gilo* L. (jiló), na família da Cucurbitaceae, *Curcubita moschata* Duch (abobrinha menina brasileira), na família Poaceae, *Saccharum* L. híbrido (cana de açúcar var. RB 867515; 956911 e 92579).

No Nordeste o avanço desse nematoide está provavelmente associado ao trânsito de mudas de goiabeira infestadas (Guimarães et al. 2003, Rossiter 2007). O controle de nematoides em áreas de produção comercial torna-se ineficaz devido à dimensão da área e o alto custo, sendo a prevenção a melhor medida a ser adotada. Obtenção de mudas sadias, ferramentas higienizadas, água de boa procedência, cuidados com maquinário, são ações que devem ser tomadas no dia a dia para garantir área livre do fitopatógeno (Torres et al. 2005, Freitas 2009).

O uso de porta-enxerto resistente ao *M. enterolobii* será a solução mais eficiente e de baixo custo, como a já utilizada em pessegueiros do gênero *Prunus* com resistência genética a nematoides, possibilitando sua exploração comercial em áreas infestadas (Barbosa e Lima 2010). Tais resultados têm levado a equipe de pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Semiárido a pesquisarem acessos de arazás selvagens e híbridos de arazá resistentes a *M. enterolobii*, respectivamente. (Cid e Carneiro 2007, Costa et al. 2012).

Foram identificados quatro genótipos de *P. cattleyanum* resistentes, porém seu uso como porta-enxerto não se tornou viável, em decorrência da baixa compatibilidade com goiabeiras comerciais. Contudo, os resultados apontaram esperança para o controle dessa praga, através do uso de métodos de enxertia para propagação de variedades comerciais que possam beneficiar os produtores (Martins et al. 2013).

2.4 ANÁLISES IN SILICO

O grande volume de informações geradas diariamente, pelas pesquisas em andamento, faz-se necessários mecanismos computacionais que possam armazenar e transformar dados para posteriores pesquisas. De forma análoga às técnicas computacionais tradicionais necessita, também, do armazenamento de informações que são geradas por interações biológicas complexas. A bioinformática assume o papel de organizar, armazenar e analisar informações contidas em biomoléculas como DNA, RNA e Proteínas, propiciando a identificação de novos fenômenos biológicos e análise de novos genes através de comparações de sequência biológicas de diversas espécies. Portanto, fonte de pesquisas biológicas que se utiliza de ferramentas computacional é denominada *in silico* (Reis et al. 2011, Borém e Fristche-Neto 2013).

A bioinformática tem derivado diversos ramos de pesquisa, inicialmente, a partir da genômica que estuda questões do DNA, posteriormente, transcriptômica envolvida com pesquisas na transcrição do RNA, a proteômica que responde pelos estudos do conjunto das proteínas e metabolômica relativo aos substratos e subprodutos das reações enzimáticas (Malajovich 2012). Essas ramificações fazem com que métodos de

análise *in silico* propiciem conhecimento de estruturas moleculares que se relacionam as atividades biológicas (Borém e Fristche-Neto 2013).

Informações biológicas em bancos de dados são manipuladas por conjunto de softwares gerando informações genéticas. Sequências de nucleotídeos são adicionadas aos bancos de dados públicos na ordem de milhões de pares de bases (pb) recebendo identificação única chamadas de acessos evitando, assim, redundância de dados que são disponibilizadas aos pesquisadores. Os bancos de dados são divididos em primários e secundários, sendo o primeiro resultante de dados de sequência gênica disponibilizados com alguma interpretação adicional, contudo, sem uma análise exaustiva dos dados, a exemplo o GenBank. Enquanto, os bancos de dados secundários derivam do primário, porém, há um refinamento das informações contidas neles que foram compiladas e interpretadas previamente por pesquisadores, sendo a base de dados, atualizadas à medida que surgem novas descobertas, a exemplo o Protein Bank (Reis et al. 2011).

Um dos melhores bancos de dados de sequências do mundo é o NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA), que disponibiliza seus dados em seu site através de sua plataforma ENTREZ, permitindo acesso a sequências de DNA e proteínas de diversos organismos (Reis et al. 2011). Bancos de dados da Europa e Japão estão em sincronização em intervalos de 24 horas com NCBI, atualizando suas bases garantindo assim disponibilidade de informações. As análises computacionais também têm sido utilizadas para a caracterização de diversas proteínas e enzimas tanto em eucariotos quanto em procariotos, e busca de genes ligados ao parasitismo e também resistência nas espécies hospedeiras (Darabi e Seddigh 2015, Feng et al. 2015, Han et al. 2015, Vatansever et al. 2016, Moraes Filho e Martins 2016).

Análises *in silico* possibilitam também a predição de estruturas tridimensionais de proteínas, a partir de metodologias de modelagem por homologia com base em proteínas homólogas que já tenham tido sua estrutura 3D definida por métodos experimentais (Verli 2014). Aspectos evolutivos podem ser elucidados através das análises de similaridade das sequências proteicas, neste sentido, quando sequências diferentes são alinhadas e expressam um determinado nível de similaridade, pode-se

inferir que, em algum momento, houve um ancestral em comum entre elas. Logo, são evolutivamente relacionadas e serão consideradas sequências homólogas. Portanto, esses graus de identidade indicam padrões de composição química que podem ser utilizados para a predição de estruturas tridimensionais de proteínas similares (Verli 2014).

Métodos *in silico* de predição proteica são classificados como métodos dependentes e independentes de estrutura molde. No primeiro caso temos os métodos por enovelamento (*threading*) e o método por modelagem comparativa ou comparação por homologia. Este, parte do pressuposto que as proteínas são relacionadas por um processo evolutivo em comum e, portanto, compartilham uma estrutura semelhante. Para a execução deste método faz-se necessário o conhecimento prévio de uma ou mais proteínas molde, já elucidadas por métodos experimentais, e que estejam disponíveis em banco de dados. A segunda forma da predição de estruturas proteicas se dá pela metodologia *ab initio* que não é recomendada para predição de estruturas proteicas maiores do que 100 aminoácidos (Santos Filho e Alencastro 2003, Verli 2014).

De forma geral, quatro etapas inter-relacionadas são necessárias para a predição do modelo 3D proteico por homologia. Primeiro, identificam-se estruturas homólogas à proteína alvo através de pesquisas em banco de dados. Em seguida, executam-se os alinhamentos dessas sequências com a sequência alvo, posteriormente, realiza-se a predição do modelo 3D da proteína desejada, e por fim, efetua-se a validação do modelo tridimensional predito. Algumas etapas adicionais poderão ser realizadas para obter informações sobre parâmetros físicos e químicos das sequências, caracterização e localização de domínios funcionais, previsão de efeitos mutacionais, entre outras (Verli 2014).

Inúmeras ferramentas computacionais e servidores específicos na Internet têm sido utilizados para a realização de modelagem computacional. Diversas pesquisas podem ser realizadas nos repositórios de dados públicos de biomoléculas como GenBank do NCBI, ModBase (*Database of Comparative Protein Structure Models*), PDB (*Protein Data Bank*) e o EMBL-EBI (*The European Bioinformatics Institute*) com auxílio

de suas ferramentas de busca adequadas a cada tarefa. Na predição de um modelo 3D, as proteínas de mesma família ou de maior grau de identidade, resultarão em melhores resultados no alinhamento das sequências e, conseqüentemente, na definição do modelo tridimensional com maior acurácia (Santos Filho e Alencastro 2003).

A etapa de alinhamento consiste em localizar resíduos de aminoácidos que sejam estruturalmente equivalentes, em maior quantidade, entre a sequência alvo e a sequência molde. Indicando, assim, o seu grau de similaridade e as regiões conservadas. O alinhamento poderá ser simples ou múltiplos, a depender do número de sequências envolvidas (Santos Filho e Alencastro 2003).

Para o alinhamento das sequências há ferramentas como o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponíveis em diversos servidores ou ferramentas utilizadas em um conjunto de programas FASTA, disponível no servidor EMBL-EBI. Pode-se, também, utilizar algoritmos como o ClustaW que é aplicado para alinhamento de múltiplas sequências e que podem ser executados em software local ou em servidores na Internet (Santos Filho e Alencastro 2003, Silva e Silva 2007).

Obtido o alinhamento, parte-se para a construção do modelo tridimensional. Algumas técnicas são utilizadas para sua construção, entre elas a técnica de corpos rígidos, onde um modelo é construído por partes, sendo baseado na conservação de estruturas homólogas ou através das estruturas com alto grau de identidade; ou a técnica por modelagem pela satisfação de restrições espaciais, que consiste em extrair da sequência molde suas restrições espaciais como a distância e ângulos preferenciais que são transferida para o modelo, assim, limitando o número de conformações 3D que o mesmo poderá assumir (Silva e Silva 2007, Verli 2014).

Programas como Modeller e SwissPdbViewer implementam a modelagem por homologia pela técnica de satisfação de restrições espaciais, servidores como Phyre2 e Swiss-Mod, também poderão ser utilizados para a mesma finalidade. Entretanto, os modelos gerados, muitas vezes, necessitam ser otimizados em decorrência de interações desfavoráveis entre átomos não-ligados, e a energia dos ângulos torcionais

com o carbono α ($C\alpha$), (Santos Filho e Alencastro 2003). Softwares como King e servidores como o Yasara Force Field executam esses refinamentos através da minimização de energia no modelo 3D.

Quando se efetua a construção de um modelo tridimensional, possíveis erros poderão ocorrer. Alguns, em virtude do alinhamento entre as sequências alvo e a sequência molde ocasionados por uma baixa similaridade entre elas, outros, relacionados ao método empregado na construção do modelo. Logo, a validação torna-se um ponto crucial, pois verifica-se a qualidade das estruturas formadas, os ângulos de torções nas cadeias principais e laterais, os níveis de energia, entre outros. O servidor Molprobitry e o programa Procheck podem ser utilizados para análise estereoquímicas do modelo por meio da análise do gráfico Ramachandran, que indica se os resíduos de aminoácidos se encontram em regiões energeticamente favoráveis, o que resulta em um modelo estabilizado, ou em regiões inadequadas, indicando que o modelo necessita ser refinado ou refeito (Santos Filho e Alencastro 2003, Verli 2014).

A estrutura do modelo 3D, também, necessita ser comparada com estruturas experimentais (que foram elucidadas por difração de raio-x ou ressonância magnética nuclear) armazenadas em bancos de dados proteicos, a fim de legitimar a qualidade geral do modelo obtido. Para isso, o servidor ProSa realiza uma validação fornecendo um Z-score de qualidade geral, comparando se a pontuação encontra-se dentro do intervalo das características para proteínas nativa, caso não esteja a estrutura do modelo poderá conter erros (Wiederstein e Sippl 2007).

Percebe-se que várias etapas são necessárias para se obter um modelo teórico de uma proteína. Contudo, por meio da análise *in silico* têm-se elucidado diversas estruturas proteicas que são difíceis de serem analisadas por técnicas experimentais. Sua aplicação tem mostrado resultados para as áreas de bioquímica na construção de fármacos, na genética em estudos na identificação de regiões preservadas, mutações e doenças, simulações de *docking*, entre outros (Silva e Silva 2007).

Portanto, análise *in silico* fornece recursos de busca de informações à procura de genes de resistência em diversos organismos diminuindo os custos e agilizando a

obtenção de informações que demandariam certo tempo (Verli 2014). Até a presente data, existem em torno de 2500 sequências genômicas do gênero *Meloidogyne* depositadas no GenBank, destacando-se as espécies, *Meloidogyne incognita* (1017), *Meloidogyne chitwoodi* (461), *Meloidogyne javanica* (368), *Meloidogyne hapla* (363), *Meloidogyne arenaria* (244), *Meloidogyne fallax* (196), *Meloidogyne enterolobii* (165), *Meloidogyne naasi* (140) e *Meloidogyne graminicola* (139). Várias destas sequências são potencialmente relacionadas à mecanismos de parasitismo, mas não estão caracterizadas funcional e estruturalmente. Diversos outros gêneros relacionados de fitonematóides possuem sequências depositadas no GenBank, como *Heterodera*, *Globodera*, *Bursaphelenchus* e *Aphelenchus* (NCBI 2017).

2.4.1 Fatores de Parasitismo

Para que inicie o parasitismo faz-se necessário o reconhecimento de locais específicos nos hospedeiros, através de órgãos sensórias, os anfídeos e as papilas cefálicas que funcionam como quimiorreceptores, que fazem os fitonematóides perceberem a localização das raízes, e assim iniciam o processo de ataque a parede celular (Ferraz e Brown 2016).

O parasitismo do *M. enterolobii* envolve diversos mecanismos de ação, pois sendo um endoparasita obrigatório de plantas, seu ciclo reprodutivo está interligado planta-nematoide. Uma das características do parasitismo é o aparecimento de galhas e formação de células gigantes que servirão de células nutridoras para o parasita (Blok et al. 2008). A parede celular das plantas é o primeiro obstáculo a ser vencido, sendo constituída por celulose (15-40%), hemicelulose (30-40%), lignina (1-5%) e pectina (1-30%). É uma estrutura rígida tendo, entre outras funções, a de impedir ações de muitos patógenos (Doi e Kosugi 2004).

Os fitoparasitas através de ações mecânicas da estrutura bucal, os estiletos, injetam substâncias produzidas pelo esôfago que induzem a diferenciação de células vegetais que formarão células multinucleadas com alterações funcionais, metabólicas e fenotípicas (Jones e Payne 1978, Wiggers et al. 1990, Ding et al. 1998).

Tais secreções desempenham papéis fundamentais durante a invasão do tecido radicular e a iniciação e manutenção de locais de alimentação (Jaubert et al. 2002, Bellafiore et al. 2008, Jaouannet et al. 2012). Devida à especificidade da ação enzimática, análises filogenéticas indicam que os fitonematóides tenham adquirido genes, de outros organismos, através da transferência horizontal, cujo processo ocorre com a transmissão de genes entre diferentes organismos por outros mecanismos, além da herança genética do seu antecessor (Danchin et al. 2010, Bird et al. 2003, Scholl et al. 2003). Apesar das identificações de vários genes que são expressos nas glândulas esofágicas, estudos sobre as proteínas e sua função são escassos (Vanholme et al. 2004).

2.4.2 Calreticulina

Enzimas secretadas nas glândulas esofágicas tem função de enfraquecer a parede celular das plantas durante a penetração e migração do nematoide, bem como na indução e manutenção de locais de nutrição (Wang et al. 1999, Doyle e Lambert 2003). Entretanto, algumas proteínas só são expressas nas glândulas esofágicas durante o estágio J2, em que há o parasitismo em plantas (Hussey et al. 1990, Doyle e Lambert 2003, Tytgat et al. 2004).

Em *M. incognita* foi identificado um único gene codificador para proteína calreticulina, sintetizada nas glândulas esofágicas, denominada de Mi-CRT, onde é secretada no estágio migratório e sedentário do nematoide (Jaubert et al. 2002). A calreticulina são proteínas de ligação com o cálcio, sendo altamente conservada em plantas e animais podendo ser encontrada no retículo endoplasmático, no citoplasma ou na superfície celular, estando envolvida na regulação de múltiplas funções como na exportação de proteínas do núcleo e degradação do mRNA (Kasper et al. 2001, Holaska et al. 2002, Nickenig et al. 2002, Suchitra e Joshi 2005).

Em nematoides das galhas a Mi-CRT é encontrada em alta concentração no tecido vegetal do hospedeiro, infectado durante a fase de indução, e manutenção de células gigantes (Jaubert et al. 2002, Bellafiore et al. 2008).

Pesquisas sobre a calreticulina em *M. incognita* foram desenvolvidas utilizando-se de abordagem de anticorpos anti-peptídeo, por sequências de proteínas Mi-CRT, que foram alinhadas com sequências encontradas em base de dados. Foram identificados quatro peptídeos indicando a possibilidade de serem usados como soro policlonal específico para calreticulina no nematoide (Jaubert et al. 2005).

Estudos indicam que a defesa da planta ao ataque de *M. enterolobii* é controlada durante a interação nematoide-planta, onde o fitoparasita secreta efetores que suprime as defesas do hospedeiro. Quando a Mi-CRT é injetada nos tecidos há supressão da defesa da planta durante a interação. Contudo, uma primeira linha de defesa entra em ação, denominada de imunidade trigonométrica, onde a planta desencadeia ações como despolarização da membrana, ativação em cascata da proteína quinase, produção de etileno e indução de genes responsável pela defesa, bem como, fechamento dos estômatos, e formação de calos (Asai et al. 2002, Zipfel et al. 2004, Hématy et al. 2009).

O fator de expressão do gene Mi-CRT na interação planta-nematoide demonstram que a menor expressão deste gene em nematoides afeta a sua capacidade de parasitismo. Já em plantas, quando isso ocorre elas tornam-se mais suscetível aos ataques de nematoides (Jaouannet et al. 2012). Fatores abióticos como temperatura alta ou baixa causando estresse na planta, afetam a expressão do gene CRT, por conseguinte, diminuindo as defesas contra ataques de fitoparasita (Jia et al. 2009). A calreticulina também é secretada por parasitas de animais como o *Trypanosoma* spp. (Naresha et al. 2009, Valck et al. 2010, Ramírez et al. 2011). Outra linha de pesquisa com relação ao ataque do *M. javanica*, indica que a proteína chorismato mutase, sintetizada por este nematoide é responsável pela supressão das defesas das plantas (Doyle e Lambert 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida EJ, Soares PLM, Santos JM e Martins ABG (2006) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba (*Psidium guajava*) no Estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira** **30**: 112-113.

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W, Gomez L, Boller T, Ausubel FM e Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. **Nature** **415**: 977- 983.

Asmus GL, Vicentini EM e Carneiro RMDG (2007) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado de Mato Grosso do Sul. **Nematologia Brasileira** **31**: 112.

Barbosa FR e Lima MF (2010) **A cultura da goiaba**. 2^a. ed., Editora Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 180p.

Barros PA, Pedrosa EMR, Silva EFF, Miranda JH, Rolim MM e David FL (2016) Dinâmica populacional de fitonematoides sob regimes de fluxo de água em colunas de solo. **Nematropica** **46**: 244-260.

Bellafiore S, Shen Z, Rosso MN, Abad P, Shih P e Briggs SP (2008) Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathog** **4**: 1000192.

Bezerra JEF, Lederman IE, Silva Junior JF e Proença CEB (2006) Araçá. In: Vieira RF, Costa TSA, Silva DB, Ferreira FR e Sano SM (eds.) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Editora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, p. 42-62.

Bird MD, Oppermana CH e Davies KG (2003) Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. **International Journal for Parasitology** **33**: 1269-1276.

