

I. FISILOGIA DE PLANTAS

FENÓIS, PEROXIDASE E POLIFENOLOXIDASE NA RESISTÊNCIA DO CAFEIRO A *MELOIDOGYNE INCOGNITA* (1)

PAULO MAZZAFERA (2), WALLACE GONÇALVES (3)
e JOSÉ AFONSO RIGHETTI FERNANDES (4)

RESUMO

Plântulas dos cultivares Mundo Novo, de *Coffea arabica*, suscetível, e Apoatã, de *Coffea canephora*, resistente, foram inoculadas com ovos de *Meloidogyne incognita* raça 2, e avaliadas em duas fases do ciclo de desenvolvimento do parasito, isto é, na de penetração de larvas e na de fêmeas com ovos. Não foram observadas diferenças quanto ao desenvolvimento radicular e da parte aérea entre plântulas inoculadas e não inoculadas, nas duas avaliações. Nos dois cultivares, houve aumento no teor de fenóis nas plântulas inoculadas na primeira avaliação, e, na segunda, apesar de os valores terem sido maiores, foram iguais entre plântulas inoculadas e seus respectivos controles. O 'Mundo Novo' apresentou sempre maior conteúdo de fenóis que o 'Apoatã' e somente houve aumento na sua atividade de peroxidase na primeira avaliação. Na segunda, a atividade dessa enzima foi maior do que na primeira, porém igual entre plântulas inoculadas e seus controles. O 'Apoatã' sempre teve maior atividade de peroxidase, e apenas houve aumento da atividade de sua polifenoloxidase na primeira avaliação, sendo que nesse cultivar a atividade dessa enzima sempre foi maior do que no 'Mundo Novo'. Cromatografias em camada delgada de celulose mostraram que em nenhum deles houve variações quantitativas de fenóis entre as plantas inoculadas e não inoculadas. Ambos, 'Mundo Novo' e 'Apoatã', apresentaram 23 compostos fenólicos em comum e, nove e onze não comuns respectivamente.

Termos de indexação: café, nematóides, fenóis, enzimas.

(1) Recebido para publicação em 29 de maio e aceito em 1º de agosto de 1989.

(2) Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Unicamp, CP 6109, 13093 Campinas (SP).

(3) Seção de Genética, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), CP 28, 13001 Campinas (SP).

(4) Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI).

1. INTRODUÇÃO

Entre as espécies de nematóides formadores de galhas que atacam o cafeeiro, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919; Chitwood, 1949) vem causando os maiores danos. A notável capacidade de destruir o sistema radicular, a alta persistência no solo e o assinalamento de raças fazem desse nematóide um fator limitante da produção, inviabilizando a cafeicultura nas áreas em que ocorre.

Recentemente, visando evitar perdas causadas por esse nematóide na cultura do cafeeiro, foi desenvolvido o cultivar Apoatã de *Coffea canephora* Pierre, a ser utilizado, a longo prazo, como fonte de resistência a ser transferida para cultivares de *Coffea arabica* L. e, a curto prazo, como porta-enxerto de cultivares dessa mesma espécie (FAZUOLI et al., 1987).

Em cafeeiro, pouco se conhece sobre os mecanismos que governam a resistência a nematóides e, em particular, a *M. incognita*. Para outras culturas, nas quais estudos dessa natureza já foram realizados, os compostos fenólicos têm sido freqüentemente associados com a resistência a esse parasito e, em alguns casos, a comparação entre cultivares resistentes e suscetíveis tem demonstrado que o nível desses compostos é maior nos primeiros, mesmo antes da inoculação das plantas com o parasito (DROPKIN, 1969; GIEBEL, 1982; HUANG, 1985).

A polifenoloxidase e a peroxidase, enzimas envolvidas na via metabólica dos fenóis, são geralmente associadas à resistência de plantas a doenças (MAYER & HAREL, 1979; BUTT, 1980; BUTT & LAMB, 1980). Entretanto, a peroxidase tem merecido maior atenção por parte dos especialistas em nematologia, havendo controvérsia sobre o seu papel efetivo no processo da resistência (HUANG, 1985).

