

DIFERENÇAS METABÓLICAS ENTRE GENÓTIPOS DE *Coffea arabica* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS A *Meloidogyne paranaensis*¹

Paula Soares Alves²; Bárbara Joana dos Reis Fatobene³; Alan Rodrigues Teixeira Machado⁴; Flaminia Rosa Campos Ferreira⁵; Sônia Maria de Lima Salgado⁶; Vicente Paulo Campos⁷; Jorge Teodoro Souza⁸; Denilson Ferreira Oliveira⁹.

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café; CAPES, CNPq e FAPEMIG

² Doutoranda CNPq/ Universidade Federal de Lavras, Dep. de Fitopatologia, Lavras-MG, paulaalvesagn.pa@gmail.com

³ Bolsista INCT/CNPq, DSc, EPAMIG / Lavras-MG, barbhara.fatobene@gmail.com

⁴ Professor/ Centro Universitário de Belo Horizonte-MG, alanvisconde@gmail.com

⁵ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, EPAMIG / Lavras-MG, flaminia campos@gmail.com

⁶ Pesquisadora, PhD. EPAMIG/Lavras-MG, soniamaria@epamig.br.

⁷ Professor/ Universidade Federal de Lavras, Dep. de Fitopatologia, Lavras-MG, vpcampos@dfp.ufla.br

⁸ Professor/ Universidade Federal de Lavras, Dep. de Fitopatologia, Lavras-MG, jorgesouza@dfp.ufla.br

⁹ Professor/ Universidade Federal de Lavras, Dep. de Química, Lavras-MG, denilson@dqi.ufla.br

RESUMO: É crescente a importância dos nematoides como fatores limitantes à cafeicultura. Tendo em vista a dificuldade do manejo da cultura em áreas infestadas, os programas de melhoramento têm focado na seleção de genótipos resistentes. O presente trabalho teve como objetivo identificar metabólitos por meio de análises por ressonância magnética nuclear (RMN), relacionados à resistência do genótipo 16-6-I de *C. arabica*, derivado do germoplasma Amphillo, à *Meloidogyne paranaensis*. Dentre as substâncias identificadas, destacou-se a trigonelina, cuja concentração teve aumento significativo aos 14 dias após o início do experimento (DAI), em plantas suscetíveis. No mesmo período de tempo também foram observadas diferenças discretas nas concentrações de cafeína, ácido clorogênico, α -glicose e β -glicose, entre as plantas resistentes e as suscetíveis, nas quais as concentrações desses metabólitos foram maiores até os 22 DAI. Maiores concentrações de sacarose foram observadas a partir dos 2 DAI em plantas resistentes, possivelmente bloqueando a ação de citocinas, indispensáveis para a formação e manutenção dos sítios de alimentação.

PALAVRAS-CHAVE: nematoides das galhas, metabolômica, arábica.

METABOLITE DIFFERENCES BETWEEN RESISTANT AND SUSCEPTIBLE *Coffea arabica* GENOTYPES TO *Meloidogyne paranaensis*¹

ABSTRACT: Given the difficulty of coffee growing in areas infested by plant-parasitic nematodes, breeding programs have focused on the selection of *Coffea arabica* genotypes resistant to *Meloidogyne* spp. To contribute to such programs, the present work aimed to identify metabolites by nuclear magnetic resonance (NMR) analysis, related to the resistance of the *C. arabica* genotype 16-6-I, derived from the Amphillo germplasm, to *Meloidogyne paranaensis*. Among the identified substances, trigonellin stood out because its concentration at 14 days after inoculation (DAI) was higher in susceptible plants. In the same period of time, slight differences were also observed in caffeine, chlorogenic acid, α -glucose, and β -glucose concentrations, between resistant and susceptible plants, in which concentrations were slightly higher until 22 DAI. Higher sucrose concentrations were observed from 2 DAI in resistant plants, possibly blocking the action of cytokines that are indispensable for the formation and maintenance of feeding sites.

KEY-WORDS: root-knot nematodes, metabolomics, Arabica.

INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são os principais nematoides que parasitam a cultura do cafeeiro no mundo (Campos & Villain, 2005). Dentre as dezoito espécies descritas até o momento como patogênicas ao cafeeiro (Carneiro & Cofcewicz, 2008; Humphreys-Pereira et al., 2014), *Meloidogyne paranaensis* se destaca como uma das mais importantes, pois destrói o sistema radicular das plantas, causando danos intensos. Em solos muito infestados por este nematoide, a cafeicultura pode ser totalmente inviabilizada. Além disto, esta espécie possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nos principais países produtores de café, como Brasil (Ferraz, 2008), Guatemala, Havaí (Carneiro & Cofcewicz, 2008) e México (Lopez-Lima et al., 2015). Consequentemente, a crescente disseminação de *M. paranaensis* representa séria ameaça à produção de café na América Latina.