Blok VC, Jones JT, Phillips MS e Trudgill DL (2008) Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. **BioEssays** **30**: 249-259.

Borém A e Frischtche-Neto R (2013) **Ômega 360º: Aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Editora Supreme, Visconde do Rio Branco, 289p.

Brandão M, Laca-Buendía JP e Macedo JF (2002) **Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais**. Editora Epamig, Belo Horizonte, 528p.

Brasil (2014) Pesquisa da Embrapa indica controle genético de parasita da goiabeira. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2014/06/pesquisa-da-embrapa-indica-controle-genetico-de-parasita-da-goiabeira>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

Campos VP (2000) **Manejo de doenças causadas por fitonematoides**. Editora UFLA/FAEPE, Lavras, 124p.

Carneiro RMDG, Moreira WA, Almeida MRA e Gomes ACMM (2001) Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira** **25**: 223-228.

Carneiro RG, Monaco APA, Moritz MP, Nakamura KC e Scherer A (2006) Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no Estado do Paraná. **Nematologia Brasileira** **30**: 293-298.

Carneiro RMDG, Cirotto PA, Quintanilha AP, Silva DB e Carneiro RG (2007) Resistance to *Meloidogyne mayaguensis* in *Psidium* spp. accessions and their grafting compatibility with *P. guajava* cv. Paluma. **Fitopatologia Brasileira** **32**: 281-284.

Carneiro RMDG, Siqueira KMS, Santos MFA, Almeida MRA e Tigano MS (2008) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira** **33**: S258.

Charchar JM, Fonseca MEN, Boiteux LB e Lima Neto AF (2009) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado de Tocantins. **Nematologia Brasileira** **33**: 182-186.

Cid LPB e Carneiro R (2007) Embrapa investe em técnicas de biotecnologia para controlar nematoide da goiabeira. TodaFruta. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

Coradin L, Siminski A e Reis A (2011) **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Rigião Sul**. MMA, Brasília, 934p.

Costa AFS e Costa NA (2003) **Tecnologia para produção de goiaba**. Editora Incaper, Vitória, 341p.

Costa SRda, Santos CAF e Castro JMC (2012) Assessing *Psidium guajava* x *P. guineense* hybrids tolerance to *Meloidogyne enterolobii*. In: **III International Symposium on Guava and other Myrtaceae 959**. ISHS Acta Horticulturae, 959: 59-65.

Damiani C, Silva FA, Asquieri ER, Lage ME e Vilas Boas EVB (2012) Antioxidant potential of *Psidium guinnensis* Sw. jam during storage. **Pesquisa Agropecuária Tropical** **42**: 90-98.

Danchin EGJ, Rosso M, Vieria P, Almeida-Engler J, Coutinho PM, Henrissat B e Abad P (2010) Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. **Proceedings of the National Academy of Science** **107**: 17651-17656.

Darabi M e Seddigh S (2015) Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. **Plant Systematics and Evolution** **301**: 2399-2417.

Demattê MERP (1997) Ornamental use of Brazilian Myrtaceae. **Acta Horticulturae** **452**: 143-180.

Ding X, Shields J, Allen R e Hussey RSA (1998) secretory cellulose-binding protein cDNA cloned from the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 11**: 952–959.

Doi RH e Kosugi A (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology 2**: 51-541.

Donadio LC, Môro FV e Servidone AA (2002) **Frutas Brasileiras**. Editora Novos Talentos, Jaboticabal, 288p.

Doyle E e Lambert K (2003) *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. **Molecular Plant-Microbe Interactions 16**: 123-131.

Fajardo P M, Aballay EE e Casanova PM (2011) Soil properties influencing phytoparasitic nematode population on Chilean vineyards. **Chilean Journal of Agricultural Research 71**: 240-248.

Feng BZ, Li PQ, Fu L e Yu XM (2015) Exploring laccase genes from plant pathogen genomes: a bioinformatic approach. **Genetics and Molecular Research 14**: 14019-14036.

Ferraz LCCB e Brown DJF (2016) **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Editora NORMA, Manaus, 249p.

Flori JE (2016) Principais variedades de goiaba. **Revista Campo & Negócios HF 8**: 72-73.

Franzon RC, Campos LZO, Proença CEB e Souza-Silva JC (2009) **Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrências descrição e uso**. Editora Embrapa Cerrado, Planaltina, 48p.

Freitas LG (2009) **Introdução à nematologia**. 5ª ed., Editora UFV, Viçosa, 90p.

Gomes AR, Faustino JF, Wilcken SRS, Carneiro RMDG e Ambrósio MMQ, Souza NL (2007) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* L. no estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira** 32: S273.

Gomes CB, Couto MEO e Carneiro RMDG (2008a) Registro de ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira em fumo no Sul do Brasil. **Nematologia Brasileira** 32: 244-247.

Gomes VM, Souza RM, Silva MM e Dolinski C (2008b) Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. **Nematologia Brasileira** 32: 54-160.

Gonzaga Neto L, Soares JM, Teixeira AHC e Moura MSB (2001) **Goiaba: produção - aspectos técnicos**. Editora Embrapa Semi-Árido, Petrolina: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 72p.

Gonzaga Neto L (2007) **Produção de goiaba**. Instituto Frutal, Fortaleza, 64p.

Guimarães LM, Moura RM e Pedrosa EMR (2003) Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. **Nematologia Brasileira** 27: 39-145.

Gutiérrez RMP, Mitchell S e Solis RV (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology** 117: 1-27.

Han Y, Zheng QS, Wei YP, Chen J, Liu R e Wan HJ (2015) *In silico* identification and analysis of phytoene synthase genes in plants. **Genetics and Molecular Research** 14: 9412-9422.

Hématy K, Cherk C e Somerville S (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology** 12: 406-413.

Holaska JM, Black BE, Rastinejad F e Paschal BM (2002) Ca(2+)-dependent nuclear export mediated by calreticulin. **Molecular and Cellular Biology** 22: 6286-6297.

Hussey RS, Paguio OR e Seabury F (1990). Localization and purification of a secretory protein from the esophageal glands of *Meloidogyne incognita* with a monoclonal antibody. **Phytopathology** **80**: 709-714.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2016) **Produção Agrícola Municipal Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro, 43: 21-23.

Jaouannet M, Perfus-Barbeoch L, Deleury E, Magliano M, Engler G, Vieira P, Danchin EGJ, Da Rocha M, Coquillard P, Abad P e Rosso MN (2012) A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. **New Phytologist** **194**: 924-931.

Jaubert S, Laffaire JB, Piotte C, Abad P, Rosso MN e Ledger TN (2002) Direct identification of stylet secreted proteins from rootknot nematodes by a proteomic approach. **Molecular and Biochemical Parasitology** **21**: 205-211.

Jaubert S, Milac AL, Petrescu AJ, De Almeida-Engler J, Abad P e Rosso MN (2005) In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **18**: 1277-1284.

Jesus, G (2015) Mercado de Fruticultura. SEBRAE, Brasília, (Boletim Inteligente). Disponível em: <<http://www.bibliotecas.sebrae.com.br>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

Jia XY, He LH, Jing RL e Li RZ (2009) Calreticulin: Conserved protein and diverse functions in plants. **Physiologia Plantarum** **136**: 127-138.

Jones MGK e Payne HL (1978) Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. **Journal of Nematology** **10**: 70-84.

Kasper G, Brown A, Eberl M, Vallar L, Kieffer N, Berry C, Girdwood K, Eggleton P, Quinnell R e Pritchard DIA (2001) calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signaling domains of some integrins. **Parasite Immunology** **23**: 141-152.

Kavati R (1997) Cultivares de goiaba. In: (Pereira FM, Durigan JF, Natale W, Piza Junior CT e Maia AP (eds.) **Anais do Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura da Goiabeira, 1**. UNESP-FCAVJ/ FUNEP/ GOIABRÁS, Jaboticabal, p. 01-06.

Kiewnick S, Dessimoz M e Franck L (2009) Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. **Journal of Nematology 41**: 134-139.

Lederman IE, Silva MFF, Alves MA e Bezerra JEF (1997) Selection of superior genotypes of Brazilian guava (*Psidium guineense* Swartz) in the Coastal Wood Forest Region of Northeast Brazil. **Acta Horticulturae 452**: 95-100.

Lima IM, Dolinski CM e Souza RM (2003) Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabais de São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros dentre plantas invasoras e cultivadas. **Nematologia Brasileira 27**: 257-258.

Lima IM, Souza RM, Silva CP e Carneiro RMDG (2005) *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Nematologia Brasileira 29**: 31-38.

Lima IM, Martins MVV, Serrano LAL e Carneiro RMDG (2007) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira 'Paluma' no estado do Espírito Santo. **Nematologia Brasileira 31**: 133.

Macedo CMTL, Santos AG, Rodrigues CSA, Medeiros LB, Martins LSS, Guimarães WNR e Musser RS (2013) Seleção de espécies de *Psidium* spp. resistentes ao nematóide *Meloidogyne enterolobii* para porta-enxerto de goiabeiras comerciais. In: **Anais da Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX, 13**. UFRPE, Recife, p. 1-3.

Machado CZA (2015) Ataques de nematoides custam R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Revista Agrícola 16**: 11. Disponível em: <<http://www.ragricola.com.br/2015/11/16>>. Acesso em: 20/02/2017.

Malajovich MA (2012) **Biociencia** 2011. Editora Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, Rio de Janeiro, 320p.

Manica I, Icuma IM, Junqueira NTV, Salvador JO, Moreira A e Malavolta E (2000) **Fruticultura tropical: goiaba**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre, 374p.

Maranhão SRVL, Moura RM e Pedroza EMR (2003) Reação de indivíduos segregantes de araçazeiro a *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. **Nematologia Brasileira** 27: 173-178.

Marques MLS, Pimentel JP, Tavares OCH, Veiga CFM e Berbara RLL (2012) Hospedabilidade de diferentes espécies de plantas a *Meloidogyne enterolobii* no Estado do Rio de Janeiro. **Nematropica** 42: 304-313.

Martins LSS, Musser RS, Souza AG, Resende LV e Maluf WR (2013) Parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* em espécies de myrtaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35: 477-484.

Mattos JR (1993) Fruteiras nativas do Sul do Brasil. In: **Anais do Simpósio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas, 1992, Cruz das Almas, BA**. EMBRAPA-CNPMP, Cruz das Almas p. 35-50.

Medina JC (1998) Goiaba: cultura. In: Medina JC, Castro JV, Sigrist JMM, Martin ZJ, Kato K, Maia M, López García AEB e Leite RSSF (eds.) **Goiaba: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2ª. ed., Editora ITAL, Frutas Tropicais, Campinas, 6: 1-119.

Melo APC, Seleguini A e Veloso VRS (2013) Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swart). **Comunicata Scientiae** 4: 91-95.

Mendonça V (2012) Goiaba: histórico e informações gerais. TodaFruta. Disponível em: <<http://old.todafruta.com.br>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

Mizubuti ESG e Maffia LA (2006) **Introdução à fitopatologia**. Editora UFV, Viçosa, 190p.

Moraes Filho R e Martins LSS (2016) *In silico* comparative analysis of tylenchid nematodes pectate lyases. **Genetics and Molecular Research** gmr:15038402.

Naresha S, Suryawanshi A, Agarwal M, Singh BP e Joshi P (2009) Mapping the complement C1q binding site in *Haemonchus contortus* calreticulin. **Molecular and Biochemical Parasitology** **166**: 42-46.

Natale W, Rozane DE, Souza HA e Amorim DA (2009) **Cultura da goiaba: do plantio à comercialização 1**. Editora UNESP, Jaboticabal, 284p.

National Center for Biotechnology Information - NCBI (2017) Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27/07/2017.

Neves WS e Monteiro TSA (2010) Primeiro Relato de *Meloidogyne enterolobii* em Goiabeira na Região de Jaíba, Norte de Minas Gerais. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas** **4**: 11.

Nickenig G, Michaelsen F, Muller C, Berger A, Vogel T, Sachinidis A, Vetter H e Bohm M (2002) Destabilization of AT(1) receptor mRNA by calreticulin. **Circulation Research** **90**: 53-58.

Nunes HT, Monteiro AC e Pomela AWW (2010) Uso de agentes microbianos e químicos para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum. Agronomy** **32**: 403-409.

Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico - OCDE/FAO Panorama General de OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024 (2015) In **OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015**. Editora OECD, Roma, 150p. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org/>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

Organisation Européenne et Méditerranéenne Pour la Protection des Plantes - OEPP/EPPO (2011) European and Mediterranean Plant Protection Organization. Diagnostic *Meloidogyne enterolobii*. **OEPP/EPPO 41**: 329-339.

Oliveira RDL, Silva MB, Aguiar NDC, Bérغامo FLK, Costa ASV e Prezotti L (2007) Nematofauna associada à cultura do quiabo na região leste de Minas Gerais. **Horticultura Brasileira 25**: 88-93.

Pereira WE (1996) **Desenvolvimento dos ramos e frutos de seis variedades de goiabeira (*Psidium guajava* L.) no período seco do ano**. Dissertação de Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 48p.

Pereira FM e Nachtigal JC (2003) Melhoramento da goiabeira. In: Rozane DE, Couto FAd'A (eds.) **Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado**. Editora UFV, Viçosa, p. 53-78.

Pereira FM e Kavati R (2011) Contribuição da pesquisa científica brasileira no desenvolvimento de algumas frutíferas de clima subtropical. **Revista Brasileira de Fruticultura especial**: 92-108.

Pereira CK, Soraes PLM, Santos JM, Batista ESP e Junior WM (2016) Desenvolvimento de cultivares de goiabeira inoculados com *Meloidogyne enterolobii*. **Nematropica 46**: 54-59.

Piza Junior, CT (1994) **A poda da goiabeira de mesa**. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI, Campinas, Boletim Técnico: 222.

Pommer CV, Oliveira OF e Santos CA (2013) **Goiaba recursos genéticos e melhoramento**. Editora EDUFERSA, Mossoró, 129p.

Ramírez G, Valck C, Ferreira VP, López N e Ferreira A (2011) Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. **Trends Parasitology 27**: 115-122.

Reetz ER, Kist BB, Santos CE e Drum M (2015) **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2015**. Editora Gazeta Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 104p.

Reis LF, Macedo JNA e Damalio JCP (2011) **Dogma central da biologia molecular e introdução a bioinformática**. Editora W. Educacional, Brasília, 76p.

Rodríguez NN, Valdés-Infante JJ, Rodríguez JA e Velásquez JB (2010) Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.) in Cuba. **Biotecnologia Aplicada 27**: 238-241.

Rossiter JGA (2007) **Potencialidade de genótipos de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D. C.) quanto ao enraizamento e resistência a nematoide visando a obtenção de porta-enxerto**. Dissertação de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 76f.

Sampaio AC, Jacomino AP, Almeida AM e Piza Junior CT (2011) **Goiaba do plantio à comercialização**. Editora CATI, Campinas, 125p.

Santos Filho AO e Alencastro RB (2003) **Modelagem de Proteínas por Homologia**. Editora Química Nova, São Paulo, p. 253-259.

Scholl EH, Thome JL, Mccarter JP e Bird DM (2003) Horizontally transferred genes in plant-parasitic nematodes: a high-throughput genomic approach. **Genome Biology 4**: 39.

Sharma RD (2003) **Controle biológico do nematóides-das-galhas com a bactéria *Pasteuria penetrans***. Embrapa Cerrado, Planaltina, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: 80.

Silva GS, Sobrinho CA, Pereira AL e Santos JM (2006) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado do Piauí. **Nematologia Brasileira 30**: 307-309.

Silva VB e Silva CHTP (2007) Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia 4**: 15-26.

Silva GS, Pereira AL, Araújo JRG e Carneiro RMDG (2008a) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no estado do Maranhão. **Nematologia Brasileira** **32**: 242-243.

Silva RV, Oliveira RDL e Ferreira AO (2008b) Primeiro relato da ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** **33**: S260.

Soares PLM, Almeida EJ, Silva AR, Barbosa BFF e Santos JM (2007) Novos registros de *Meloidogyne mayaguensis* no Brasil. **Nematologia Brasileira** **31**: 45.

Soares-Silva LH (2000) **A família Myrtaceae – subtribos: Myrciinae e Eugeniinae na bacia hidrográfica do Rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil**. Tese, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 462p.

Soares-Silva L H e Proença CEB (2008) A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society** **158**: 51-54.

Souza AGS, Resende FV, Lima IP, Martins LSS e Techio VH (2014a) Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. **Plant Systematics and Evolution** **300**: 9.

Souza AGS, Resende FV, Lima IP, Musser RS e Chalfun NNJ (2014b) Variabilidade genética de acessos de araçazeiro e goiabeira suscetíveis e resistentes a *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural** **44**: 822-829.

Suchitra S e Joshi P (2005) Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. **Biochimica et Biophysica Acta** **1722**: 293-303.

Torres GRC, Covello VN, Sales Júnior R, Pedrosa EMR e Moura RM (2004) *Meloidogyne mayaguensis* em *Psidium guajava* no Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira** **29**: 570.

Torres GRC, Sales Júnior R, Rehn VNC, Pedrosa EMR e Moura RM (2005) Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado do Ceará. **Nematologia Brasileira** **29**: 105-107.

Trigiano RN, Windham MT e Windham AS (2010) **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. 2^a ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 576p.

Tytgat T, Vanholme B, De Meutter J, Claeys M, Couvreur M, Vanhoutte I, Gheysen G, Van Criekinge W, Borgonie G, Coomans A e Gheysen G (2004) A new class of ubiquitin extension proteins secreted by the dorsal pharyngeal gland in plant parasitic cyst nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **17**: 846-852.

Valck C, Ramírez G, López N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sánchez G, Ferreira VP, Schwaeble W e Ferreira A (2010) Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Molecular Immunology** **47**: 1516-1521.

Vanholme B, De Meutter J, Tytgat T, Van Montagu M, Coomans A e Gheysen G (2004) Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. **Gene** **332**: 3-27.

Vatansever R, Filiz E e Ozyigit II (2016) *In silico* identification and comparative analysis of molybdenum (Mo) transporter genes in plants. **Brazilian Journal of Botany** **39**: 87-99.

Verli H (2014) **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. Editora SBBq, São Paulo, 292p.

Vieira RF, Costa TSA, Silva DB, Ferreira FR e Sano SM (2006) **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Editora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 320p.

Wang X, Meyers D, Yan Y, Baum T, Smart G, Hussey R e Davis E (1999) In planta localization of a β -1,4-endoglucanase secreted by *Heterodera glycines*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **12**: 64-67.

Watlington F (2006) Goiaba no mundo. **Revista o Agrônômico 8**: 1-2.