Este trabalho apresenta dados obtidos sobre o teor de fenóis livres, peroxidase e polifenoloxidase em plântulas do cultivar Mundo Novo, de *C. arabica*, suscetível, e de Apoatã, de *C. canephora*, resistente a *M. incognita*, quando inoculadas ou não com esse nematóide.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal, condições de crescimento e inoculação

Plântulas com 40 a 50 dias de idade obtidas a partir de sementes dos cultivares Mundo Novo CP515, de *C. arabica*, suscetível a *M. incognita*, e Apoatã, de *C. canephora*, resistente, foram transplantadas individualmente para vasos plásticos de 500ml, contendo areia lavada como substrato, em casa de vegetação da Seção de Genética. As plântulas foram regadas duas vezes por semana com solução completa de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950). Com quatro meses, quando possuíam um a dois pares de folhas verdadeiras expandidas, procedeu-se à inoculação com a raça 2 de *M. incognita*, identificada através do teste

de hospedeiros diferenciais (*Nicotiana tabacum* NV95 e *Gossypium hirsutum* cv. Deltapine 16) proposto por TAYLOR & SASSER (1978). Para o preparo do inóculo, utilizou-se o método de TAYLOR & SASSER (1978), exceto pelo uso de hipoclorito de sódio, recebendo cada vaso 4ml de uma suspensão aquosa contendo cerca de 2.200 ovos e larvas de *M. incognita*.

2.2. Épocas de coleta

Determinaram-se as épocas para a coleta do material inoculado e seus respectivos controles, plântulas não inoculadas, segundo o cálculo dos graus-dias acumulados desde a data de inoculação. Para a obtenção desses dados, monitorou-se a temperatura do substrato dos vasos e do ar, através de um registrador contínuo. A primeira coleta foi feita ao redor de 230 graus-dias, período suficiente para que um alto número de larvas penetrasse o sistema radicular das plântulas de café. A segunda coleta foi realizada aos 1.270 graus-dias unidades de calor, suficientes para que o parasito tivesse completado o seu ciclo de desenvolvimento em cafeeiro suscetível (JAEHN, 1989).

2.3. Altura de plântulas e peso seco de raízes e parte aérea

Na época das coletas, mediu-se a altura de oito plântulas inoculadas e oito não inoculadas de cada cultivar e, após a retirada do substrato das raízes com água corrente, as plantas foram seccionadas na altura do colo, sendo as raízes e a parte aérea postas para secar a 70°C até atingir peso constante.

2.4. Teor de fenóis livres

Retirado o substrato das raízes com água corrente, as radículas foram separadas da raiz principal e acondicionadas em pequenos sacos plásticos, imersas em nitrogênio líquido. Em laboratório, o material foi liofilizado e mantido em freezer, a -25°C, até uso posterior. Nessa etapa, as radículas foram coletadas de oito plântulas inoculadas e oito não inoculadas de cada cultivar.

Para a extração dos fenóis livres, as radículas permaneceram imersas por uma semana em etanol absoluto (HARBORNE, 1973). Do extrato filtrado, tomaram-se as alíquotas para a dosagem de fenóis, segundo o método de SWAIN & HILLIS (1959). Para cálculo da reta padrão, empregou-se ácido salicílico.

2.5. Extração e dosagem de enzimas

O número de plântulas e o procedimento para a coleta das radículas foram aqueles os mesmos da dosagem de fenóis. A obtenção do extrato enzimá-

tico para dosagem da atividade de peroxidase e polifenoloxidase seguiu o método proposto por OLIVEIRA (1972) e DRAETTA & LIMA (1976). As radículas foram maceradas em almofariz na presença de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0 e polivinilpirrolidona. O extrato bruto obtido foi centrifugado a 38.000(xg) por trinta minutos e, do sobrenadante, retiraram-se as alíquotas para as dosagens das enzimas. Todos os passos foram realizados a 4°C.