Embora já seja conhecida a resistência a este nematoide em *Coffea arabica* (Fatobene et al., 2017; Salgado et al. 2014; Boisseau et al., 2009; Anzueto et al., 2001), pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na resistência. Plantas resistentes suprimem a penetração, o desenvolvimento e a reprodução do nematoide. Alves et al. (2019) observaram que 14 dias após a inoculação de *M. parnaensis* em *C. arabica*, plantas resistentesR, derivadas do germoplasma Amphillo,

apresentavam sinais claros de impedimento do desenvolvimento dos sítios de alimentação do nematoides e, consequentemente, do desenvolvimento do nematoide. Dando continuidade a tal estudo, o presente trabalho teve como objetivo identificar metabólitos relacionados à resistência do genótipo 16-6-I de *C. arabica* a *M. paranaensis* por meio de análise de ressonância magnética nuclear (RMN).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e inoculação

Dois genótipos de *C. arabica* foram utilizados para este estudo. O genótipo 16-6-I, resistente à *M. paranaensis*®, e a cultivar Catuaí Vermelho IAC 144, como controle suscetível (S). A população de *M. paranaensis* foi multiplicada em cafeeiros suscetíveis de *C. arabica* cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Os ovos foram extraídos utilizando a metodologia de Boneti & Ferraz (1981), e colocados para eclodir em funil de Baermann. Os juvenis do segundo estágio (J2), recém-eclodidos, foram coletados diariamente e armazenados a 4°C por no máximo 4 dias. Mudanças da cultivar Catuaí Vermelho e do germoplasma Amphillo, crescidas em copos plásticos de 300 ml, foram inoculadas com 2500 J₂ de *M. paranaensis*. Folhas de três plantas de cada genótipo foram cuidadosamente retiradas para avaliação aos 0, 2, 4, 8, 14, 22, e 32 DAI (dias após a inoculação).

Preparo dos extratos

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Kim e colaboradores (2010). 50 mg das folhas liofilizadas e moídas foram submetidas à extração com uma combinação de 0,75 mL de solução tampão de KH₂PO₄ em D₂O (pH 6), contendo 0,01 % (m/v) do TSP-*d*₄ como referência interna e 0,75 mL de metanol-*d*₄. Após a combinação dos materiais vegetais com os solventes, as misturas resultantes foram agitadas por 1 minuto em vortex, colocadas em banho de ultrassom por 20 min e centrifugadas a 17.000 rpm. 800 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de RMN com diâmetro de 5 mm.

Análise por RMN de ¹H

Todos os extratos foram analisados por RMN de hidrogênio (¹H) utilizando uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI-“Broadband Inverse”) de 5 mm. Para realização dos experimentos foram usados os parâmetros descritos por Kim e colaboradores (2010) com algumas adaptações. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos a 300 K com janela espectral de 16 ppm, número de pontos 32k, com pré-saturação do sinal de HDO, 128 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2,6 s e 1,5 s, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgpg30. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa TopSpin 3.2 e, por fim, os espectros foram calibrados pelo sinal do TSP-*d*₄ em 0,00 ppm.