Wiederstein M e Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research 35**: 407-410.

Wiggers RJ, Starr JL e Price HJ (1990) DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. **Phytopathology 80**: 1391-1395.

Wilson PG, O'brien MM, Gadek PA e Quinn CJ (2001) Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamiliar groups. **American Journal of Botany 88**: 2013-2025.

Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM e Quinn CJ (2005) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolutions 251**: 3-19.

Xu J, Peilei L, Qingpeng M e Hai L (2004) Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. **European Journal of Plant Pathology 110**: 309-315.

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ e Jones JDG (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. **Nature 428**: 764-767.

CAPÍTULO II

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GÊNERO *PSIDIUM* spp. AO FITONEMATÓIDE *MELOIDOGYNE ENTEROLOBII*

Artigo enviado para **Revista Nematrópica**.

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GÊNERO *PSIDIUM* spp. AO FITONEMATÓIDE *MELOIDOGYNE ENTEROLOBII*

Edilton de Albuquerque Cavalcanti Junior^{1,2*}, Rômulo Maciel de Moraes Filho^{1,2}, Jackeline Gadé de Araujo Rossiter^{1,2}, Angélica Virginia Valois Montarroyos², Rosimar dos Santos Musser^{1,2} e Luiza Suely Semen Martins^{1,3}

¹Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Agronomia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil. ³Departamento de Biologia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência: edycanti@gmail.com

ABSTRACT

Cavalcanti Junior, E. A., R. M. Moraes Filho, J. G. A. Rossiter, A. V. V. Montarroyos, R. dos S. Musser and L. S. S. Martins. 2017. Reaction of genotypes of the genus *Psidium* spp. to the phytonematode *Meloidogyne enterolobii*. *Nematropica* __: __-__

The guava crop has been severely attacked by the phytonematode *Meloidogyne enterolobii*, which has caused drastic reduction of productivity and, in some cases, even total loss of cultivated areas. Due to its wide range of potential hosts and easy dissemination, *M. enterolobii* represents a constant danger and has established itself as one of the major constraints for the guava cultivation in Northeast Brazil. The objective of this work was to evaluate the reaction of *Psidium guineense* (Araçá) and *Psidium guajava* (Guava) genotypes to *M. enterolobii* parasitism under greenhouse conditions. We evaluated 44 genotypes of *P. guineense* genotypes, native to natural populations of Pernambuco State, and 6 genotypes of guava trees from domestic orchards. The genotypes were evaluated according to the following parameters: gall index (GI), reproduction factor (RF), number of eggs per gram of root (OGR) and reduction of reproductive factor (RFR). Considering the evaluated criteria, the *P. guineense* genotypes REC-DI-A02 and REC-DI-A04 achieved the best results and can be indicated as a source of resistance to *M. enterolobii* and also as promising genotypes for grafting tests in guava.

Key words: Guava tree, Myrtaceae, Root-knot nematodes, Resistance.

RESUMO

Cavalcanti Junior, E. A., R. M. Moraes Filho, J. G. A. Rossiter, A. V. V. Montarroyos, R. dos S. Musser e L. S. S. Martins. 2017. Reação de genótipos do gênero *Psidium* spp. ao fitonematóide *Meloidogyne enterolobii*. Nematropica __: __-__

A cultura da goiabeira tem sido severamente atacada pelo fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* (Sin.: *M. mayaguensis*), que tem causado drástica redução de produtividade e, em alguns casos, até perda total de áreas cultivadas. Devido à sua grande gama de potenciais hospedeiros e fácil disseminação, *M. enterolobii* representa um perigo constante e tem se mostrado um dos maiores limitantes para o cultivo da goiabeira no Nordeste brasileiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de genótipos de goiabeira e araçazeiro ao parasitismo de *M. enterolobii* em condições de casa de vegetação. Foram avaliados 44 genótipos de araçazeiros oriundos de populações naturais do Estado de Pernambuco e 6 genótipos de goiabeiras. Os genótipos foram avaliados segundo os seguintes parâmetros: índice de galhas (IG), fator de reprodução (FR), número de ovos por grama de raiz (OGR) e redução do fator de reprodução (RFR). Considerando os critérios avaliados, os genótipos de araçazeiros REC-DI-A02 e REC-DI-A04 alcançaram os melhores resultados, podendo ser indicados como fonte de resistência à *M. enterolobii* e também como genótipos promissores para testes de enxertia em goiabeira.

Palavras-Chave: Goiabeira, Myrtaceae, Nematoides das galhas, Resistência.

INTRODUÇÃO

O gênero *Psidium* possui aproximadamente 150 espécies destacando-se a espécie *Psidium guajava* L. (goiaba), devido a sua grande importância econômica, e tendo o Brasil como um dos maiores produtores comerciais (Rodríguez et al., 2010). A goiabeira é uma frutífera perene que possui frutos ricos em vitamina C e sais minerais, bastante apreciados no mercado nacional e internacional (Gonzaga Neto, 2007). A importância econômica do cultivo da goiabeira se dá devido ao elevado valor nutricional de seus frutos e as diversas formas possíveis de consumo, seja *in natura*, ou como produtos industrializados. Dentre as espécies da família Myrtaceae, a goiabeira e o araçazeiro estão entre as mais importantes economicamente. Apesar do araçazeiro não compartilhar da mesma importância da goiabeira, esta espécie é de grande interesse para pesquisas e para o melhoramento genético devido a características desejáveis de seus frutos, como os elevados teores de vitamina C e também devido à existência de genótipos resistentes ao

fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* (Sin.: *M. mayaguensis*), que tem causado grandes prejuízos à cultura da goiabeira, podendo ser usada como porta-enxerto para as goiabeiras comerciais (Raseira e Raseira, 1996; Souza et al., 2006; Biazatti et al., 2016). Fitonematóides em geral representam a maior fonte de estresse biótico para plantas cultivadas e, em alguns casos, podem causar enfraquecimento, senescência prematura e até perda total na cultura (Bird, 2004; Perry e Moens, 2011).

O *M. enterolobii* detectado pela primeira vez na Ilha de Haiman, na China em 1983, teve sua presença assinalada nos municípios de Petrolina (PE), Curaça e Maniçoba (BA), recebendo a designação de *M. mayaguensis* (Carneiro et al., 2001). Em diversos Estados brasileiros também foram relatadas ocorrências de *M. enterolobii*, como no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Gomes et al., 2008), Goiás (Carneiro et al., 2008) e Tocantins (Charchar et al., 2009). Danos e perdas causados à cultura da goiabeira, por este fitonematóide, causaram a redução da área cultivada de 6.000 para 2.000 ha, na região do município de Petrolina, o principal polo produtor no Estado de Pernambuco (Carneiro et al., 2006). Esta situação é agravada devido à baixa variabilidade genética das variedades de goiabeiras comerciais brasileiras, onde aproximadamente 70% dos pomares são compostos pela cultivar Paluma, destinados ao consumo industrializado (Pereira e Kavati, 2011).

No atual contexto, *M. enterolobii* representa um perigo constante. A sua rápida disseminação e o seu hábito polifágico, que o habilita a viver dentro de raízes e parasitar um grande número de espécies, como plantas ornamentais, fumo, soja, cafeeiro, mamão, acerola, araçá, goiaba, plantas daninhas e diversas hortaliças, a tornam uma praga de difícil controle (Maranhão et al., 2001; Guimarães et al., 2003; Moreira et al., 2016).

Pesquisas têm sido realizadas com objetivo de encontrar genótipos de Myrtaceae resistentes ao parasitismo dos nematoides das galhas. A obtenção de porta-enxertos resistentes ao *M. enterolobii* para a goiabeira, tem demonstrado que nos araçazeiros (*Psidium* spp.) pode-se encontrar fonte de resistência, o que os torna importante no combate ao nematoide em questão (Scherer et al., 2012; Martins et al., 2013; Biazatti et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de genótipos de araçazeiros e goiabeiras ao fitonematóide *M. enterolobii*, e selecionar genótipos potencialmente resistentes ou tolerantes para serem utilizados como porta-enxertos compatíveis com variedades comerciais de goiabeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na área de Fitotecnia do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com localização a 8°01'92" S, 34°56'74" W, a 6 m de altitude, onde foram avaliados 44 genótipos de araçá e 5 de goiabeira, provenientes do Estado de Pernambuco, do Rio de Janeiro e uma goiabeira comercial obtida em mercado de frutas. A coleta dos genótipos para obtenção das sementes ocorreu entre os meses de janeiro a fevereiro de 2016 nos seguintes municípios de Pernambuco: Cabo de Santo Agostinho, Paudalho, Canhotinho e Região Metropolitana do Recife. Foram coletados de três a quatro frutos fisiologicamente maduros ou em estágio de amadurecimento de cada planta. Todos os frutos coletados foram lavados em água corrente para eliminação de resíduos e tratados com solução de hipoclorito a 5%, despulpados e retiradas às sementes que foram secas a sombra.

A semeadura foi realizada em 13 de maio de 2016, feitas em bandejas de polietileno expandido de 16x8 células, colocando-se duas sementes por célula, utilizando-se substrato comercial Basaplant[®]. As bandejas foram levadas para casa de vegetação onde receberam regas diárias, tratos culturais e solução nutritiva formulada na proporção de 20 g de Sulfato de Magnésio (MgSO₄), 37,5 g de Nitrato de Cálcio (Ca(NO₃)₂), 22,5 g de Nitrato de Potássio (KNO₃), 1,25 g de Quelatec A-Z, 10 g de MAP e 1,25 g de Ultraferro[®], dissolvidos em 50 L de água, a cada 15 dias. Quando as mudas alcançaram 8 cm de altura foram transplantadas para sacos plásticos de 20 cm de altura por 10 cm de largura, devidamente identificado para cada genótipo e acondicionadas em casa de vegetação onde receberam os devidos tratos culturais, irrigação por aspersão e solução nutritiva. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, correspondendo aos 44 genótipos de araçazeiros e 6 genótipos de goiabeiras. Cada tratamento continha seis repetições, onde cada parcela foi constituída por uma planta.

O inóculo, cedido pela Embrapa Semiárido – CPATSA-Petrolina-PE, foi propagado em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) reconhecido como bom hospedeiro ao *M. enterolobii*. Para a extração de ovos seguiu-se a metodologia de Hussey e Barker (1973), as raízes foram cuidadosamente retiradas do substrato, lavadas e cortadas em pequenos pedaços de 1-2 cm de comprimento. A contagem de ovos foi feita com uso de microscópio ótico e de câmara de contagem de Peters, usando-se alíquota de 1 mL em 9 mL de água destilada para ajuste de 1000 ovos/ml. Transcorrido 60 dias após o transplantio das mudas para os sacos plásticos, os genótipos foram inoculados com *M. enterolobii* com solução contendo 8.000 ovos por planta. Após a

inoculação foi suspensa a irrigação por período de 24 horas, a fim de evitar perda de ovos inoculados. Aos 120 dias após a inoculação foram avaliadas as relações de parasitismo.

Os parâmetros avaliados foram índice de galhas (IG), através da escala de notas do International *Meloidogyne* Project (IMP), utilizado por Taylor e Sasser (1983), o número de ovos por grama de raiz (OGR) e o fator de reprodução (FR). As reações dos hospedeiros foram enquadradas nos parâmetros estabelecidos por Hartman e Sasser (1985). Plantas que apresentaram valores de $IG \leq 2$ foram consideradas resistentes. A estimativa do número de ovos por sistema radicular foi realizada com auxílio de câmara de Peters, em microscópio ótico, obtendo-se assim a população final (Pf). O fator de reprodução (FR) obtido pelo quociente Pf/Pi , estabeleceu as reações da espécie vegetal quanto ao parasitismo, sendo enquadrados nos parâmetros estabelecidos por Oostenbrink (1966), onde $FR < 1$ espécie resistente (R), $FR = 0$ espécie imune (I) e $FR > 1$ espécie suscetível (S). O fator de reprodução foi comparado pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade. O maior valor obtido para a variável FR foi usado como referência para o cálculo da redução do fator de reprodução (RFR) segundo a metodologia de Moura e Régis (1987) e classificados nas seguintes faixas: 0 a 25 = planta altamente suscetível; 26 a 50 = planta suscetível; 51 a 75 = planta pouco resistente; 76 a 95 = planta moderadamente resistente; 96 a 99 = planta resistente; 100 = planta imune.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os 120 dias do período de infecção as temperaturas observadas em casa de vegetação variaram entre 25,5 °C e 39 °C. Após este período, observou-se a presença de galhas nas raízes das plantas inoculadas sugerindo que o ciclo de reprodução do patógeno se completou sem perturbações (Figura 1A). De acordo com Agrios (2005), o ciclo de vida das espécies do gênero *Meloidogyne* pode variar de acordo com o seu hospedeiro e a temperatura ambiente, durando aproximadamente 25 dias a 27 °C, se alongando em temperaturas mais baixas ou mais elevadas. A partir de dois meses da inoculação do *M. enterolobii*, sintomas de parasitismo como murcha em horários mais quentes do dia, amarelecimento das folhas e bronzeamento foram observados em alguns dos genótipos inoculados. Também foi possível observar sintomas como engrossamento de raízes e redução do crescimento (Figuras 1B e 1C). No extrato de raízes dos genótipos inoculados foram observados a presença de ovos e J2 (Figura 1D).

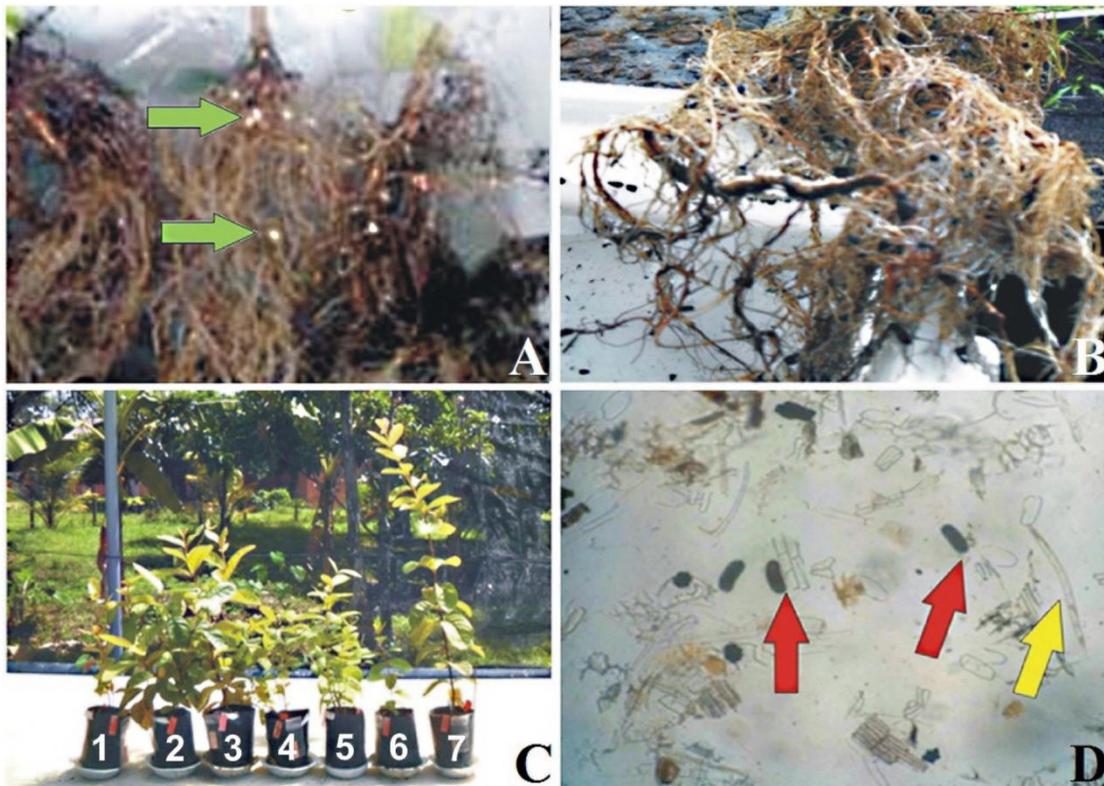


Figura 1. Sintomas de infecção causados pelo fitonematóide *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback. Setas verdes indicam a presença de galhas nas raízes dos genótipos araçazeiro (A), Engrossamento de raízes na goiabeira (B), Redução de crescimento do genótipos de araçazeiro 1, 2, 3, 4, 5 e 6, em contraste com o genótipo 7 não inoculado (C) e presença de ovos (setas vermelhas) e J2 (seta amarela) no extrato de raízes dos genótipos inoculados (D).

O fator de reprodução calculado para cada genótipo variou entre 0,18 (REC-DI-A04) e 9,22 (CAB-BP-A19) (Tabela 1), evidenciando uma grande variabilidade na resposta dos genótipos ao parasitismo do nematoide. Dentre os parâmetros utilizados para medição da resposta ao parasitismo de nematoides, o parâmetro FR é o mais preciso, sendo sensível a alteração de quantidade de inóculo e período anual de inoculação para quantificar o nível de resistência na interação planta-nematoide, fato este também observado por Burla et al. (2010).

Todos os genótipos oriundos da população REC-DI, e o genótipo PAU-CM-A03 apresentaram valores de FR < 1, indicando sua resistência ao patógeno. Todos os demais genótipos foram classificados como suscetíveis (FR > 1). O grau de suscetibilidade dos genótipos avaliados variou grandemente, com genótipos com valores de FR ligeiramente acima de 1, o que caracteriza uma baixa multiplicação do parasita, e valores de FR próximos de 10, indicando uma extrema suscetibilidade à multiplicação de *M. enterolobii*. Entre as goiabeiras

avaliadas, os genótipos HU-RJ-G01 e PAU-CM-G03, apresentaram valores de FR de 1,43 e 1,69, respectivamente, o que contrasta com o observado na literatura, onde goiabeiras são relatadas como bastante suscetíveis a este parasita, com valores de FR variando entre 5,6 (Scherer et al., 2012) e 42,81 (Martins et al., 2013). Entre os araçazeiros com FR pouco acima de 1, o genótipo CAB-EC-A50 apresentou o valor de 1,20, sendo classificado como moderadamente resistente. Desta forma, estes genótipos por apresentarem fator de reprodução pouco acima de 1, poderão ser utilizados em futuros estudos de resistência ao *M. enterolobii*. A partir do índice de redução do fator de reprodução (RFR) que compara os valores de FR de cada genótipo com o valor de FR do genótipo mais afetado (CAB-BP-A19), segundo a metodologia de Moura e Régis (1987), os genótipos foram classificados de acordo com o seu grau de tolerância ao fitoparasita. Segundo este critério, os genótipos REC-DI-A02 e REC-DI-A04 foram classificados como resistentes, sendo os mais promissores para futuros estudos de compatibilidade para uso como porta-enxerto de goiabeiras comerciais.