Para peroxidase, o meio de reação continha 0,25ml do extrato enzimático, 0,5ml de H_2O_2 0,25% e 1,5ml de pirogalol 0,01M, ambos em tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,0. Após o volume ser completado a 3,25ml com tampão, a mistura da reação foi incubada a 25°C por 30 minutos e, a reação, interrompida pela adição de 0,5ml de H_2SO_4 5%. Como branco, substituiu-se o extrato por tampão, sendo as leituras de absorvância feitas em 420nm (OLIVEIRA, 1972; DRAETTA & LIMA, 1976; KAR & MISHRA, 1976).

Para polifenoloxidase, o meio de reação continha 0,25ml de extrato enzimático, 1,5ml de pirogalol 0,01M e 0,5ml de glicina 0,2M, ambos em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. A incubação foi feita a 30°C por trinta minutos, a reação interrompida pela adição de 0,5ml de H_2SO_4 5% e as leituras de absorvância em 420nm. Como branco, substituiu-se o extrato por tampão (OLIVEIRA, 1972; DRAETTA & LIMA, 1976; KAR & MISHRA, 1976).

As atividades das enzimas foram expressas em unidades de enzima por peso de radículas, sendo a unidade definida como a quantidade de enzima necessária para causar a variação de uma unidade de absorvância por minuto (DRAETTA & LIMA, 1976).

2.6. Cromatografia em camada delgada

Os extratos etanólicos obtidos para a dosagem de fenóis livres foram reduzidos em volume em evaporador rotatório a 35°C, e placas cromatográficas de camada delgada de celulose, preparadas segundo GRIPPO et al. (1965), receberam aplicações de 100 a 200 μ l de extrato, dependendo da concentração de fenóis anteriormente determinada.

As placas foram desenvolvidas bidimensionalmente, realizando-se, na primeira direção, duas corridas, com secagem das placas entre si. Na primeira corrida, utilizou-se benzeno : ácido acético : água (6:7:3, v/v, fase superior) (IBRAHIM & TOWERS, 1960), e na segunda, butanol : ácido acético : água (4:1:5, v/v, fase superior). Na segunda direção, empregou-se como solvente ácido acético 2% (HARBORNE, 1973).

Os cromatogramas foram visualizados em ultravioleta (UV) longo e curto, com e sem presença de vapores de amônia, e revelados com $AlCl_3$ 1% em etanol 95%, com posterior observação em UV (SEIKEL, 1962, e RIBEREAU-GAYON, 1972), e com solução aquosa de $K_3[Fe(CN)_6]$ 1% e $FeCl_3$ 1% misturadas na proporção de 1:1 (BARTON et al., 1952).

2.7. Número de ootecas

Avaliou-se o número de ootecas em dezesseis plântulas de cada tratamento em que foi feita a inoculação com nematóide, e somente na segunda amostragem, pois nas plântulas da primeira ainda não teriam sido formadas tais estruturas.

Retirado o substrato em água corrente, as raízes foram imersas em solução de floxina B (150mg/l H₂O) por vinte minutos e lavadas em água corrente para retirada do excesso do corante; em seguida, as ootecas foram contadas com o auxílio de estereomicroscópio, segundo a escala de notas proposta por TAYLOR & SASSER (1978), na qual 0 representa ausência de ootecas e 5, mais de cem ootecas por sistema radicular.

A avaliação do número de ootecas foi realizada no laboratório de nematóides da Seção de Genética e as dosagens de fenóis e atividade enzimáticas, nos laboratórios do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadro 1 apresenta os dados referentes ao número de ootecas por sistema radicular, a altura e o peso seco do sistema radicular e da parte aérea das plântulas dos cultivares Mundo Novo e Apotã.