Análise multivariada

Para análise multivariada, os espectros de RMN de ¹H foram processados com o programa Amix® (Bruker) fez o alinhamento do sinal pelo método conhecido como “bins” ou “buckets”, através do qual o espectro foi dividido em pequenos intervalos de deslocamentos químicos (0,04 ppm). Em seguida, os espectros foram convertidos automaticamente para arquivos ASCII. A partir destes arquivos foi construída uma matriz com deslocamento químico versus intensidade. Em seguida, uma matriz de classe discreta (neste caso, 0 para o suscetível e 1 para o grupo resistente) foi inserida na matriz obtida com os dados dos espectros. A matriz resultante foi submetida a análise de projeções de estruturas latentes por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês Partial Least Squares) utilizando o software Pirouette 3.11 (Infometrix). Todos os dados foram centrados na média e as regiões de δ 4,8 a δ 4,9 e δ 3,28 a δ 3,40 foram excluídas da análise por causa do sinal residual de HDO e metanol não deuterado no grupo hidróxi, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os nove metabólitos identificados (alanina, treonina, ácido málico, colina, sacarose, α-glicose, ácido clorogênico, cafeína e trigonelina), seis foram quantificadas nos extratos foliares de plantas R e S (Fig. 1). A alteração mais significativa observada foi o aumento da concentração de trigonelina aos 14 DAI em plantas S. A trigonelina é associada a respostas de defesa de plantas a patógenos e tal resposta é associada a hipometilação do DNA (Kraska & Schönbeck 1993). A concentração de trigonelina nas plantas R aos 0 e 2 DAI indica que é possível que a resposta de resistência seja constitutiva nessas plantas. O aumento da concentração de trigonelina aos 14 DAI nas plantas S pode ser uma resposta tardia de tentativa de cessar o desenvolvimento dos nematoides, ou que nas plantas S os nematoides consigam retardar essa resposta de defesa.

Aos 14 DAI, diferenças discretas também foram observadas na concentração de cafeína, ácido clorogênico, α-glicose, β-glicose entre plantas R e S, sendo as concentrações desses metabólitos maiores nas plantas S. Em geral, tais diferenças foram mantidas até os 22 DAI.

Maiores concentrações de sacarose foram observadas a partir dos 2 DAI em plantas R. Machado et al. (2012) também observaram maiores concentrações de sacarose em caféeiros resistentes a *M. exigua*. O aumento de concentração da sacarose possivelmente atua bloqueando a ação de citocinas (Ikeda et al. 1999), as quais são secretadas por *Meloidogyne* spp. para induzir a formação e manutenção dos sítios de alimentação (Lohar et al. 2004). A partir dos 8 DAI a concentração de sacarose foi maior nas plantas R, indicando a ativação de uma via de defesa nessas plantas, ou a repressão das respostas nas plantas S pelos nematoides.

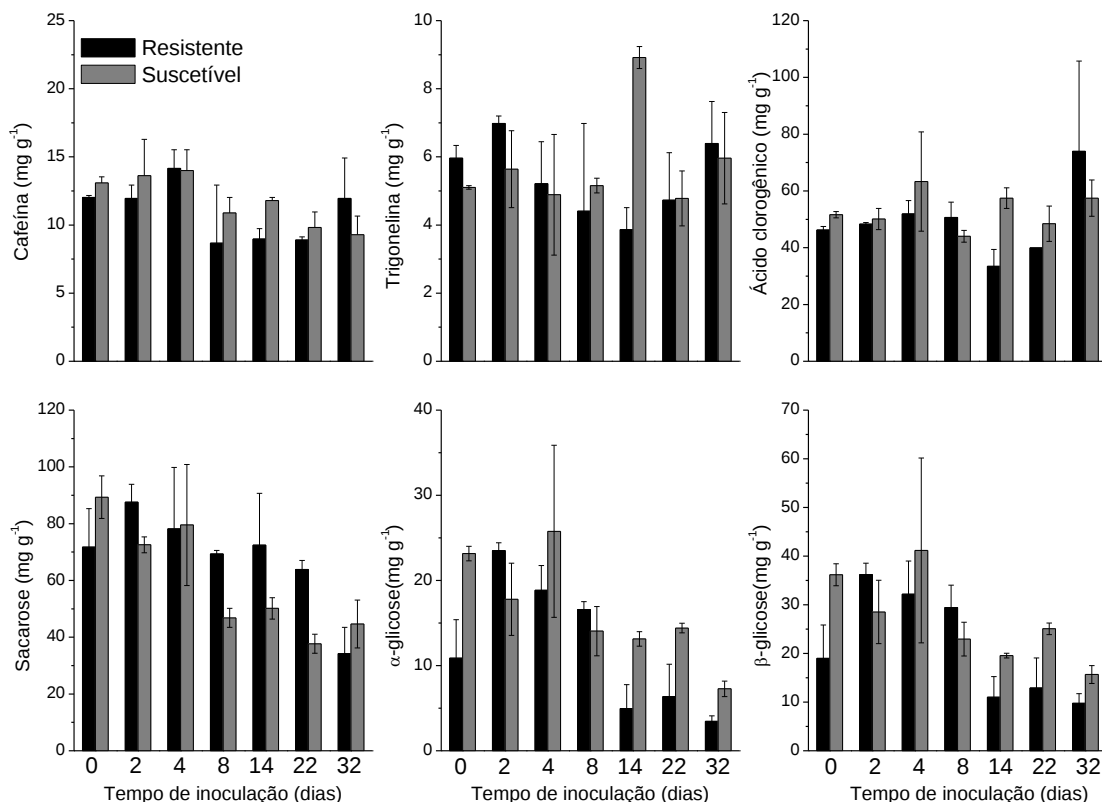


Figura 1. Concentrações de metabólitos identificados e quantificados por análise de RMN em extratos de folhas de plantas resistentes e suscetíveis inoculadas com *Meloidogyne paranaensis*.