Tabela 1 – Avaliação de Patogenicidade do *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback em araçazeiros e goiabeiras da região da Zona da Mata do Estado de Pernambuco. UFRPE, Recife-PE, 2017

GENÓTIPO	FR	C	RFR	C	GENÓTIPO	FR	C	RFR	C		
HU-RJ-G01	1,43	b	S	84,38	MR	CAB-EC-A53	7,89	a	S	14,32	AS
PAU-CM-G01	4,04	a	S	56,09	PR	CAB-EC-A54	3,67	a	S	60,20	PR
PAU-CM-G02	2,42	b	S	73,68	PR	CAB-EC-A55	5,43	a	S	41,10	S
PAU-CM-G03	1,69	b	S	81,65	MR	CAB-EC-A56	2,46	b	S	73,27	PR
PAU-CM-G04	3,08	a	S	66,55	PR	CAB-EC-A57	5,16	a	S	43,95	S
CAN-19	3,78	a	S	58,90	PR	CAB-EC-A58	5,33	a	S	42,12	S
PAU-CM-A03	0,99	c	R	89,22	MR	CAB-EC-A60	2,88	b	S	68,75	PR
PAU-CM-A04	2,72	b	S	70,47	PR	CAB-BP-A01	2,22	b	S	75,83	MR
PAU-CM-A05	3,04	b	S	67,00	PR	CAB-BP-A02	3,56	a	S	61,35	PR
REC-DI-A01	0,58	c	R	93,71	MR	CAB-BP-A03	3,37	b	S	63,43	PR
REC-DI-A02	0,32	c	R	96,51	R	CAB-BP-A04	4,43	a	S	51,86	PR
REC-DI-A03	0,61	c	R	93,36	MR	CAB-BP-A05	4,49	a	S	51,22	PR
REC-DI-A04	0,18	c	R	97,94	R	CAB-BP-A07	8,13	a	S	11,78	AS
REC-DI-A05	0,40	c	R	95,58	MR	CAB-BP-A08	3,24	b	S	64,85	PR
CAB-EC-A41	6,47	a	S	29,81	S	CAB-BP-A09	2,93	b	S	68,19	PR
CAB-EC-A42	4,01	a	S	56,46	PR	CAB-BP-A10	2,64	b	S	71,28	PR
CAB-EC-A43	6,22	a	S	32,45	S	CAB-BP-A11	4,96	a	S	46,17	S
CAB-EC-A44	8,86	a	S	3,81	AS	CAB-BP-A13	7,90	a	S	14,31	AS
CAB-EC-A45	7,35	a	S	20,21	AS	CAB-BP-A14	2,22	b	S	75,85	PR
CAB-EC-A47	5,43	a	S	41,09	S	CAB-BP-A16	5,55	a	S	39,80	S
CAB-EC-A48	5,12	a	S	44,44	S	CAB-BP-A17	3,49	a	S	62,09	PR
CAB-EC-A49	4,94	a	S	46,36	S	CAB-BP-A18	3,93	a	S	57,30	PR
CAB-EC-A50	1,20	c	S	86,98	MR	CAB-BP-A20	3,31	a	S	64,10	PR

CAB-EC-A51	6,67 a	S	27,63	S	GO-COM	4,21 a	S	54,34	PR
CAB-EC-A52	6,53 a	S	29,11	S	CAB-BP-A19	9,22 a	S	0,00	AS

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. FR - Fator de Reprodução, RFR - Redução do Fator de Reprodução. Onde: $FR < 1$ espécie resistente (R), $FR = 0$ espécie imune (I) e $FR > 1$ espécie suscetível (S). C – Classificação: R (Resistente), S (Suscetível), AS (Altamente Suscetível), PR (Pouco Resistente), MR (Moderadamente Resistente). FR = População Final/População Inicial, PF = Quantidade de ovos e J2 observados ao final, a partir dos 8000 ovos iniciais de inóculo Oostenbrink, (1966), Letras ao lado dos valores de FR referem-se à análise de agrupamento pelo teste de Scott-Knot (5%) dos valores de FR transformados para raiz de x, utilizou-se o software Assistat 7.7.

Em relação ao índice de galhas, observou-se uma variação de 2,16 do genótipo REC-DI-A02 a 4,66 do genótipo CAB-EC-A44 (Tabela 2). Baseado neste critério, os genótipos REC-DI-A02, REC-DI-A04, REC-DI-A05 seriam considerados resistentes. No entanto, apenas a observação deste critério pode levar a classificações errôneas, devido à sua subjetividade e empirismo, de acordo com Costa Filho (2012). A análise de correlação entre as variáveis FR e IG revelou uma correlação positiva entre os dois índices ($R = 0,605$), indicando que existe uma tendência de que genótipos exibindo valores elevados de IG também apresentem valores elevados de FR (Figura 2).

Tabela 2 - Resultado da reação das espécies *Psidium guajava* L. e *Psidium guineense* Swartz a ação de parasitismo ao *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback. UFRPE, Recife-PE, 2017

GENÓTIPO	IG	OGR*	PF*	GENÓTIPO	IG	OGR*	PF*
HU-RJ-G01	4,00 a	24,79 c	104,56 b	CAB-EC-A53	4,50 a	52,29 a	243,49 a
PAU-CM-G01	4,50 a	39,14 b	176,86 a	CAB-EC-A54	3,66 a	41,61 b	169,24 a
PAU-CM-G02	4,16 a	32,58 c	130,75 b	CAB-EC-A55	4,33 a	41,29 b	195,95 a
PAU-CM-G03	4,33 a	25,44 c	113,42 b	CAB-EC-A56	3,00 b	30,97 c	128,09 b
PAU-CM-G04	4,66 a	27,20 c	155,34 a	CAB-EC-A57	4,50 a	41,80 b	195,54 a
CAN-19	3,83 a	43,82 b	170,34 a	CAB-EC-A58	4,50 a	34,85 b	198,18 a
PAU-CM-A03	3,66 a	24,79 c	84,66 c	CAB-EC-A60	3,50 b	59,20 a	147,31 b
PAU-CM-A04	4,16 a	42,92 b	143,89 b	CAB-BP-A01	4,33 a	33,34 c	129,56 b
PAU-CM-A05	4,16 a	38,39 b	137,91 b	CAB-BP-A02	4,33 a	36,36 b	160,33 a
REC-DI-A01	3,16 b	15,90 d	64,80 c	CAB-BP-A03	4,16 a	28,04 c	146,02 b
REC-DI-A02	2,16 c	13,39 d	49,53 c	CAB-BP-A04	4,50 a	39,71 b	179,65 a
REC-DI-A03	3,00 b	14,78 d	66,96 c	CAB-BP-A05	4,16 a	34,03 b	177,04 a
REC-DI-A04	2,33 c	11,74 d	36,07 c	CAB-BP-A07	4,33a	31,61 c	218,23 a
REC-DI-A05	2,66 c	13,76 d	54,50 c	CAB-BP-A08	4,16 a	35,59 b	150,61 b
CAB-EC-A41	4,16 a	40,42 b	213,29 a	CAB-BP-A09	4,50 a	36,93 b	150,93 b
CAB-EC-A42	4,16 a	39,15 b	174,80 a	CAB-BP-A10	4,16 a	32,87 c	138,65 b
CAB-EC-A43	4,16 a	38,57 b	209,97 a	CAB-BP-A11	4,50 a	48,19 a	190,46 a
CAB-EC-A44	4,66 a	45,77 b	260,49 a	CAB-BP-A13	4,33 a	44,20 b	225,30 a
CAB-EC-A45	4,33 a	46,85 a	228,18 a	CAB-BP-A14	3,83 a	37,11 b	128,29 b
CAB-EC-A47	3,66 a	52,57 a	193,61 a	CAB-BP-A16	3,66 a	40,49 b	196,27 a
CAB-EC-A48	4,00 a	36,19 b	189,46 a	CAB-BP-A17	3,83 a	27,72 c	155,52 a

CAB-EC-A49	3,83 a	29,91 c	185,80 a	CAB-BP-A18	4,16 a	34,90 b	164,81 a
CAB-EC-A50	3,50 b	18,35 d	95,10 c	CAB-BP-A20	4,16 a	34,70 b	159,66 a
CAB-EC-A51	4,00 a	57,41 a	217,33 a	GO-COM	4,33 a	52,36 a	179,56 a
CAB-EC-A52	4,16 a	53,08 a	206,66 a	CAB-BP-A19	4,33 a	55,45 a	267,52 a
CV(%)	-	-	-	-	17,23	34,67*	39,44*

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. IG – Índice de galhas, OGR – Ovos por grama de raiz (g), PF = População Final, * = Dados Transformados para Raiz de X.

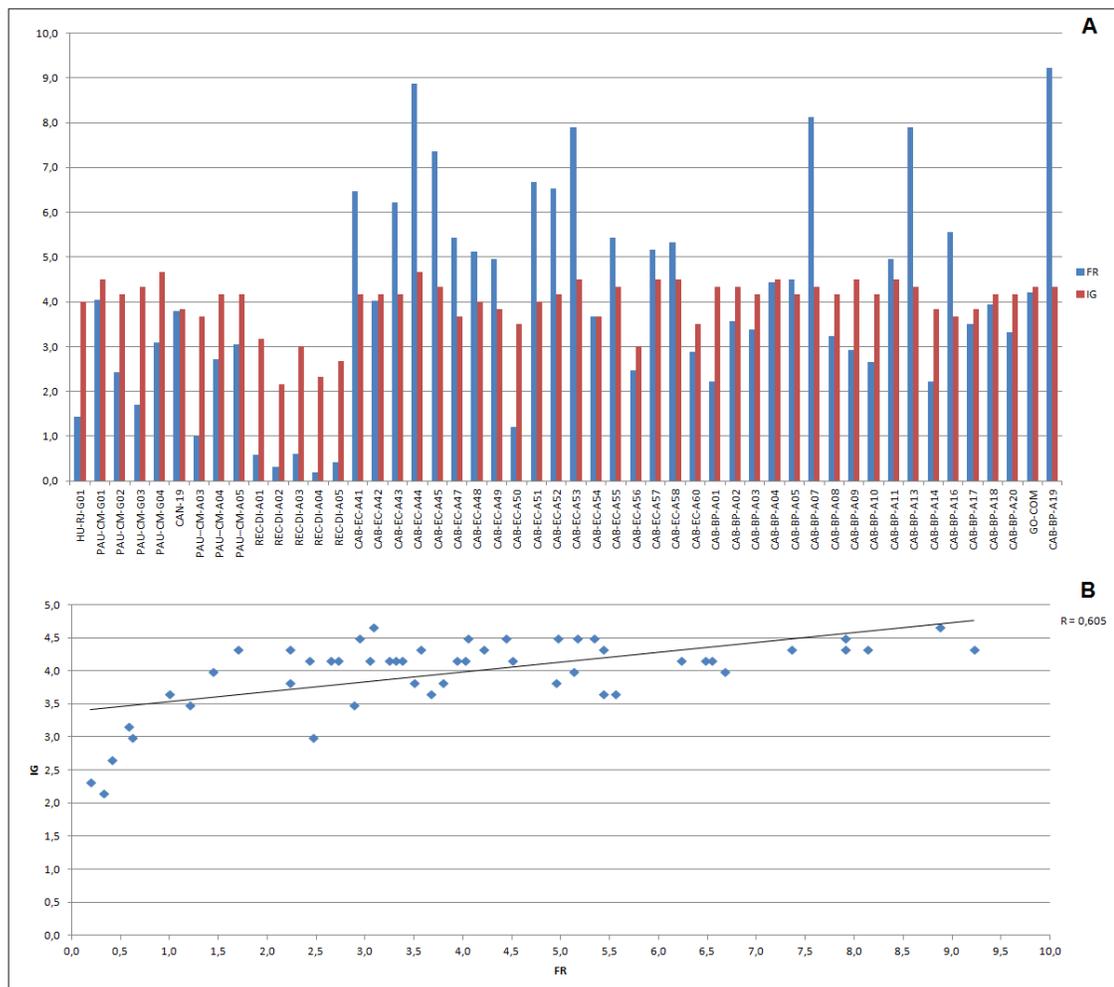


Figura 2. Índice de galhas e fator de reprodução em genótipos de araçazeiro e goiabeira por ação do *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback (A) e correlação entre as variáveis Fator de Reprodução (FR) e Índice de Galhas (IG) (B).

Os dados de ovos por grama de raiz (OGR) e População Final (PF), demonstraram grande variação entre os genótipos analisados (Tabela 2), de forma similar ao observado pela análise do fator de reprodução, os genótipos da população REC-DI apresentaram os resultados mais promissores, diferindo estatisticamente dos demais genótipos.

Diversos estudos sobre a reação de genótipos e variedades comerciais de goiabeira ao parasitismo de *M. enterolobii*, demonstraram sua extrema suscetibilidade a este parasita (Scherer et al., 2012; Martins et al., 2013; Pereira et al., 2016). As espécies da família Myrtaceae apresentam diferentes graus de reação ao parasitismo de *M. enterolobii*. Apesar de genótipos imunes terem sido encontrados em espécies do gênero *Psidium*, como *P. cattleyanum*, *P. myrtoides* e *P. acutangulum*, as espécies *P. guajava* e *P. guineense* são consideradas mais suscetíveis a este fitonematóide (Marques et al., 2012). Apesar da resistência encontrada em *P. cattleyanum*, testes de enxertia indicaram uma incompatibilidade para ser utilizada como porta-enxerto com a cultivar Paluma (Almeida et al., 2009). Desta forma é de grande importância, a busca de genótipos resistentes ao parasita, mas também que tenham maior possibilidade de compatibilidade com variedades comerciais de goiabeira (Freitas et al., 2014).

CONCLUSÕES

Os genótipos de araçazeiros REC-DI-A02 e REC-DI-A04 por terem alcançado os melhores resultados na avaliação de redução do fator de reprodução, podem ser indicados como fonte de resistência à *M. enterolobii* e também como genótipos promissores para testes de enxertia com variedades comerciais de goiabeira.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5 ed: Elsevier Academic Press, Burlington. 952p.
- Almeida, E. J., P. L. M. Soares, J. M. Santos, e A. B. G. Martins. 2009. Resistência de goiabeiras e araçazeiros a *Meloidogyne mayaguensis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 421-423.
- Biazatti, M. A., R. M. Souza, C. S. Marinho, D. O. Guilherme, G. S. Campos, V. M. Gomes, e A. C. Bremenkamp. 2016. Resistência de genótipos de araçazeiros a *Meloidogyne enterolobii*. Ciência Rural 46: 418-420.
- Bird, D. M. 2004. Signaling between nematodes and plants. Curr. Opin. Plant Biol. 7: 372-376.
- Burla, R. S., R. M. Souza, V. M. Gomes, e F. M. Corrêa. 2010. Comparação entre níveis de inóculo, épocas de avaliação e variáveis para seleção de *Psidium* spp. visando à resistência a *Meloidogyne mayaguensis*. Nematologia Brasileira 34: 2.

- Carneiro, R. M. D. G., W. A. Moreira, M. R. A. Almeida, e A. C. M. M. Gomes. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira* 25: 223-228.
- Carneiro, R. G., A. P. A. Monaco, M. P. Moritz, K. C. Nakamura, e A. Scherer. 2006. Identificação de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e em plantas invasoras, em solo argiloso, no Estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 30: 293-298.
- Carneiro, R. M. D. G., K. M. S. Siqueira, M. F. A. Santos, M. R. A. Almeida, e M. S. Tigano. 2008. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e mamoeiro no estado de Goiás. *Fitopatologia Brasileira* 33: S258 (Suplemento).
- Charchar, J. M., M. E. N. Fonseca, L. B. Boiteux, e A. F. Lima Neto. 2009. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no estado de Tocantins. *Nematologia Brasileira* 33: 182-186.
- Costa Filho, J. H. 2012. Coleta e reação de acessos de melancia a *Meloidogyne enterolobii*. 55f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido.
- Freitas, V. M., V. R. Correa, F. C. Motta, M. G. Sousa, A. C. M. M. Gomes, M. D. G. Carneiro, D. B. Silva, J. K. Mattos, M. Nicole, e R. M. D. G. Carneiro. 2014. Resistant accessions of wild *Psidium* spp. to *Meloidogyne enterolobii* and histological characterization of resistance. *Plant Pathology* 63:738-746.
- Gomes, C. B., M. E. O. Couto, e R. M. D. G. Carneiro. 2008. Registro de ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e fumo no Sul do Brasil. *Nematologia Brasileira* 32: 244-247.
- Gonzaga Neto, L. 2007. Produção de goiaba. Fortaleza: Instituto Frutal, 64p.
- Guimarães, L. M. P., R. M. Moura, e E. M. R. Pedrosa. 2003. Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. *Nematologia Brasileira* 27: 139-147.

- Hartman, K. M., e J. N. Sasser. 1985. Identification of Meloidogyne species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Sasser, J. N., C. C. Carter and K. R. Barker. An advanced treatise on meloidogyne: methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics 2: 69-77.
- Hussey, R. S., e K. R. Barker. 1973. A Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- Maranhão, S. R. V. L., R. M. de Moura, e E. M. R. Pedroza. 2001. Reação de indivíduos segregantes de goiabeira a *Meloidogyne incognita* raça1 e *M. mayaguensis*. Nematologia Brasileira 25: 191-195.
- Marques, M. L. S., J. P. Pimentel, O. C. H. Tavares, C. F. M. Veiga, e R. L. L. Berbara. 2012. Hospedabilidade de diferentes espécies de plantas a *meloidogyne enterolobii* no Estado do Rio de Janeiro. Nematropica 42: 303-313.
- Martins, L. S. S., R. S. Musser, A. G. Souza, L. V. Resende, e W. R. Maluf. 2013. Parasitismo de *Meloidogyne enterolobii* em espécies de Myrtaceae. Revista Brasileira de Fruticultura 35: 477-484.
- Moreira, A. A., L. S. S. Martins, R. S. Musser, R. S. Moraes Filho, W. Maranhão, J. G. Rossiter, e A. V. V. Montarroyos. 2016. Response of *Malpighia emarginata* active germplasm bank accessions to *Meloidogyne enterolobii* parasitism. Genetics and Molecular Research 15: gmr. 15048868.
- Moura, R. M., e E. M. O. Régis. 1987. Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). Nematologia Brasileira 11: 215-225.
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Med Van De landbouwhogeschool Wageningen, Nederland 66: 1-46.