QUADRO 1. Altura, peso seco de raízes e parte aérea, e notas relativas ao número de ootecas no sistema radicular de plântulas dos cultivares Mundo Novo, de *Coffea arabica*, e Apotã, de *C. canephora*, inoculadas e não inoculadas com *Meloidogyne incognita*, em duas épocas de amostragem durante o ciclo de desenvolvimento do parasita

Cultivar	Primeira amostragem (1,2,3)			Segunda amostragem (1,2,3)			
	alt	psr	pspa	alt	psr	pspa	oot (4)
	cm	mg	mg	cm	mg	mg	
<i>Mundo Novo</i>							
Inoculado	6,23a	54,3ab	148,0ab	10,15ab	183,9a	531,1a	3,88a
Não inoculado	6,80a	86,5a	192,0a	11,36a	218,6a	561,9a	-
<i>Apotã</i>							
Inoculado	6,56a	19,3b	94,3b	8,24b	106,8b	361,4b	0,63b
Não inoculado	6,88a	34,8b	118,5b	9,78ab	121,1b	348,6b	-

(1) alt = altura; psr = peso seco das raízes; pspa = peso seco da parte aérea; oot = notas relativas ao número de ootecas (0-5).

(2) Letras diferentes indicam significância pelo teste de Duncan a 5%.

(3) Médias de oito repetições.

(4) Médias de dezesseis repetições; - fenômeno não ocorre.

Para as duas épocas de amostragem, não houve diferenciação estatística nítida para essas avaliações entre plântulas inoculadas e não inoculadas dos dois cultivares. Entretanto, observou-se sempre a tendência de as plântulas inoculadas apresentarem valores inferiores a seus controles, confirmando, de certa forma, dados obtidos por GONÇALVES (1989, dados não publicados) de que, mesmo no Apatã, há certa redução do desenvolvimento da plântula inoculada. Isso seria explicado por este cultivar, apesar do seu alto grau de resistência, não ser imune ao parasito, o que é comprovado pelas notas do número de ootecas no sistema radicular (Quadro 1).

No quadro 2 – dados de teor de fenóis livres e atividades enzimáticas – observa-se que, de modo geral, na primeira amostragem as plântulas inoculadas dos dois cultivares apresentaram maior teor de fenóis livres do que seus controles. Na segunda, esse teor foi igual entre plântulas inoculadas e não inoculadas de cada cultivar, porém maior para o 'Mundo Novo'. A princípio, seria possível afirmar que existiria uma reação das plântulas à penetração do parasito. Entretanto, tal manifestação, como ocorreu também no cultivar suscetível, poderia ser decorrente da lesão causada às células durante o processo.

QUADRO 2. Conteúdo de fenóis e atividade de peroxidase (per) e polifenoloxidase (pfo) em radículas de plântulas dos cultivares Mundo Novo, de *Coffea arabica*, e Apatã, de *C. canephora*, inoculadas e não inoculadas com *Meloidogyne incognita*, em duas épocas de amostragem durante o ciclo de desenvolvimento do parasito

Cultivar	Primeira amostragem (1,2,3)			Segunda amostragem (1,2,3)		
	fenóis	per	pfo	fenóis	per	pfo
	mg/g	— unid./g —		mg/g	— unid./g —	
<i>Mundo Novo</i>						
Inoculado	18,25a	23,04a	4,18bc	34,80a	19,53b	3,84b
Não inoculado	11,80bc	8,07b	3,07c	31,68a	19,45b	3,65b
<i>Apatã</i>						
Inoculado	16,14ab	22,90a	12,91a	10,53b	34,48a	8,00a
Não inoculado	9,07bc	17,84a	5,08b	15,42b	32,51a	11,87a

(1) Médias de oito repetições.

(2) Letras diferentes indicam significância pelo teste de Duncan a 5%.

(3) Valores em unidades de enzima por grama de matéria seca (unid./g). Uma unidade de peroxidase (per) ou de polifenoloxidase (pfo) representa a quantidade de enzima necessária para causar a variação de uma unidade de absorbância por minuto.

A diferença no teor de fenóis entre ambos os cultivares seria inerente ao fato de pertencerem a espécies diferentes, e o aumento relativo na segunda avaliação do 'Mundo Novo' poderia estar relacionado ao seu desenvolvimento, hipótese levantada por MAYER & HAREL (1979) para outras espécies vegetais.

Uma prova da atuação da peroxidase na resistência de plantas a doenças é o seu envolvimento na oxidação de fenóis, propiciando a formação de lignina, que, por sua vez, aumentaria a resistência física da parede celular, dificultando a penetração do patógeno (FRIEND & THORNTON, 1974; VANCE & SHERWOOD, 1977).