CONCLUSÕES

1. Considerando as concentrações de trigonelina e sacarose, observamos que as plantas suscetíveis apresentam resposta de resistência tardia aos nematoides e que nas plantas resistentes parece ocorrer impedimento do estabelecimento e formação do sítio de alimentação a partir dos 8 DAI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, P.S.; FATOBENE, B.J.R.; SALGADO, S.M.L.; GOMES, A.C.M.M.; CAMPO, V.P.; CARNEIRO, R.M.D.G.; SOUZA, J.T. (2019). Early and late responses characterise the resistance derived from Ethiopian wild germplasm 'Amphillo' of *Coffea arabica* to *Meloidogyne paranaensis*. *Nematology*. 1-12.
- ANZUETO, F.; BERTRAND, B.; SARAH, J.L.; ESKES, A.B.; DECASY, B. Resistance to *Meloidogyne incognita* in Ethiopian *Coffea arabica* accessions. *Euphytica*, v.118, p.1-8, 2001.
- BOISSEAU, M.; ARIBI, J.; SOUSA, F.R.; CARNEIRO, R.M.D.G.; ANTHONY, F. Resistance to *Meloidogyne paranaensis* in wild *Coffea arabica*. *Tropical Plant Pathology*, v.34, n.1, p.38-41, 2009.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de caféiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.553, 1981.
- CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC M.; SIKORA R. A.; BRIDGE J. (Eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford: CAB International, 2005. p.529-579.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; COFCEWICZ, E.T. Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: SOUZA, R.M. (Ed). Plant-Parasitic Nematodes of Coffee. 1 ed. USA: APS Press & Springer, 2008, v. 1, p. 87-122.
- FATOBENE, B.J.R., ANDRADE, V.T., ALOISE, G.S., SILVAROLLA, M.B., GONÇALVES, W. & GUERREIRO FILHO, O. (2017). Wild *Coffea arabica* resistant to *Meloidogyne paranaensis* and genetic parameters for resistance. *Euphytica* 213, 196.

- FERRAZ, L.C.C.B. (2008). Plant parasitic nematodes of coffee in Brazil. In: SOUZA, R.M. (Ed.). Plant parasitic nematodes of coffee. Berlin, Germany, Springer, pp. 225-248.
- HUMPHREYS-PEREIRA D, FLORES-CHAVES L, GÓMEZ M, SALAZAR L, GÓMEZALPÍZAR L, ELLING AA (2014) *Meloidogyne lopezi* n. Sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with coffee (*Coffea arabica* L.) in Costa Rica, its diagnosis and phylogenetic relationship with other coffee-parasitising *Meloidogyne* species. *Nematology* 16:643–661
- IKEDA, Y., KOIZUMI, N., KUSANO, T., & SANO, H. (1999). Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from Wheat. *Plant Physiology*, 121, 813–820
- KRASKA, THORSTEN & SCHÖNBECK, F. (2008). About Changes in the Chromatin Structure after Resistance Induction in *Hordeum vulgare* L.. *Journal of Phytopathology*. 137.
- KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols* volume 5, pages 536–549 (2010).
- LOHAR, D. P., SCHAFF, J. E., LASHEY, J. G., KIEBER, J. J., BILYEU, K. D., & BIRD, D. M. (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *The Plant Journal*, 38, 203–214.
- LOPEZ-LIMA D., SÁNCHEZ-NAVA P., CARRION G., MONTEROS A.E. AND VILLAIN L. (2015). Corky-root symptoms for coffee in central Veracruz are linked to the root-knot nematode *Meloidogyne paranaensis*, a new report for Mexico. *European Journal Plant Pathology* 141, 623–629.
- SALGADO, S.M.L., REZENDE, J.C.D. & NUNES, J.A.R. (2014). Selection of coffee progenies for resistance to nematode *Meloidogyne paranaensis* in infested area. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14, 94-101.