- Pereira, F. M., e R. Kavati. 2011. Contribuição da pesquisa científica brasileira no desenvolvimento de algumas frutíferas de clima subtropical. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 92-108.
- Pereira, K. C., P. L. M. Soares, J. M. dos Santos, E. S. P. Batista, e W. J. Maldonato Jr. 2016. Desenvolvimento de cultivares de goiabeira inoculadas com *Meloidogyne enterolobii*. *Nematropica* 46: 54-59.
- Perry, R. N., e N. Moens. 2011. Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. Pp. 3-20 *in*: Jones, J., G. Gheysen and C. Fenoll, eds. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer, Dordrecht.
- Raseira, M. C. B., e A. Raseira. 1996. Contribuição ao Estudo do Araçazeiro: *Psidium cattleyanum*. Pelotas: Embrapa-CPACT, 95p.
- Rodríguez, N. N., J. J. Valdés-Infante, J. A. Rodríguez, e J. B. Velásquez. 2010. Genetic resources and breeding of guava (*Psidium guajava* L.) in Cuba. *Biotecnol. Apl.* 27: 238-241.
- Scherer, A., R. G. Carneiro, A. P. A. Mônaco, M. P. Moritz, K. C. Nakamura, J. C. Gomes, N. C. Torrezani, D. C. Santiago, e R. M. D. G. Carneiro. 2012. Reação de Genótipos de *Psidium guajava* a *Meloidogyne enterolobii*. *Nematologia Brasileira* 36: 1-2.
- Souza, R. M., M. S. Nogueira, I. M. Lima, e M. Melarato, et al. 2006. Manejo de nematoides das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. *Nematologia Brasileira* 30: 165-169.
- Taylor, A. L., e J. N. Sasser. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (Especies de Meloidogyne)*. Universidad del Estado de Carolina del Norte, 111p.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE SEQUÊNCIAS PROTEICAS DE CALRETICULINA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE NEMATOIDES COM USO DE FERRAMENTAS *in silico*.

Artigo a ser enviado para **Revista GMR** (Genetics and Molecular Research).

Caracterização estrutural e funcional de sequências proteicas de calreticulina em diferentes espécies de nematoides com uso de ferramentas *in silico*.

Edilton de Albuquerque Cavalcanti Junior^{1,2}, Alana Manoela Fraga Menezes² Rômulo Maciel de Moraes Filho^{1,2},
Angélica Virginia Valois Montarroyos², Luiza Suely Semen Martins^{1,3}

¹Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Agronomia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Biologia, UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900. Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor correspondente: E.A Cavalcanti Junior

E-mail: edycanti@gmail.com

RESUMO

Dentre os fitonematóides do gênero *Meloidogyne* que causam grandes prejuízos ao agronegócio, à espécie *Meloidogyne enterolobii*, tem se destacado devido à alta patogenicidade, ampla gama de hospedeiros e ser encontrada em diversas regiões tropicais. São endoparasitas obrigatórios que causam diversos estresses bióticos à planta, utilizando-se de um conjunto de fatores favoráveis ao parasitismo, sendo capazes de penetrar e migrar dentro dos tecidos vegetais e estabelecer uma interação planta-nematoide. Substâncias produzidas, pelas glândulas dorsais e subventrais da região do esôfago do parasita, são injetadas nas raízes por meio do seu estilete, degradando componentes da parede vegetal como a celulose, hemicelulose e pectina, induzindo a formação de sítios de alimentação e formação de galhas nas raízes. A calreticulina (CRT), uma proteína de excreção, altamente conservada em animais e plantas foi identificada nas secreções de diversos parasitas indicando que estão associadas a supressão da imunidade da planta. A bioinformática tem propiciado informações valiosas sobre as biomoléculas e através de análises *in silico*, tem fornecido dados de caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas, predição estrutural e funções das proteínas, além de possibilitar comparações de sequências biológicas de diversas espécies. Em nossa análise foram caracterizadas 15 sequências da proteína CRT entre nematoides de vida livre, parasitas de plantas e animais, presentes em bancos de dados genômicos. Resultados obtidos indicaram a presença de cinco domínios funcionais conservados e multifuncionais entre as CRTs. Os parâmetros físico-químicos demonstraram que a CRT tem baixa atividade em pH ácido, afinidade em meio aquoso, sendo de caráter hidrofílico. A análise de agrupamento apresentou consistência com a classificação taxonômica das espécies avaliadas. O modelo 3D da CRT apresentou estabilidade em nível energético, possibilitando a compreensão da estrutura da proteína. Os resultados obtidos sobre a CRT podem fornecer condições para futuros estudos de resistência em plantas contra ataques de nematoides.

Palavras-Chave: Aminoácidos; Bioinformática; Domínios conservados; *Meloidogyne enterolobii*; Modelo 3D.

ABSTRACT

Among the phytonematodes of the *Meloidogyne* genus, that cause great damage to cultivated species, *Meloidogyne enterolobii*, has raised a major concern due its high pathogenicity, wide range of hosts and occurrence in several tropical regions. This species are an obligatory endoparasite that cause several biotic stresses to plants, using a set of parasitism factors, being able to penetrate and migrate within the plant tissues and establish a plant-nematoid interaction. Substances produced by the dorsal and subventral glands in the esophagus region of the parasite are injected into the roots by a hollow stylet, degrading plant cell wall components such as cellulose, hemicellulose and pectin, and inducing the formation of feeding sites and galls in the roots. Calreticulin (CRT), a highly conserved protein in animals and plants, has been identified in the secretions of several parasites indicating that they are associated with suppression of plant immunity. Bioinformatics has provided valuable information on biomolecules and, through *in silico* analysis, has provided structural and functional characterization data of genomic sequences, structural prediction and protein functions, as well as comparisons of biological sequences of several species. In our analysis 15 CRT sequences were characterized from free-living, plant and animal parasitic nematodes, present in genomic databases. The results also indicated the presence five functional domains. The analysis of the physical-chemical parameters showed hydrophilic CRTs with acidic isoelectric points (PI). The cluster analysis showed consistency with the taxonomic classification of the evaluated species. We also developed a stable CRT 3D model which may help the understanding of the structure of this protein. The results obtained on CRT may provide insights for future resistance studies in plants against nematode attacks.

Key words: Amino acids; Bioinformatics; Preserved domains; *Meloidogyne enterolobii*; 3D model.

INTRODUÇÃO

O filo nematoda compreende mais de 25.000 espécies descritas. Aparentemente todas as plantas cultivadas têm uma ou mais espécies de nematoides como endo ou ectoparasitas. A ordem Tylenchida é o mais importante grupo de nematoides parasitas, que causam, em termos mundiais, bilhões de dólares em perdas para o agronegócio a cada ano. Estes parasitas representam a maior fonte de estresse biótico para plantas, e podem causar enfraquecimento, senescência precoce e até perda total para várias culturas. Estima-se que mais de 5.000 espécies de plantas em todo o mundo são infestadas por esses organismos (Kepenekci e Öztürk, 2002; Bird, 2004; Blok et al., 2008; Perry e Moens, 2011).

Os fitonematóides do gênero *Meloidogyne* são altamente destrutivos e estão associados a perdas de produção em diversas lavouras mundialmente. Dentre as espécies do gênero, *Meloidogyne enterolobii* Yang e Eisenback é considerada a mais agressiva (Brito et al., 2004; Kiewnick et al., 2009). A espécie foi reportada na África, América Central, América do Sul, Estados Unidos, França e China (EPPO Global Database, 2008). *M. enterolobii* foi detectado no Nordeste do Brasil, em pomares de goiabeira e desde então, tem sido uma grande preocupação devido à sua acelerada propagação e ao seu potencial destrutivo, impossibilitando o cultivo em áreas onde esteja presente (Carneiro et al., 2001). A presença destes parasitas em diferentes regiões do mundo vem sendo crescentemente reportada, incluindo em lavouras de plantas com

genes de resistência a outras espécies do gênero (Blok et al., 2002; Carneiro et al., 2006; Brito et al., 2007).

Os fitonematóides empregam um conjunto de fatores de parasitismo para habilitar a penetração nas raízes de seus hospedeiros e para estabelecerem seus sítios de alimentação. Assim sendo, são capazes de penetrar e migrar dentro dos tecidos vegetais, estabelecendo uma sofisticada interação com seus hospedeiros. Os fatores de parasitismo consistem em uma série de substâncias produzidas pelas glândulas dorsais e subventrais da região esofagiana do nematoide, que são injetadas nas raízes por meio do seu estilete projetável (Jaouannet et al., 2012).

Alguns desses fatores são responsáveis pela degradação dos componentes da parede celular do hospedeiro, enquanto outros induzem a diferenciação de células vegetais, formando células multinucleadas, que passam por alterações fenotípicas, funcionais e metabólicas (Jones e Payne, 1978; Wiggers et al., 1990; Ding et al., 1998). Galhas são formadas ao redor das células gigantes e as raízes tornam-se distorcidas, comprometendo suas funções e prejudicando o crescimento da planta. E é por meio das células gigantes que os fitonematóides garantem sua alimentação, desenvolvimento e reprodução (Ding et al., 1998).

Entre essas substâncias, destaca-se a calreticulina (CRT), uma proteína multifuncional altamente conservada em animais e plantas (Cabezón et al., 2008). Diversos estudos identificaram a CRT nas secreções do estilete de nematoides fitoparasitas (Jaubert et al., 2002, Holaska et al., 2002; Jaouannet et al., 2012; Li et al., 2015) e também em secreções de nematoides parasitas de animais (Suchitra e Joshi, 2005), que a relacionam com a supressão dos sistemas de defesa dos hospedeiros. Por ser encontrada nas secreções de diversos hospedeiros, supõe-se que a CRT tenha um papel importante no parasitismo (Ferreira et al., 2004).

A supressão da produção da CRT por *knockdown* em nematoides fitoparasitas levou à diminuição do sucesso da infecção e da capacidade de multiplicação e formação de galhas, deixando clara a função dessa proteína no processo de parasitismo (Christensen et al., 2010; Jaouannet et al., 2012). Dentre os nematoides fitoparasíticos, a CRT foi identificada em *Aphelenchoides besseyi* (Feng et al., 2015b), *Bursaphelenchus xylophilus* (Li et al., 2011), *Ditylenchus destructor* (Wang et al., 2009), *Globodera rostochiensis* (Eves-Van Den Akker et al., 2016), *Meloidogyne enterolobii* (Long e Sun, 2015), *Meloidogyne incognita* (Jaubert et al., 2002), *Pratylenchus goodeyi* (Pestana et al., 2013) e *Radopholus similis* (Peng et al., 2009).

Análises *in silico* podem ser de grande importância para a identificação, caracterização estrutural e funcional de sequências genômicas, além de possibilitar a predição de estruturas e funções de proteínas. Este tipo de experimentação representa uma alternativa de baixo custo para estudos sobre funções biológicas com modelos computacionais bastante precisos, quando comparados com as condições naturais, e mais especificamente, podem auxiliar na busca de genes ligados ao parasitismo e à resistência nas espécies hospedeiras (Darabi e Seddigh, 2015; Feng et al., 2015a; Han et al., 2015; Vatansever et al., 2016; Moraes Filho e Martins, 2016). Esses recursos computacionais e ferramentas voltadas para a biologia molecular possibilitam análises de sequências de biomoléculas, análises de parâmetros físicos e químicos de proteínas, localização de pontos de clivagem de peptídeo sinal das sequências de aminoácidos, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi de caracterizar sequência da proteína calreticulina, verificar sua conservação filogenética entre nematoides de vida livre, parasitas de animais e plantas, identificando a funcionalidade, localização subcelular da proteína e o domínio conservado, bem como, representar por meio de modelagem computacional *in silico* a homologia e estrutura terciária da proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

Busca de dados e identificação de sequências

A busca de sequências de proteínas para *M. enterolobii* foi realizada na base de dados pública disponível no *National Center for Biotechnology Informations* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Com auxílio da ferramenta BLASTp foi possível a localização de sequências homólogas de proteínas e similares em nematoides de vida livre, parasitas de animais e de plantas.

Caracterização estrutural das sequências

Por meio da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al. 2005) foram calculados os parâmetros físicos e químicos como: peso molecular, ponto isoelétrico (pI), composição de aminoácidos e hidropaticidade média (GRAVY).

A localização subcelular das sequências foi deduzida pelo servidor CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/>) (Yu et al., 2014). A presença de peptídeo sinal e localização de seus pontos de clivagem foram investigadas com uso do servidor SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011).

Caracterização e localização de domínios funcionais

A caracterização funcional das sequências da proteína CRT foi realizada no servidor *Predict Protein* (Yachdav et al., 2014) (<https://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>).

A identificação dos domínios funcionais da proteína, sua classificação e ontologia foram realizadas com o uso do servidor *Prodom* (Servant et al., 2002). (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>), uma base de dados de família de domínios de proteínas de segmentos homólogos.

Previsão de efeitos funcionais de mutações de sequência

A estimativa dos efeitos funcionais ocasionados por mutações de sequências de aminoácidos foram obtidas por meio do servidor SNAP2 (Hecht et al., 2015) (<https://roslab.org/services/snap2web/>).

Análise de agrupamento

As sequências de aminoácidos foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW, implementado no software - MEGA 6.06 (Tamura et al., 2011). Cladogramas foram geradas pelo método de neighbor Joining (NJ) com 1000 replicatas (bootstrap).

Predição de estrutura terciária e validação do modelo

Modelos 3D da proteína CRT para *M. enterolobii* foram gerados por um conjunto de ferramentas do servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley et al., 2015). Os modelos foram visualizados pelo software UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004). A qualidade do modelo gerado foi avaliada com o uso do servidor Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>) (Chen et al., 2010), pela análise do gráfico de Ramachandran. O Z-score foi calculado pelo servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came3.sbg.ac.at/prosa.php>) (Wiederstein e Sippl, 2007) para o reconhecimento de erros na estrutura 3D. Minimização de energia e correção de pequenos erros no modelo tridimensional foram realizados pelo servidor Yasara force Field (Krieger et al., 2009) e pelo software KiNG (Chen et al., 2009).

RESULTADOS

Identificação e caracterização da calreticulina (CRT)

Neste estudo foram analisadas sequências da proteína CRT de *M. enterolobii* e de outros nematoides fitoparasiticos, parasíticos de animais e de vida livre, recolhidas das bases de dados do NCBI e do banco de genomas Wormbase. A sequência da proteína CRT da espécie *M. enterolobii* foi recuperada em formato FASTA, sendo utilizada como *query* na ferramenta BLASTp para a localização de sequências homólogas e similares em outros nematoides.

Foram selecionadas quinze sequências de CRT em espécies de nematoides, sendo oito em parasitas de plantas distribuídos nas famílias: Meloidogynidae (2), Aphelenchoididae (2), Anguinidae (1), Pratylenchidae (2), Heteroderidae (1); três em parasitas de animais distribuídos nas famílias: Haemonchidae (1), Onchocercidae (2) e quatro de vida livre distribuídos nas famílias: Steinernematidae (1) e Rhabditidae (3), as sequências encontram-se listadas na tabela 1. Todas as sequências selecionadas foram identificadas com peptídeo sinal pelo servidor SignalP. A presença do peptídeo sinal é característica de proteínas de excreção. O signalP, identificou os pontos de clivagem e parâmetros sobre as regiões de ocorrência, ponto de saída e ausência do peptídeo sinal (Figura 1).

Caracterização estrutural das sequências

Com base nas informações de localização do peptídeo sinal e seu ponto de clivagem, foi possível determinar os parâmetros físico-químicos das sequências de CRT e investigar as estruturas e funcionalidades da proteína. Os parâmetros obtidos por meio do servidor ProtParam, são demonstrados com e sem peptídeo sinal (Tabela 2). Após a remoção do peptídeo sinal, as sequências de CRT analisadas variaram de tamanho entre 374 aa (*Caenorhabditis elegans*) a 393 aa (*M. enterolobii* e *M. incognita*) e peso molecular de 42.6 kDa (*Dirofilaria immitis*) e 46.1 kDa (*M. incognita* e *M. enterolobii*). O ponto isoelétrico (pI) das sequências ficou entre 4.56 (*Caenorhabditis brenneri*) e 5.39 (*D. immitis*).

O ponto isoelétrico é o pH em que a proteína torna-se insolúvel e, portanto, instável (Shaw et al., 2001). Desta forma, as CRTs identificadas teriam baixa atividade em pH ácido, atuando, provavelmente, na faixa neutra ou alcalina. A hidropaticidade média GRAVY, variou entre -1.176 (*Caenorhabditis briggsae*) e -1.442 (*Pratylenchus goodeyi*). Esses resultados indicam que os CRTs analisados são de caráter hidrofílico. O servidor CELLO2GO foi usado para analisar a localização subcelular das sequências. Todas as sequências foram descritas como proteínas intracelulares da região do retículo endoplasmático.