No quadro 2, comparando-se a atividade dessa enzima nos dois cultivares, nota-se que, na segunda amostragem, com exceção do 'Mundo Novo' inoculado, os valores são maiores do que os da primeira, o que poderia estar relacionado ao estágio de desenvolvimento das plântulas. À medida que elas cresceram, houve lignificação das raízes mais velhas.

A confrontação entre os dois cultivares indica que o 'Apoatã' apresentou, de modo geral, maior atividade de peroxidase. Entretanto, considerando-se que a época da primeira amostragem (230 graus-dias) corresponderia teoricamente a uma fase do ciclo do parasito onde há intensa penetração nas raízes (JAEHN, 1989) e que a lignina age como uma barreira física à penetração, tal comparação não permite concluir que esse polímero confere a resistência do Apoatã, pois, na primeira amostragem, suas plântulas inoculadas e as do 'Mundo Novo' apresentaram atividade semelhante de peroxidase.

Existem controvérsias quanto ao papel da peroxidase na resistência de plantas nematóides. ZACHEO et al. (1982) não encontraram diferenças entre as atividades de peroxidase de raízes sãs de cultivares resistente e suscetível de tomate: após a inoculação com *M. incognita*, houve aumento da enzima no cultivar resistente e declínio no suscetível. Por outro lado, GIEBEL et al. (1971) e GANGULY & DASGUPTA (1979) informaram que a atividade peroxidásica era geralmente maior em variedade resistente de tomate inoculada com *M. incognita* e de batata inoculada com *Heterodera rostochiensis* respectivamente.

Devido à sua natureza tóxica, muitos fenóis existem nas plantas na forma glicosilada, o que, além de atenuar-lhes a toxicidade, aumenta-lhes a solubilidade (KOSUGE, 1969). Sob a ação de glicosidases, tais compostos adquirem a forma livre, podendo expressar seu potencial tóxico.

Segundo GIEBEL (1982), os mecanismos das glicosidades e suas implicações não são simples de compreender. Por ação dessas enzimas, liberadas pelo patógeno ou presentes nas plantas, haveria aumento do teor de fenóis livres, que afetariam o sistema peroxidásico de destruição do ácido indolacético (AIA). Com isso, não haveria condições da formação de células gigantes das galhas. Em plantas resistentes, um sistema favoreceria a destruição desse hormônio vegetal, ocorrendo o contrário em plantas suscetíveis, ou, ainda, a presença de um sistema de proteção contra a destruição do AIA.

Para os dados aqui obtidos, tal modelo seria duvidoso, pois plântulas infectadas de 'Mundo Novo' apresentaram alta atividade na fase de penetração. Entretanto, é interessante notar que a razão entre a atividade de peroxidase e o teor de fenóis livres foi superior no 'Apoatã' nas duas fases de avaliação, sugerindo maior participação da enzima no processo de resistência.

A enzima polifenoloxidase catalisa duas reações distintas (MAYER & HAREL, 1979). Na primeira, há a transformação de monofenóis para 0-difenóis (atividade de cresolase) e, destes, para as respectivas 0-quinonas (atividade de catecolase). Segundo KOSUGE (1969), as quinonas podem ser relativamente tóxicas a patógenos, por serem altamente reativas com proteínas, levando à precipitação de enzimas hidrolíticas do patógeno. Por via de regra, a atividade de catecolase é significativamente superior à de cresolase.

Os dados de polifenoloxidase – Quadro 2 – mostram, assim como para peroxidase, que a atividade é maior para o 'Apoatã' e que o nível é semelhante nas duas fases de avaliação. No entanto, as plântulas inoculadas desse cultivar apresentaram maior atividade que o seu controle na fase de penetração.

A variedade de tomate Nematex, resistente a *M. incognita*, perde sua resistência a partir da temperatura de 32°C. Quando BRUESKEN & DROPKIN (1973) inocularam plantas desse cultivar nas temperaturas de 27 e 32°C, observaram que havia alta atividade de polifenoloxidase para a menor temperatura e baixa na maior, o que indica o envolvimento da enzima no processo de resistência. Provavelmente, o envolvimento de polifenoloxidase, tanto na resistência de plantas a doenças como a nematóides, estaria relacionada com a formação de quinonas.

As cromatografias realizadas com os extratos etanólicos de fenóis livres revelaram que não houve diferenças qualitativas desses compostos entre plântulas inoculadas e os controles do mesmo cultivar. Quando comparados os cromatogramas do 'Apoatã' e do 'Mundo Novo', foram identificadas 23 manchas em comum. O primeiro apresentou nove manchas não presentes no cromatograma do segundo, e este, 11 manchas não comuns àquele (Figura 1).

Entre as manchas não comuns do 'Mundo Novo', duas foram identificadas como fenóis simples e as restantes, como flavonóides. No 'Apoatã', todas as manchas não comuns eram flavonóides. Das comuns a ambos, oito foram identificadas como fenóis simples e o restante, como flavonóides.

Desde que os cromatogramas de plantas inoculadas e não inoculadas do 'Apoatã' não diferiram, conclui-se que, caso algum composto fenólico atue na sua resistência ao nematóide *M. incognita*, o mesmo classificaria esta resistência como do tipo constitutiva ou pré-formada, isto é, o composto responsável pela resistência estaria presente nas células das raízes antes da infecção pelo parasito (HUANG, 1985).

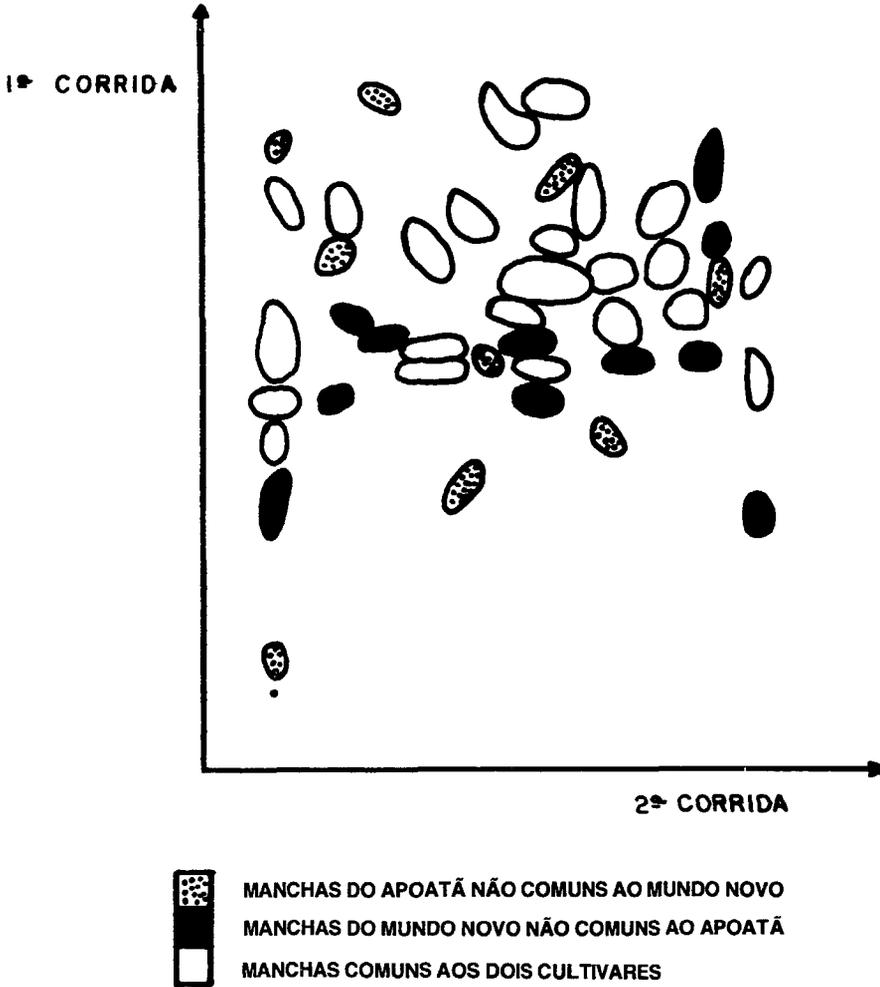


FIGURA 1. Representação dos cromatogramas dos extratos fenólicos de radicelas de plântulas dos cultivares Mundo Novo, de *Coffea arabica*, e Apoatã, de *C. canephora*, inoculadas e não inoculadas com *Meloidogyne incognita*

4. CONCLUSÕES

1. Quantitativamente, a resistência do 'Apoatã', de *C. arabica*, à raça 2 do nematóide *M. incognita*, não pode ser atribuída aos compostos fenólicos, pois, tanto nesse cultivar como suscetível, houve aumento desses compostos nas

raízes de plantas inoculadas da primeira avaliação. Acredita-se que tal aumento tenha sido decorrente de injúria nos tecidos no momento de penetração do parasito.

2. Para o 'Apoatã', apesar de a atividade da enzima peroxidase ter sido maior na segunda fase de avaliação do que na primeira, não se pode correlacioná-la com sua resistência ao parasito, já que não foram detectadas diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas nas duas fases.

3. Em ambas as fases de avaliação, o cultivar Apoatã apresentou atividade de polifenoxidase maior do que o Mundo Novo, tanto em plântulas inoculadas como não inoculadas. Esse aumento de atividade nas plântulas inoculadas do Apoatã, na primeira avaliação, indica a possibilidade de essa enzima estar envolvida no mecanismo de resistência a *M. incognita*.

SUMMARY

PHENOLS, PEROXIDASE AND POLYPHENOLOXIDASE IN THE RESISTANCE OF COFFEE TO *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Seedlings of two coffee cultivars were inoculated with the nematode *Meloidogyne incognita*: cv. Mundo Novo (susceptible) of *Coffea arabica* and cv. Apoatã (resistant) of *C. canephora*. During the larval penetration and adult female phases of the parasite, evaluations were made on phenol content, peroxidase and polyphenoxidase activities. In the two evaluations, no differences were observed in roots and shoots growth among inoculated and non inoculated seedling. For both cultivars, only in the first phase infected seedlings showed an increase in phenols as compared to their counterparts not inoculated. However, phenol values were higher in the second than in the first phase. The cv. Mundo Novo had always higher phenols content than Apoatã. Only inoculated seedlings of the cv. Mundo Novo showed an increase of peroxidase activities in the first phase; but, both cultivars presented higher peroxidase activities in the second phase as compared to the first. Apoatã seedlings had always higher peroxidase and polyphenoxidase activities than Mundo Novo. Infected seedlings of the cv. Apoatã showed in the first phase, only, an increase in polyphenoxidase activity. Thin-layer chromatograms of phenolic extracts did not present any difference among inoculated and non-inoculated seedlings. Twenty three spots on the chromatograms were common to both cultivars, except that Apoatã had a further nine spots not found in Mundo Novo and the later had a further eleven not found in the former.