Tabela 1. Quinze sequências da Calreticulina (CRT) e suas espécies de origem, obtidas do banco de dados do NCBI

Espécie	Identificação	Ordem	Familia	Modo de Vida
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	AIL52184.1	Tylenchida	Aphelenchoididae	Pp
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	ADD82420.1	Tylenchida	Aphelenchoididae	Pp
<i>Ditylenchus destructor</i>	ACV33082.1	Tylenchida	Anguinidae	Pp
<i>Globodera rostochiensis</i>	GROS_g02225.t1	Tylenchida	Heteroderidae	Pp
<i>Meloidogyne enterolobii</i>	AMQ22793.1	Tylenchida	Meloidogynidae	Pp
<i>Meloidogyne incognita</i>	AAL40720.1	Tylenchida	Meloidogynidae	Pp
<i>Pratylenchus goodeyi</i>	AIW66697.1	Tylenchida	Pratylenchidae	Pp

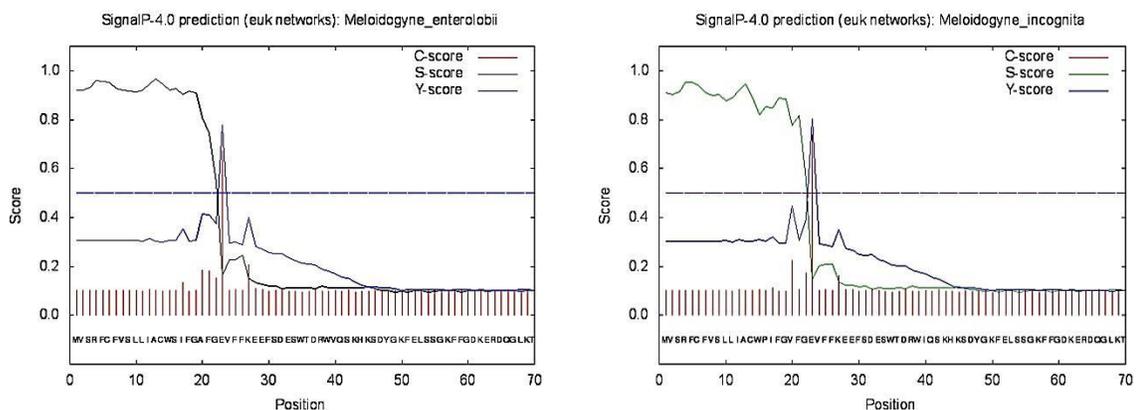
<i>Radopholus similis</i>	ACY01917.1	Tylenchida	Pratylenchidae	Pp
<i>Dirofilaria immitis</i>	AAD03405.1	Spirurida	Onchocercidae	Pa
<i>Haemonchus contortus</i>	CDJ90114.1	Rhabditida	Haemonchidae	Pa
<i>Wuchereria bancrofti</i>	EJW84212.1	Spirurida	Onchocercidae	Pa
<i>Caenorhabditis brenneri</i>	EGT47209.1	Rhabditida	Rhabditidae	VL
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP002636809.1	Rhabditida	Rhabditidae	VL
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NP 504575.1	Rhabditida	Rhabditidae	VL
<i>Steinernema feltiae</i>	ACS32297.1	Rhabditida	Steinernematidae	VL

Modo de Vida: Pp - Parasita de plantas, Pa - Parasita de Animal, VL - Vida Livre

Tabela 2. Estruturas primárias, peptídeo sinal e localização subcelular da Calreticulina (CRT)

Espécie	Tamanho da Proteína	PM (kDa)	pI	GRAVY	SCPS	LSc
<i>B. xylophilus</i>	399/378	46.3/44.1	4.67/4.64	-1.152/-1.285	A21-A22	In;RE
<i>D. destructor</i>	404/383	46.8/44.5	4.59/4.57	-1.178/-1.325	A21-A22	In;RE
<i>G. rostochiensis</i>	413/392	48.1/45.7	4.66 /4.66	-1.169/-1.317	A21-A22	In;RE
<i>M. enterolobii</i>	415/393	48.6/ 46.1	4.64/ 4.62	-1.195/-1.359	A22-A23	In;RE
<i>M. incognita</i>	415/393	48.5/46.1	4.67/4.65	-1.189/-1.357	A22-A23	In;RE
<i>P. goodeyi</i>	413/392	48.2/46.0	4.63/4.63	-1.276/-1.442	A21-A22	In;RE
<i>R. similis</i>	405/384	47.5/45.2	4.73/4.70	-1.246/-1.406	A21-A22	In;RE
<i>D. immitis</i>	387/366	44.9/42.6	5.50/5.39	-1.093/-1.230	A21-A22	In;RE
<i>H. contortus</i>	403/382	47.0/44.7	4.77/4.74	-1.166/-1.320	A21-A22	In;RE
<i>W. bancrofti</i>	404/383	47.4/45.1	4.78/4.76	-1.258/-1.420	A21-A22	In;RE
<i>A.besseyi</i>	402/381	46.7/44.6	4.58/4.57	-1.144/-1.296	A21-A22	In;RE
<i>C. brenneri</i>	396/375	45.7/43.4	4.58/4.56	-1.059/-1.192	A21-A22	In;RE
<i>C. briggsae</i>	396/375	45.8/43.5	4.58/4.57	-1.044/-1.176	A21-A22	In;RE
<i>C. elegans</i>	395/374	45.6/43.3	4.59/4.58	-1.065/-1.199	A21-A22	In;RE
<i>S. feltiae</i>	402/381	46.5/44.2	4.56/4.53	-1.083/-1.232	A21-A22	In;RE

PM: Peso Molecular; pI: Ponto isoelétrico; GRAVY: Grand average of hydropathicity; SCPS: Sítio conservado de peptídeo sinal; LSc: Localização Subcelular; In: intracelular; RE: Retículo Endoplasmático.



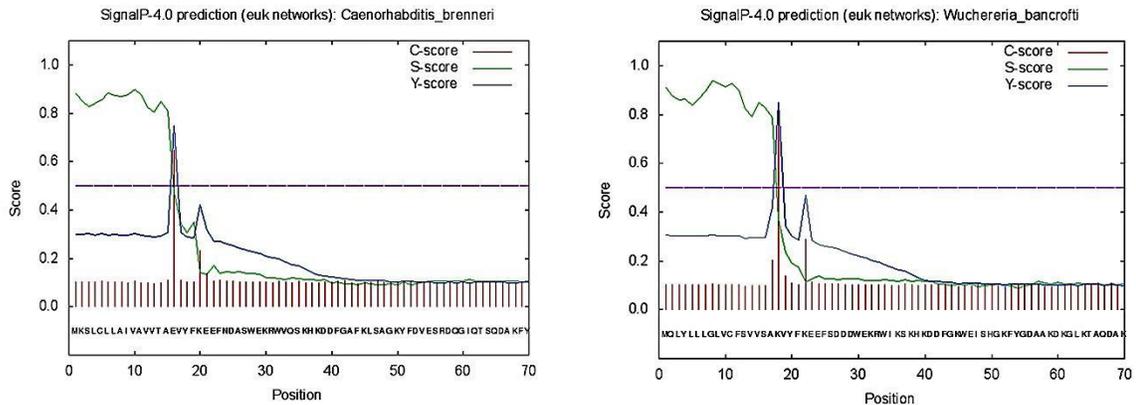


Figura 1. Sequências de aminoácidos com seus pontos de clivagem de peptídeo sinal das espécies pelo servidor SignalP de: *Meloidogyne enterolobii*, *Meloidogyne incognita*, *Caenorhabditis brenneri* e *Wuchereria bancrofti*. Pontuações de saída: C-score (Ponto de saída do peptídeo sinal), S-score (região que contém o peptídeo sinal e a região sem o peptídeo sinal da proteína), Y-score (indica o Pico C e a região de inclinação sem o peptídeo sinal).

Alinhamento múltiplo das sequências

Por meio do software Mega 6.06 foi executado o algoritmo ClustalW para o alinhamento múltiplo das sequências proteicas de calreticulina (Figura 2). A seta em azul indica a região de clivagem do peptídeo sinal. Com base no alinhamento, foi possível identificar regiões de alta similaridade entre as sequências analisadas. A conservação desta proteína entre organismos de três ordens (Tylenchida, Rhabditida e Spirurida) e modos de vida distintos, indica sua importância para o desenvolvimento destas espécies, além da sua função no parasitismo.

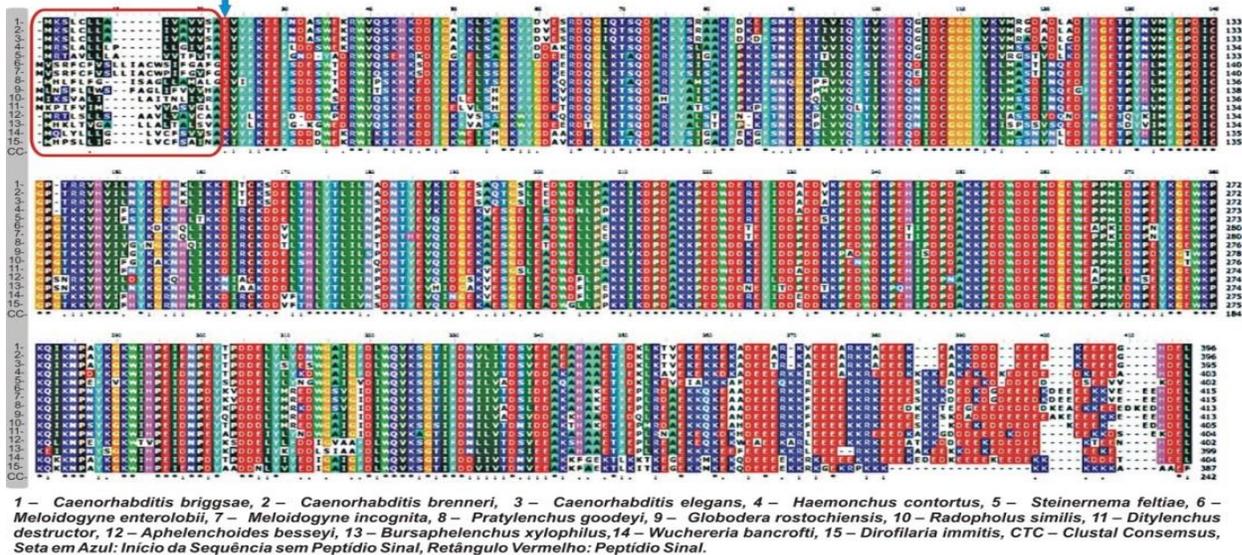


Figura 2. Alinhamento múltiplo de sequências de Calreticulina (CRT).

Caracterização e localização de domínios funcionais

A caracterização funcional da Me-CRT realizada pelo servidor Predict Protein indicou que esta proteína está relacionada com funções de ligação com proteínas não dobradas e íons de cálcio, tendo uma função provável no auxílio ao dobramento proteico (Figura 3).

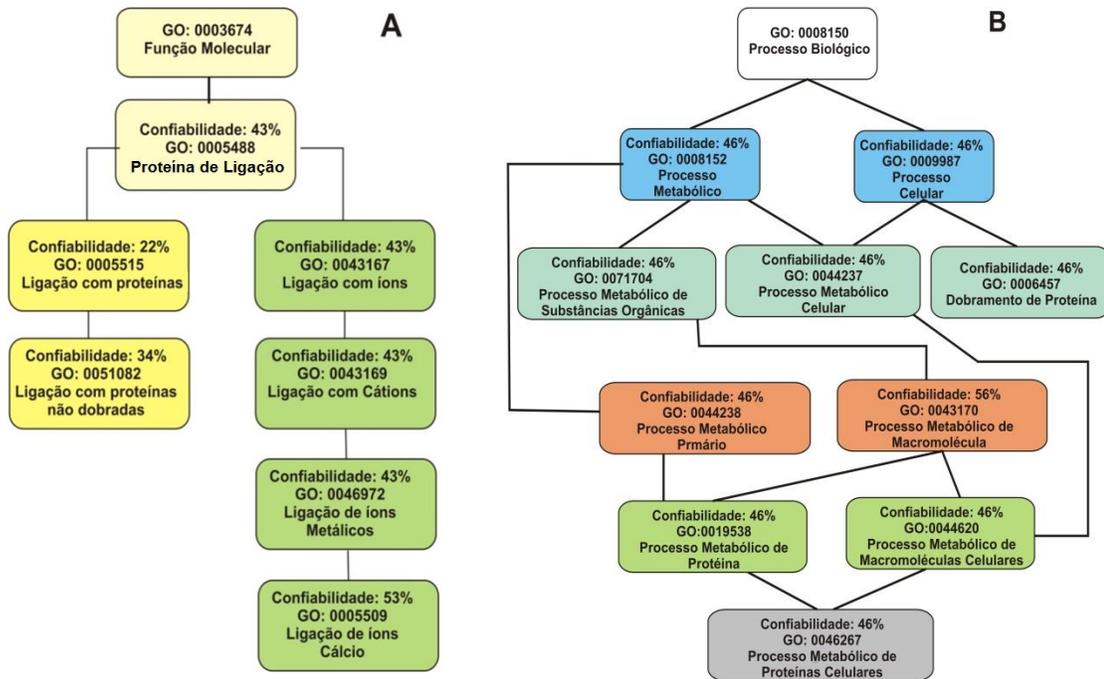


Figura 3. Função Molecular (A) e Processos Biológicos (B) de Calreticulina (CRT).

Foi identificada a presença de cinco domínios funcionais (PD001866, PD134703, PD532806, PDB1V5W4 e PDC4G142) nas sequências de aminoácidos da CRT (Tabela 3). O domínio PD001866 foi identificado em todas as sequências analisadas, sendo altamente conservado, o que sugere sua importância para o funcionamento da proteína. O domínio PD134703 foi o segundo mais encontrado entre as espécies, estando presente nas ordens Tylenchida e Rhabditida, enquanto, os domínios PDC4G142 e PDB1V5W4 só foram encontrados na ordem Rhabditida (Figura 4).

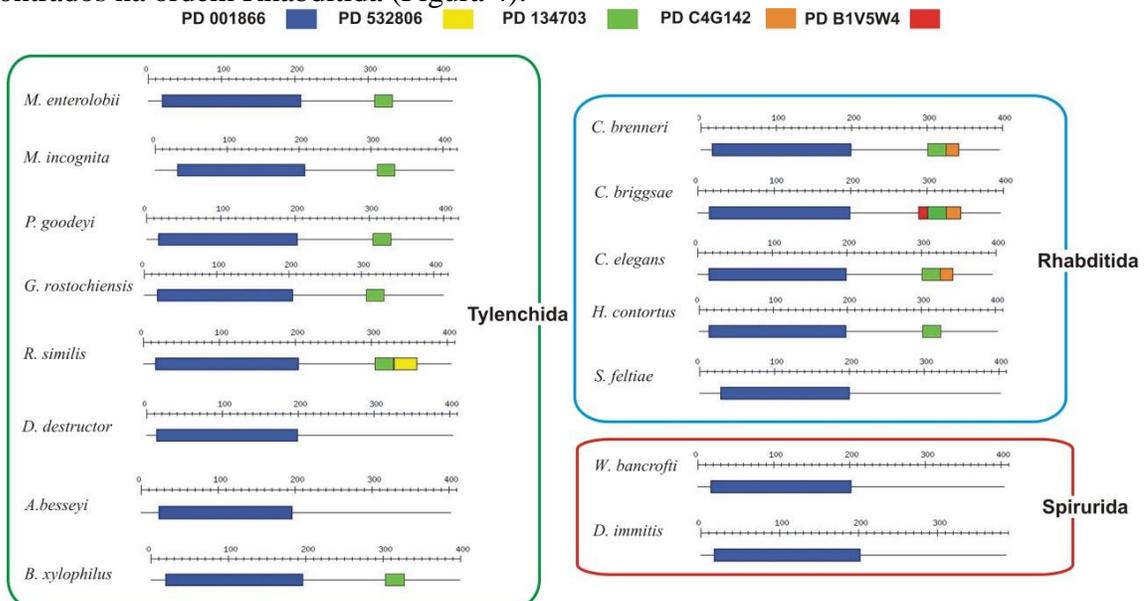


Figura 4. Domínio funcional com relação à Calreticulina (CRT) observados pelo servidor ProDom.

Tabela 3. Domínios funcionais identificados pelo servidor ProDom em Calreticulina (CRT)

Domínios	Pfam Classificação	Ontologia
PD001866	Calreticulina	Dobragem de proteínas, componente integral da membrana, ligação de proteínas desdobradas, ligação de proteína envolvida na dobragem de proteínas.
PD134703	Calreticulina	-----
PD532806	---	Lúmen do retículo endoplasmático, dobragem de proteínas, ligação de proteína envolvida na dobragem de proteínas, ligação de proteínas desdobradas.
PDB1V5W4	Calreticulina	Dobragem de proteínas, componente integral da membrana, ligação de proteínas desdobradas, ligação de proteína envolvida na dobragem de proteínas.
PDC4G142	---	Dobragem de proteínas, lúmen do retículo sarcoplásmico, ligação de proteína desdobrada, ligação de proteína envolvida na dobragem de proteínas.

Previsão de efeitos funcionais de mutações de sequência

Pela análise da sequência Me-CRT no servidor SNAP2, foi observado que os domínios funcionais PD001866 e PD134703 são as regiões da proteína mais sensíveis a mutações. Este servidor exibe de forma gráfica o impacto funcional de uma possível mutação em determinado aminoácido da sequência proteica. Os efeitos da substituição são representados em uma escala de intensidade que varia de Neutro (cor azul), a baixo efeito ou inconclusivo (cor branca), até alto efeito (cor vermelha). Na Figura 5, estão destacados dois aminoácidos em que qualquer substituição causaria alto impacto funcional na proteína.

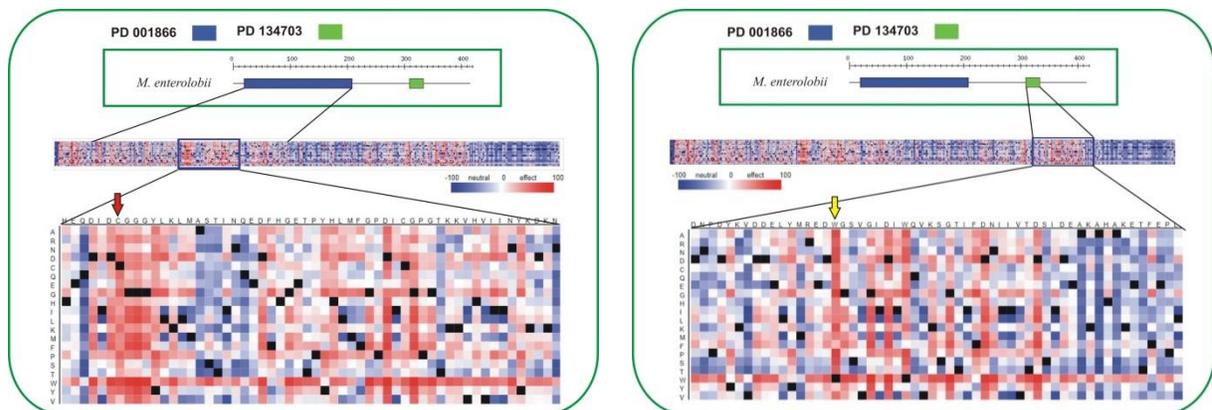


Figura 5. Previsão dos efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor (SNAP2). Seta em vermelho indica a posição do aminoácido cisteína (C), seta em amarelo indica a posição do aminoácido triptofano (W).

Análise de agrupamento

Para analisar as relações filogenéticas das espécies relacionadas com base na CRT, foi construído um cladograma a partir do alinhamento múltiplo das 15 sequências de CRT de nematoides. O cladograma foi construído segundo o método *Neighbor Joining* (NJ) com 1000 replicatas (bootstrap).

O agrupamento encontrado no cladograma foi consistente com a classificação taxonômica dos nematoides, ficando as espécies de uma mesma ordem agrupadas no mesmo clado. A Figura 6 ilustra o cladograma, onde os genótipos estão separados por ordem e também marcados de acordo com seu modo de vida. Os nematoides fitoparasitas da ordem Tylenchida formaram um grande clado junto com os nematoides da ordem Rhabditida, que compreende tanto nematoides de vida livre quanto parasitas de animais. Os dois nematoides do grupo Spirurida, ambos parasitas de animais, formaram um grupo externo, sendo geneticamente bem distintos dos outros grupos.

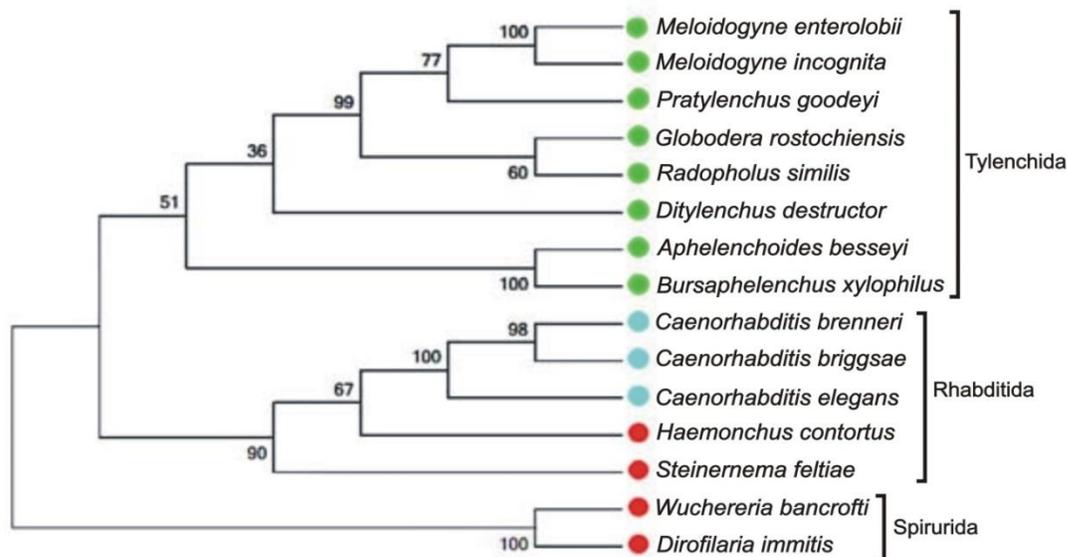


Figura 6. Agrupamento encontrado no cladograma das espécies relacionadas com base na Calreticulina (CRT). Nematoides fitoparasitas são indicados por círculos verdes, nematoides de vida livre por círculos azuis e parasitas de animais por círculos vermelhos.

Predição de estrutura terciária

O conhecimento da estrutura 3D de proteínas é de grande importância para o entendimento de suas funções. Devido a não existência de um modelo tridimensional da CRT de fitonematóides, foi necessária a utilização da metodologia de modelagem por homologia. Este método prevê a estrutura tridimensional de uma proteína usando como modelo sequências similares que já tenham sua estrutura elucidada. A Figura 7 ilustra o modelo gerado para a CRT da espécie *M. enterolobii*. Duas estruturas 3D foram selecionadas como molde para a geração do modelo da Me-CRT, para a maximização da porcentagem de identidade e cobertura do alinhamento. Os modelos selecionados foram C1jhnA e c3rg0A, que são referentes às estruturas tridimensionais de uma calnexina de *Canis lupus* e uma calreticulina de *Mus musculus*. O modelo final proposto para a Me-CRT consistiu em uma proteína composta por 14% de alfa hélices, 25% de beta folhas e 33% de regiões desordenadas, que não assumem uma estrutura bem definida e

que possa ser predita por modelos computacionais. As regiões coloridas no modelo são correspondentes aos domínios funcionais PD001866 e PD134703.

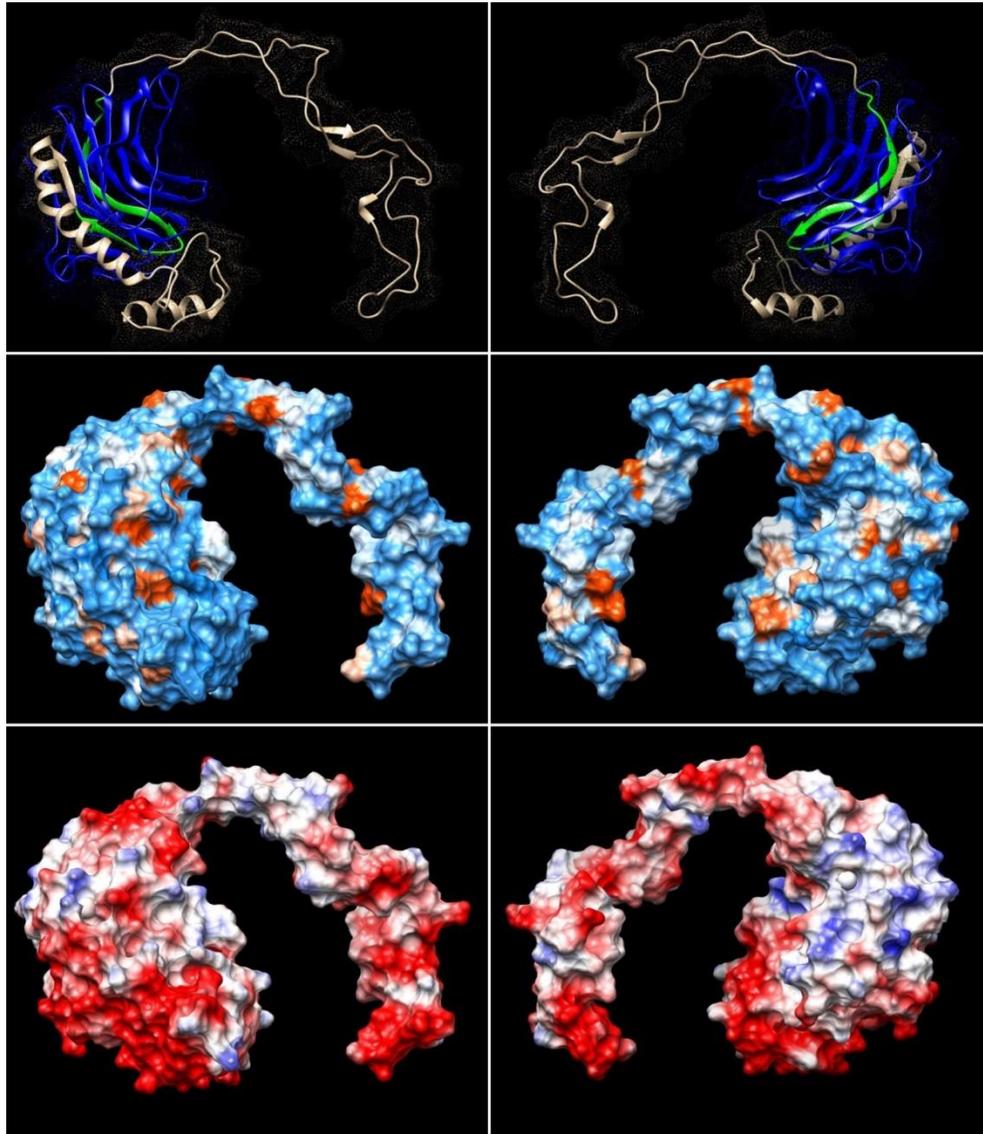


Figura 7. Estrutura tridimensional predita pelo servidor Phyre2 para a Calreticulina (CRT) da espécie *Meloidogyne enterolobii*.

Validação do modelo

A verificação da qualidade estereoquímica dos modelos que utilizaram a análise do plano Ramachandran foi realizada pelo servidor Molprobdity. A ProSA-web (Rede de Análise de Estrutura de Proteínas) foi utilizada para o reconhecimento de erros na previsão da estrutura terciária dos modelos. O Z-score foi usado para medir a energia, pois indica qualidade geral do modelo. Valores positivos de Z-score refletem uma estrutura não estabilizada, enquanto zero e negativos representam estruturas ideais. O modelo inicial apresentou 87,98% de resíduos de aminoácidos nas regiões favorecidas por análise do gráfico de Ramachandran e Z-score de -4,76. Devido à presença de *outliers* no gráfico de Ramachandran, o refinamento do modelo foi

realizado com o software KiNG (Chen et al., 2009) e pelo servidor Yasara Force Field. Após o refinamento, o modelo final exibiu 93.61% de aminoácidos nas regiões favorecidas na análise do gráfico de Ramachandran e Z-score de -5,19 (Figura 8).

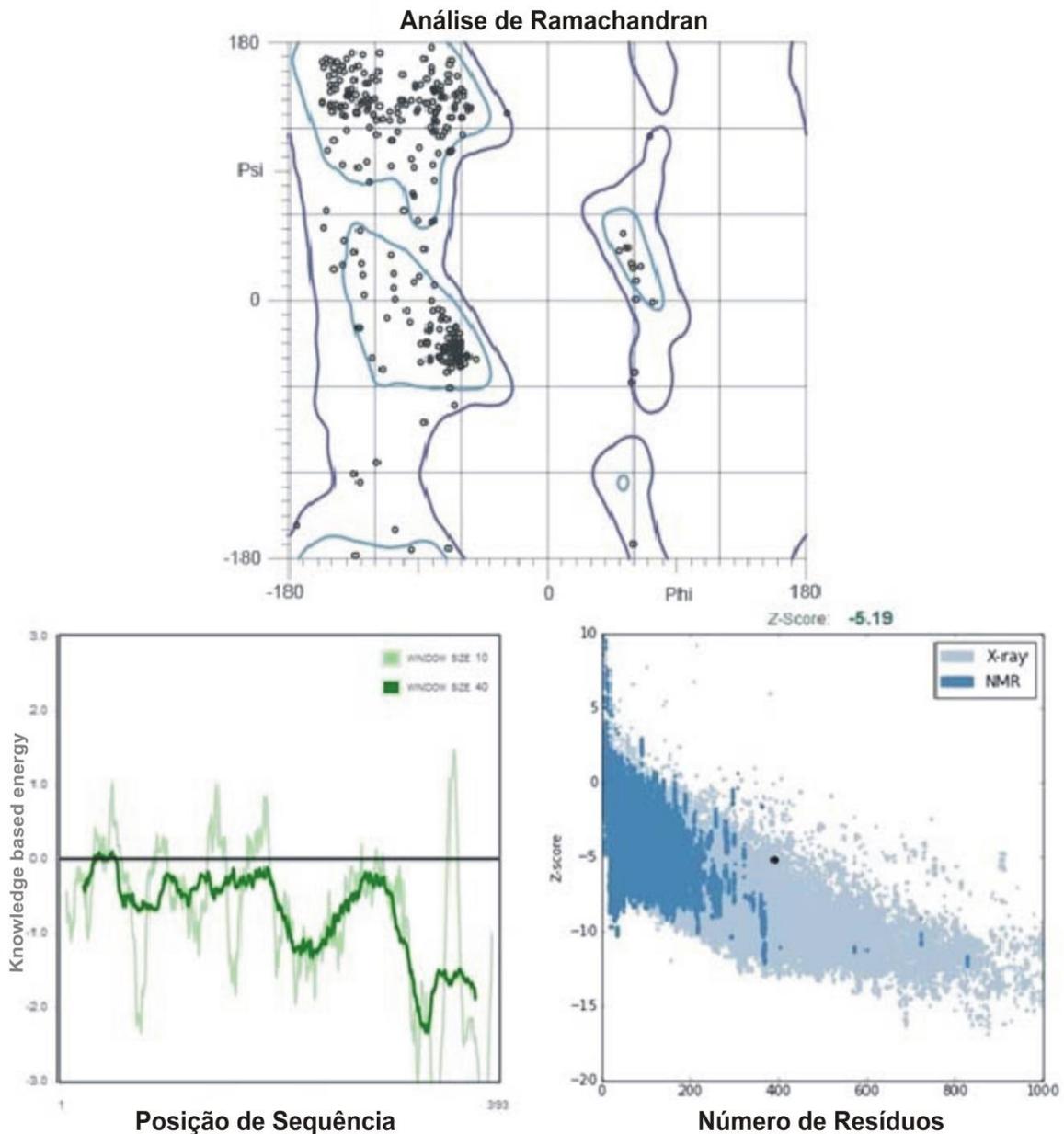


Figura 8. Validação do modelo Me-CRT.

DISCUSSÃO

A CRT em *M. enterolobii* e nas demais espécies avaliadas apresentaram alta similaridade em suas sequências de aminoácidos. Foi identificada a presença de peptídeo sinal com sequências de 21 a 23 aminoácidos em todas as CRTs. Tal fato evidencia que a CRT é uma proteína de

excreção com síntese intracelular, pois o peptídeo sinal tem função de marcar as proteínas que serão exportadas para outros locais a fim de desempenhar sua função biológica.

Após os primeiros estudos sobre o isolamento e funções da calreticulina, que a estabeleceram como uma proteína de ligação ao cálcio (Maclennan et al., 1972, Ostwald e Maclennan, 1974), vários estudos identificaram um papel multifuncional desta entre animais e plantas (Cabezón et al., 2008). Desde então, tem sido relatada em secreções de nematoides fitopagênicos e não fitopatogênicos, (Jaubert et al., 2002, Holaska et al., 2002; Suchitra e Joshi, 2005; Jaouannet et al., 2012; Li et al., 2015). A CRT tem papel importante no fitoparasitismo de nematoides, pois as larvas no estágio juvenil (J2), injetam um conjunto de proteínas e enzimas, dentre elas a CRT, em células de raiz do hospedeiro e provocam diversas respostas em nível celular (Jaubert et al., 2002; Bellafiore et al., 2008; Jaouannet et al., 2012), como a indução de células gigantes para a formação de locais de alimentação para o parasita (Jones e Payne 1978; Wiggers et al., 1990; Ding et al., 1998). O entendimento das funções da CRT neste processo é de grande importância para estudos sobre a interação nematoide-hospedeiro.

As sequências de aminoácidos HDEL (Histidina, Ácido aspártico, Ácido glutâmico e Leucina, respectivamente) encontrada na CRT, na posição C-terminal, indica a retenção da CRT no lúmen do retículo endoplasmático (Michalak et al., 1992). Investigações das estruturas e funcionalidade da CRT revelaram propriedades físico-químicas semelhantes entre as espécies, apresentaram similaridades no nível de aminoácidos, resultando na formação de três grupos filogenéticos em nossa análise.

A análise de agrupamento mostrou que as ordens Tylenchida, Rhabditida e a ordem Spirurida continham CRTs ácidas, a presença de resíduos ácidos na região C-Terminal é um indicativo da capacidade da CRT de armazenamento de cálcio no retículo endoplasmático (Baksh e Michalak, 1991). Os valores negativos de GRAVY encontrados indicam que as proteínas CRTs avaliadas são de caráter hidrofílico. Para todas as sequências, observou-se valores ácidos de pI. O ponto isoelétrico, ou pI, representa o pH em que uma proteína apresenta uma carga total neutra. Um pH abaixo do seu pI, a proteína se torna positivamente carregada, e em um pH acima de seu pI, se torna negativamente carregada. Desta forma o conhecimento do pI de uma proteína é importante pois ele indica o ponto em que a proteína é menos solúvel e dessa forma, instável (Shaw et al., 2001). Os domínios encontrados apresentaram características funcionais na CRT relacionadas à ligação com proteínas não dobradas e íons de cálcio os quais ajudam no dobramento proteico. Tais enovelamentos proporcionam a proteína um estado nativo mais estável com menor perda de energia, sendo o enovelamento influenciado pelos valores de hidrofobicidade dos aminoácidos (Leopold et al., 1992; Oliveira et al., 2006). SNAP2 revelou os domínios PD001866 e PD134703 com motivos conservados de cisteínas e triptofano, respectivamente, mutações de alto efeito nestes aminoácidos acarretaram alto impacto funcional na proteína.

A modelagem de estruturas 3D das proteínas é de suma importância para o seu entendimento funcional, a partir de técnicas e métodos de modelagem por homologia, é possível obter uma visão tridimensional da estrutura terciária resultante do enovelamento da cadeia polipeptídica, destacando-se assim a importância dos métodos computacionais que compararam a estrutura das sequências de aminoácidos de proteínas conhecidas para prever, *in silico*, uma estrutura tridimensional de outra proteína, como no caso a proteína CRT. Observa-se quanto maior o estado de homologia entre as proteínas selecionadas, melhor será o resultado e menor quantidade de resíduos modelados por metodologia *ab initio*.

A análise computacional das sequências da proteína CRT para nematoides revelou alta conservação da proteína entre estes organismos e a presença de dois principais domínios

funcionais, relacionados com suas funções de ligação a proteínas não dobradas e a íons de cálcio. As variações na sequência de aminoácidos entre as espécies analisadas ocorreram principalmente fora destes domínios funcionais, revelando sua importância para o funcionamento da CRT. Neste trabalho, apresentamos o primeiro modelo tridimensional de uma calreticulina para o nematoide *M. enterolobii*. A modelagem 3D da CRT de fitonematóides proporcionará informações valiosas no entendimento da função destas moléculas e poderá também auxiliar no desenvolvimento de ferramentas para identificação específica de fitonematóides, usando como alvo os domínios PD001866 e PD134703 para o desenvolvimento de anticorpos específicos para estas regiões. Permitindo, assim, melhor compreensão desta proteína, tendo em vista que, a CRT são proteínas envolvidas na patogenicidade de nematoides.

CONCLUSÕES FINAIS

Parâmetros físico-químicos indicaram que a calreticulina tem baixa atividade em pH ácido, tendo melhor atuação em meio neutro ou alcalino, possuindo afinidade em meio aquoso, sendo de caráter hidrofílico.

As CRTs analisadas são de localização subcelular da região do retículo endoplasmático, apresentaram cinco domínios funcionais conservados, multifuncionais que desempenham, entre outras, função no auxílio do dobramento das proteínas.

O Modelo 3D da calreticulina da espécie *M. enterolobii* apresentou estabilidade quanto ao nível energético, possibilitando compreensão das estruturas terciárias e estudos para combater o parasitismo dos nematoides.

A sequência da proteína CRT das espécies, apresentaram conservação filogenética entre nematoides de vida livre, parasitas de animais e de planta.

REFERÊNCIAS

- Baksh S e Michalak M (1991). Expression of Calreticulinin *Escherichia coli* and Identification of Its Ca²⁺ Binding Domains. *J. Biol. Chemistry*. 266: 21458-21465.
- Bellafiore S, Shen Z, Rosso MN, Abad P, Shih P and Briggs SP (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog*, 4:e1000192.
- Bird MD (2004). Signaling between nematodes and plants. *Curr. Opin. Plant Biol* . 7: 372-376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.005>
- Blok VC, Wishart J, Fargette M, Berthier K and Phillips MS (2002). Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology*. 4: 773-781.
- Blok VC, Jones JT, Phillips MS and Trudgill DL (2008). Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays*, 30: 249-259.