Index terms: Coffee, nematodes, phenols, enzymes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTON, G.M.; EVANS, R.S. & GARNER, J.A.F. Paper chromatography of phenolic substance. *Nature*, **170**:249-250, 1952.
- BRUESKEN, C.H. & DROPKIN, V.H. Free phenols and root necrosis in Nematex tomato infected with the root-knot nematode. *Phytopathology*, **63**:329-334, 1973.
- BUTT, V.S. Direct oxidases and related enzymes. In: DAVES, D.D., ed. *The Biochemistry of plants: metabolism and respiration*. New York, Academic Press, 1980. v.2, p.81-123.
- & LAMB, C.J. Oxygenase and the metabolism of plant products. In: CONN, E.E., ed. *The Biochemistry of plants: secondary products*. New York, Academic Press, 1980. v.7, p.627-665.
- DRAETTA, I.S. & LIMA, D.C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **7**:13-28, 1976.
- DROPKIN, V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, **59**:1632-1637, 1969.
- FAZUOLI, L.C.; LIMA, M.M.A.; GONÇALVES, W. & COSTA, W.M. Melhoria do café visando resistência a nematóide. Utilização de porta-enxertos resistentes. In: CONGRESSO PAULISTA DE AGRONOMIA, 6., Piracicaba, 1987. *Anais*. p.171-180.
- FRIEND, J. & THORNTON, J.D. Caffeic-0-methyl transferase, phenolase and peroxidase in potato tubers tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische*, **81**:56-84, 1974.
- GANGULY, A.K. & DASGUPTA, D.R. Sequential development of peroxidase (EC 1.11.1.7) and IAA-oxidase activities in relation to resistance and susceptible responses in tomatoes to the root-knot nematode, *M. incognita*. *Indian Journal of Nematology*, **9**:143-151, 1979.
- GIEBEL, J. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Review Phytopathology*, **20**:257-279, 1982.
- ; KRENZ, J. & WILSKI, A. Localization of some enzymes in roots of susceptible and resistant potatoes infected with *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica*, **17**:29-33, 1971.
- GRIPPO, P.; IACCARINO, M.; ROSSI, M. & SCARANO, E. Thin-layer chromatography of nucleotides, nucleosides and nucleic acid bases. *Biochimica Biophysica Acta*, **95**:1-7, 1965.
- HARBORNE, J.B. *Phytochemical methods: a guide of plant analysis*. London, Chapman and Hall, 1973. 278p.
- HOAGLAND, D.K. & ARNON, D.I. *The water-culture methods for growing plants without soil*. Berkeley, Cal., Calif. Agric. Expt. Stn. Ext. Serv., 1950. 32p. (Circular, 347)
- HUANG, J.S. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. In: SASSER, J.N. & CARTER, C.C., eds. *Advanced Treatise on Meloidogyne: biology and control*. North Carolina State Univ. and Unit. St. Agency Int. Develop., 1985. v.1, p.143-153.
- IBRAHIM, R.K. & TOWERS, G.H.N. The identification, by chromatography, of plant phenolic acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **87**:125-128, 1960.

- JAHEN, A. *Efeito da temperatura na biologia de três raças de Meloidogyne incognita (Tylenchida - Meloidogyinidae) em cafeeiro (Coffea arabica L.) e estimativa do número de gerações para o Estado de São Paulo*. Piracicaba, ESALQ, USP, 1989. 101p. Tese (Doutorado).
- KAR, M. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, **57**:315-319, 1976.
- KOSUGE, T. The role of phenolics in-host response infection. *Annual Review Phytopathology*, **7**:195-222, 1969.
- MAYER, A.M. & HAREL, E. Polyphenoloxidases in plants. *Phytochemistry*, **18**:193-215, 1979.
- OLIVEIRA, J.C. *Relação da atividade enzimática de polifenoloxidase, peroxidase e catalase dos grãos de café e a qualidade de bebida*. Piracicaba, ESALQ, USP, 1972. 80p. Tese (Mestrado).
- RIBERÉAU-GAYON, P. *Plant phenolics*. Edimburg, Oliver and Boyd, 1972. 254p.
- SEIKEL, M.K. Chromatography methods of separation, isolation and identification of flavonoids compounds. In: GEISSMAN, T.A., ed. *Chemistry of flavonoid compounds*. New York, The Macmillan, 1962. p.34-69.
- SWAIN, T. & HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science and Food Agriculture*, **10**:63-68, 1959.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. *Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh, N.C., Coop. Publ. Dep. Plant Pathol., North Carolina State Univ. and U.S. Agency Int. Dev., 1978. 111p.
- VANCE, C.P. & SHERWOOD, R.T. Lignified papilla formation as a mechanism for protection in Reed Canarygrass. *Physiological Plant Pathology*, **10**:247-256, 1977.
- ZACHEO, G.; BLEVE-ZACHEO, T. & LAMBERT, F. Role of peroxidase and superoxide dismutase activity in resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea Bari*, **10**:75-80, 1982.