- Brito J, Powers TO, Mullin PG, Inserra RN and Dickson DW (2004). Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. *J. Nematol.* 36: 232-240.
- Brito JA, Stanley JD, Kaur R, Cetintas R, Di Vito M, Thies JA and Dickson DW (2007). Effects of the Mi-1, N and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *J. Nematol.* 39: 327-332.
- Cabezón C, Cabrera G, Paredesa R, Ferreira A and Galanti N (2008). *Echinococcus granulosus* calreticulin: molecular characterization and hydatid cyst localization. *Mol Immunol.* 45: 1431-1438 PMID. 17936905.
- Carneiro RMDG, Moreira WA, Almeida MRA and Gomes ACMM (2001). Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira.* 25: 223-228.
- Carneiro RMDG, Almeida MRA, Braga RS, Almeida CA and Gioria R (2006). Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira.* 30: 81-86.
- Chen VB, Davis IW and Richardson DC (2009). KING (Kinemage, Next Generation): a versatile interactive molecular and scientific visualization program. *Protein Sci.* 18: 2403-2409. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.250>
- Chen VB, Arendall WB, 3rd, Headd JJ, Keedy DA, et al. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66: 12-21. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Christensen A, Svensson K, Thelin L, Zhang W, et al. (2010). Higher plant calreticulins have acquired specialized functions in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 5:e11342. <http://doi:10.1371/journal.pone.0011342>.
- Darabi M e Seddigh S (2015). Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants. *Plant Systematics and Evolution.* 301: 2399-2417.
- Ding X, Shields J, Allen R and Hussey RS (1998). A secretory cellulose-binding protein cDNA cloned from the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal.* 11: 952-959.
- EPPO Global Database (2008) An emerging root-knot nematode, *Meloidogyne enterolobii*: addition to the EPPO Alert List. *EPPO Reporting Service.* 5: 9-10.
- Eves-Van Den Akker S, Laetsch DR, Thorpe P, Lilley CJ, et al. (2016). The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitismo and virulense. *Genome Biol.* 17: 124.
- Feng BZ, Li PQ, Fu L and Yu XM (2015a). Exploring laccase genes from plant pathogen genomes: a bioinformatic approach. *Genetics and Molecular Research.* 14: 14019-4036.

- Feng H, Wei L, Chen H and Zhou Y (2015b). Calreticulin is required for responding to stress, foraging, and fertility in the white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Exp. Parasitol.* 155: 58-67.
- Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramirez G, Schwaeble W and Ferreira A (2004). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol. Immunol.* 4: 1279-1291.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, et al. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: The proteomics protocols handbook (Walker JM, ed.). Humana Press, New York, 571-607.
- Han Y, Zheng QS, Wei YP, Chen J, et al. (2015). *In silico* identification and analysis of phytoene synthase genes in plants. *Genet. Mol. Res.* 14: 9412-9422. <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.
- Hecht M, Bromberg Y and Rost B (2015). Better prediction of functional effects for sequence variant. *BMC Genomics.* 16: S1.
- Holaska JM, Black BE, Rastinejad F and Paschal BM (2002). Ca(2+)-dependent nuclear export mediated by calreticulin. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6286-6297.
- Jaouannet M, Perfus-Barbeoch L, Deleury E, Magliano M, Engler G, Vieira P, Danchin EGJ, Da Rocha M, Coquillard P, Abad P and Rosso MN (2012). A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist.* 194: 924-931.
- Jaubert S, Ledger TN, Laffaire JB, Piotte C, Abad P and Rosso MN (2002). Direct identification of stylet secreted proteins from rootknot nematodes by a proteomic approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121: 205-211.
- Jones MGK e Payne HL (1978) Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *J. Nematol.* 10: 70-84.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN and Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols.* 10: 845-858.
- Kepekci I e Öztürk G (2002). Plant Parasitic Nematodes of Tylenchida (Nematoda) Associated with Groundnut (*Arachis hypogaea*) Fields in the Mediterranean Region of Turkey. *Phytoparasitica.* 30: 288-289.
- Kiewnick S, Dessimoz M and Franck L (2009). Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *J. Nematol.* 41: 134-139.
- Krieger E, Joo K, Lee J, Raman S, et al. (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. *Proteins.* 77:114-122. doi:10.1002/prot.22570.
- Leopold PE, Montal ME and Onuchic JN (1992) Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8721-8725.

- Li X, Zhuo K, Luo M, Sun L and Liao J (2011) Molecular cloning and characterization of a calreticulin cDNA from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Exp. Parasitol.* 128: 121-126.
- Li Y, Wang K, Xie H, Wang Y, Wang D, Xu C, et al. (2015). A Nematode Calreticulin, Rs-CRT, Is a Key Effector in Reproduction and Pathogenicity of *Radopholus similis*. *PLoS ONE*. 10: 6.
- Long H e Sun Y (2015). *Meloidogyne enterolobii*. *Inst. Plant Protec., Chinese Acad. Agricul. Sciences*. Submissão direta.
- MacLennan DH, Yip CC, Iles GH and Seeman P (1972). Isolation of Sarcoplasmic Reticulum Proteins. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* 37: 469-477.
- Michalak M, Milner RE, Burns K and Opas M (1992). Calreiculin. *Biochen J.* 285: 681-692.
- Moraes Filho R e Martins LSS (2016). *In silico* comparative analysis of tylenchid nematodes pectate lyases. *Genetics and Molecular Research*. gmr.15038402.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information Web Service. Availabre at [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>].
- Oliveira LC, Silva RTH, Leite VBP and Chahine J (2006). Frustration and Hydrophobicity Interplay in Protein Folding and Protein Evolution. *J.Chemical Physics.* 125: 8.
- Ostwald TJ e MacLennan DH (1974). Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chemistry*, 249: 974-979.
- Peng DL, Sun JH and Wang GF (2009). Cloning and function analysis of a new calreticulin gene (RS-crt-1) from *Radopholus similis*. *Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences*. Submissão direta.
- Perry RN e Moens NN (2011). Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. In: *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (Jones J, Gheysen G and Fenoll C, eds.). Springer Science + Business Media, Dordrecht, 3-20.
- Pestana M, Abrantes I and Gouveia M (2013). Effect of chemical stress imposed by *Solanum nigrum* in calreticulin and beta-1,4-endoglucanase genes and in infectivity of *Pratylenchus goodeyi*. Submissão direta.
- Petersen TN, Brunal S, Hijne GV and Nielsen H (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods.* 8: 785-786.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, et al. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25: 1605-1612. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, Gouzy J, et al. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. *Briefings in Bioinformatics.* 3: 246-251.

- Shaw KL, Grimsley GR, Yakovlev GI, Makarov AA, et al. (2001) The effect of net charge on the solubility, activity, and stability of ribonuclease Sa. *Protein Science*. 10: 1206-1215.
- Suchitra S e Joshi P (2005). Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *BBA Gen. Subjects*. 1722: 293-303, PMID.15716049.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Vatansever R, Filiz E and Ozyigit II (2016). *In silico* identification and comparative analysis of molybdenum (Mo) transporter genes in plants. *Braz. J. of Bot*. 39: 87-99. doi 10.1007/s40415-015-0217-z
- Wang GF, Sun JH, Peng DL (2009). Cloning, characterization and functional analysis of a new calreticulin gene (Dd-CRT-1) from *Ditylenchus destructor*. *Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences*. Submissão direta.
- Wiederstein M e Sippl MJ (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*. 35: W407-W410. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm290>
- Wiggers RJ, Starr JL and Price HJ (1990). DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*. 80: 1391-1395.
- Yachdav G, Klopman E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, et al. (2014). Predict Protein – an open resource of online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Research*. 42: 337- 343.
- Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, Huang SW, Hwang JK and Lu CH (2014). CELLO2GO: A Web Server for Protein subCELLular LOcalization Prediction with Functional Gene Ontology Annotation. *PLOS ONE*. 9: e99368.

ANEXOS

Normas seguidas na elaboração dos três capítulos da Dissertação.

Normas do Capítulo I



Universidade Federal Rural de Pernambuco
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Programa de Pós-Graduação em Agronomia
 “Melhoramento Genético de Plantas”



Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) para redação de dissertação e tese.

1. Normas Gerais

1.1. Dissertação constitui o produto final de pesquisas desenvolvidas em cursos de Mestrado e a Tese constitui o produto final de pesquisas desenvolvidas em cursos de Doutorado. Exigem investigações próprias à área de especialização e métodos específicos.

1.2. A Dissertação ou Tese é de responsabilidade do discente, da Comissão Orientadora e da Banca Examinadora.

2. Estrutura

2.1. A Dissertação ou Tese deverá ser composta de: (i) capa, (ii) páginas pré-textuais, (iii) corpo propriamente dito e, (iv) anexo (páginas pós-textuais).

2.2. A capa deverá conter a autoria, título, local e ano da aprovação. As capas encadernadas em mais de um volume deverão conter as mesmas informações acrescidas da identificação do respectivo volume. Dois (2) exemplares devem ser de capas duras de cor preta e letras amarelas.

2.3. As páginas pré-textuais serão compostas:

2.3.1. Primeira folha interna (página de rosto), contendo; (i) autoria, (ii) título; (iii) nota explicativa de que se trata de um trabalho de Dissertação ou Tese, mencionando o Programa de Pós-Graduação, a Universidade e o grau pretendido (Mestrado ou Doutorado); (iv) comitê de orientação e (v) local e ano de aprovação. Contará, no verso desta folha, a ficha catalográfica.

2.3.2. Segunda folha interna deve conter, o título, o nome do pós-graduando(a), a data de aprovação, os nomes e as assinaturas do orientador e dos participantes da Banca Examinadora, local e data.

2.3.3. Opcionalmente, poderão ser incluídas páginas adicionais contendo: (i) agradecimento (ii) oferecimento, (iii) dedicatória e (iv) biografia do autor, obrigatoriamente, deve conter (v) lista de símbolos, figuras, tabelas e sumário.

2.3.4. Folha (s) em que conste (m) o resumo em português, palavras-chave, o abstract em inglês e key words. O resumo com no máximo 800 palavras deve destacar: o local da pesquisa, delineamento estatístico, caracterização do problema, focalizar o(s) objetivo(s), síntese da metodologia, resultados obtidos e conclusões.

2.4. O corpo da Dissertação ou Tese conterá todo o trabalho impresso, avaliado e aprovado pela Banca Examinadora. O corpo poderá ser organizado na forma de capítulos.

2.5. O corpo em capítulos será composto das seções:

Capítulo I: Introdução e Referencial Teórico; Capítulos (um ou mais a depender do número de artigos científicos); e Considerações Finais (opcional). As referências bibliográficas e citações seguirão as normas da *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. As referências bibliográficas deverão aparecer ao final de cada capítulo.

2.6. O anexo (páginas pós-textuais) conterá material pertinente e suplementar.

2.7. Inserir cabeçalho com citação do autor e nome da dissertação ou tese, sendo a fonte tipo arial e tamanho 10, a partir do Capítulo I até a página inicial da folha anexo(s).

3. Editoração

3.1. Composição tipográfica. As dissertações ou teses deverão ser impressas em forma permanente e legível, com caracteres de alta definição e de cor preta no tipo Arial tamanho 12, com espaçamento 1,5.

3.2. Notação científica e medidas. A nomenclatura científica deverá ser diferenciada contextualmente, de acordo com as normas internacionais. As unidades métricas deverão seguir o padrão do Sistema Internacional de Unidades.

3.3. Papel. Utilizar papel A-4 (210 x 297 mm) branco, e suficientemente opaco para leitura normal.

3.4. Margens. A margem esquerda deve ser de 3 cm e as outras margens de 2 cm.

3.5. Paginação. Todas as páginas textuais e pós-textuais deverão ser numeradas em sequência contínua, isto é, desde a página do Capítulo I (texto corrido), até a última página, em algarismos arábicos. A sequência deverá incluir tudo que estiver como mapas, diagramas, páginas em branco e outros. As páginas pré-textuais deverão ser numeradas, sequencialmente, como algarismos romanos minúsculos.

3.6. Ilustrações. Fotografias e outras ilustrações deverão ser montadas de forma definitiva e incluídas no corpo da Dissertação ou Tese. É admitido o uso de cores nas figuras e ilustrações. Em nenhuma circunstância dever-se-á empregar fita adesiva ou material similar para afixação de ilustrações no corpo da Dissertação ou Tese. Folhas de tamanho superior a A4 serão aceitáveis, desde que dobradas, de forma a resultar em dimensões inferiores ao tamanho do papel adotado.

As referências bibliográficas e as citações da dissertação (capítulo I) seguirão o padrão da revista *Crop Breeding and Applied Biotechnology*.



References cited in the text by the last name of the author and the year (for instance, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) are to be alphabetically listed in the item **References**, according to the following examples:

Article in journals

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in

popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 1**: 3-10.

Book

Hallauer AR, Carena MJ and Miranda Filho JB (2010) **Quantitative genetics in maize breeding**. Springer, New York, 664p.

Book chapter

Morais PPP and Borem A (2017) GM cultivars. In Silva FL, Borem A, Sediyaama T and Ludke WH (eds) **Soybean breeding**. Springer, New York, p. 174-189.

Congress

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In Stalker HT and Murphy JP (eds) **Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

Normas do Capítulo II

As referências bibliográficas e as citações da dissertação (capítulo II) seguirão o padrão da Revista Nematrópica.

Composição tipográfica: Fonte tipo Times new Roman tamanho 12, com espaçamento 1,5.

Nematropica					
HOME	ABOUT	LOGIN	SEARCH	CURRENT	ARCHIVES
FLORIDA ONLINE JOURNALS HOME					
.....					
Home > Nematropica					

LITERATURE CITED

Barker, K. R., J. F. Townshend, G. W. Bird, I. J. Thomason, and D. W. Dickson. 1986.

Determining nematode population responses to control agents. Pp. 283-296 *in* K. D.

Hickey, 19 ed. *Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens*. St.

Paul, MN: The American Phytopathological Society Press.

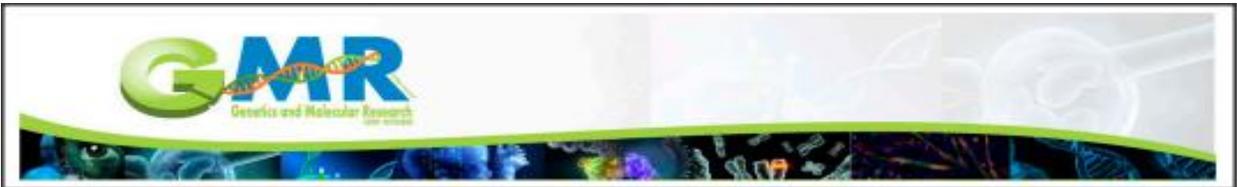
Davis, R. F., P. Bertrand, J. D. Gay, R. E. Baird, G. B. Padgett, E. A. Brown, F. F. Hendrix,

- and J. A. Baldson. 1996. Guide for Interpreting Nematode Assay Results. University of Georgia, Cooperative Extension Service Circ. 834, Athens, GA.
- Jaffee, B. A. 2002. Soil cages for studying how organic amendments affect nematode-trapping fungi. *Applied Soil Ecology* 21: 1-9.
- Koenig, S. R., C. Overstreet, J. W. Noling, P. A. Donald, J. O. Becker, and B. A. Fortnum. 1999. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. Supplement to the *Journal of Nematology* 31: 587-618.
- Orion, D., and G. Kritzman. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue de Nématologie* 14: 481-483.

Normas do Capítulo III

As referências bibliográficas e as citações da dissertação (capítulo III) seguirão o padrão da Revista GMR (Genetics and Molecular Research).

Composição tipográfica: Fonte tipo Times new Roman tamanho 12, com espaçamento simples.



JOURNAL (Standard article). Ex.:

Chao EC and Lipkin SM (2006). Molecular models for the tissue specificity of DNA mismatch repair-deficient carcinogenesis. *Nucleic Acids Res.* 34: 840-852.

Ranke MB, Lindberg A, Ferrandez Longas A, Darendeliler F, et al. (2007). Major determinants of height development in Turner syndrome (TS) patients treated with GH: analysis of 987 patients from KIGS. *Pediatr. Res.* 61: 105-110.

BOOK, WHOLE: authors, year, book title, edition or volume number, publisher, city. **Ex.:**

Bartholomei-Santos ML and Sokal RR (1973). Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

Cicotti and Tildesley DJ (1987). Computer simulation of liquids. 1st edn. Oxford University Press, New York.

BOOK CHAPTER: authors, year, book title, chapter title, editors, edition, publisher, city, pages of citation. **Ex.:**

Drosopoulou E (1981). The Drosophilidae: A Taxonomic Overview. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (Ashburner M, Carson HL and Thompson JN Jr, eds.). Academic Press, New York, 1-97.

REPORT. Ex.:

CIAT (International Center for Tropical Agriculture) (1980). Annual Report. CIAT, Cali. FAO (Food and Agricultural Organization) (2004). Production Yearbook. FAO, Rome.

THESIS. Ex.:

Hellmann K and Gömori G (1997). Estudo citoquímico em glândulas salivares de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Master's thesis, UNESP, São José do Rio Preto.

Pepin L (2003). Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa* doméstica na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada). Doctoral thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto.

CONFERENCE, SYMPOSIUM PROCEEDINGS: cite papers only from published proceedings. **Ex.:**

Lehninger AL, Silva MB, Lombardi F, Zamaro PJA, et al. (2002). Análise do comportamento eletroforético das frações de hemoglobinas de *Rhinoclemys punctularia* (Chelonia) em diferentes pH. In: Anais do 48º Congresso Nacional de Genética, Ribeirão Preto.

Olsen GJ, Ludwig T, Meier H and Wolf MJ (2002). AxML: a fast program for sequential and parallel phylogenetic tree calculations based on the maximum likelihood method. Proceedings of 1st IEEE Computer Society Bioinformatics Conference (CSB2002), Palo Alto, 21-28.

Pacheco EB and Miyazawa CS (2002). Estudos citogenéticos em Cheirodontinae (Characiformes, Characidae) do pantanal do Mato Grosso. In: IX Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, Maringá, 38.

Schaeffer LR, Swalve HH and Dekkers JCM (1994). Random regressions in animal models for test-day production in dairy cattle. Proceedings of the 5th World Congress of Genetic and Applied Livestock Production, Guelph, 433-446.

ELECTRONIC CITATIONS (Online Journals): ensure that URLs are active and available. **Ex.:**

Rozen S and Skaletsky HJ (2000). Primer3: Bioinformatics Methods and Protocols. In: Methods in Molecular Biology (Krawetz S and Misener S, eds.). Humana Press, New Jersey, 365-386. Available at [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi].