

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS À RESISTÊNCIA DO CLONE 14 DE *Coffea canephora* CONILON A *Meloidogyne paranaensis*

Edriana Araújo de Lima²; Fernanda de Araújo Carneiro³; Erica Cristina Silva Rêgo⁴; Tatiana Santos Costa⁵; Michelle Guitton Cotta⁶; Aldemiro Jorge Júnior⁷; Pierre Marraccini⁸; Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro⁹; Alan Carvalho Andrade¹⁰

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

² Bolsista Consórcio Pesquisa Café. Doutorado, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, edrianaal@gmail.com

³ Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, fearca14@gmail.com

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, Universidade Paulista, Brasília-DF, embrapa.ecsr@gmail.com

⁵ PhD. Biotecnologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, tatianaitase@gmail.com

⁶ Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, michellegcotta@gmail.com

⁷ Estudante, MS, Universidade de Brasília – UnB, Brasília-DF, aldemirojunior@gmail.com

⁸ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Brasília-DF, marraccini@cirad.fr

⁹ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, regina.carneiro@embrapa.br

¹⁰ Pesquisador, PhD, Embrapa Café, Brasília-DF, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: Os nematoides das galhas estão entre os patógenos mais nocivos para a agricultura cafeeira no Brasil e *C. canephora* tem se mostrado fonte de resistência a esses patógenos. Com o objetivo de identificar genes candidatos a resistência a *M. paranaensis*, dois clones de *Coffea canephora* Conilon previamente identificados como resistente (clone 14) e suscetível (clone 22), inoculados ou não em diferentes tempos com *M. paranaensis*, tiveram seus RNAs extraídos a partir das raízes, sequenciados, mapeados em genoma de referência de *C. canephora* e avaliados quantitativamente (expressão *in silico*) por meio de RNAseq e Excel. Dessa forma, foi possível identificar os genes que mais se expressaram no clone resistente em relação ao clone suscetível, e a respectiva expressão temporal foi relacionada à resistência a *M. paranaensis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea canephora*, genes candidatos *Meloidogyne*, RNAseq, resistência.

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND SELECTION OF CANDIDATE GENES TO *Meloidogyne paranaensis* RESISTANCE IN CLONE 14 OF *Coffea canephora* CONILON.

ABSTRACT: Root-knot nematodes are among the most harmful pathogens for coffee farming in Brazil and *C. canephora* has proven to be source of resistance to them. With the goal of finding candidate genes to resistance to *M. paranaensis*, two clones of *Coffea canephora* Conilon, previously identified as resistant (clone 14) and susceptible (clone 22), were inoculated or not at different times with *M. paranaensis*, then had their RNAs were extracted, sequenced, mapped using a reference genome of *C. canephora* and evaluated quantitatively (*in silico* expression) by RNAseq and Excel. Following this process, genes were obtained that were higher expressed in resistant clones than in susceptible ones, and their temporal expression was correlated to the resistance to *M. paranaensis*.

KEYWORDS: Candidates genes, *Coffea canephora*, *Meloidogyne*, RNAseq, resistance,

INTRODUÇÃO

Meloidogyne paranaensis é uma espécie de nematoide das galhas que vem dizimando lavouras de café em algumas regiões do Brasil (Carneiro et al., 1996). Apesar de não ser tão comum quanto *M. exigua*, sua importância para o cultivo do cafeeiro tem sido foco de preocupação devido ao aumento da sua disseminação e por causa das perdas provocadas por esse nematoide. *Meloidogyne paranaensis* provoca extensos danos radiculares que podem culminar com a morte da planta infectada. Plantas resistentes tem sido o método mais promissor para controlar as espécies de nematoides deste gênero (Carneiro et al., 1996; Roberts, 2002) e muitos são os estudos com o objetivo de identificar genótipos com essa característica. No entanto, ainda se tem muito para saber a respeito da interação nematoide das galhas-hospedeiro, sobre os aspectos fisiológicos do parasitismo e quais são os genes que podem estar envolvidos, direta ou indiretamente, na resistência. Lima et al. (2015), observaram diferenças histopatológicas entre os clones 14 e 22 de *C. canephora*, previamente identificados como resistente e suscetível a *M. paranaensis*. Entre essas diferenças, estão a presença de morte celular e reação de hipersensibilidade na raiz infectada do clone 14. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização do(s) possível(is) mecanismo(s) molecular(es) relacionado(s) à resistência a esse patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas (estacas) de cafeeiro *C. canephora* Conilon (clones 14 e 22) fornecidas pelo INCAPER foram cultivadas na casa de vegetação (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) durante o período de experimento. Com aproximadamente 30 cm de altura, essas plantas foram transferidas para vasos contendo areia e, após uma semana, foram inoculadas com 10.000 juvenis de *M. paranaensis*. Aos quatro, oito, 12, 20, 32 e 45 dias após a inoculação (DAI), três plantas inoculadas mais uma planta não inoculada (controle) de cada clone foram rapidamente retiradas dos vasos, a parte aérea descartada e as raízes congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C. O sistema radicular foi pulverizado para extração de RNA totais por meio de fenol com precipitação com cloreto de lítio. Os RNAs foram quantificados e foi feita a avaliação da qualidade por meio de Bioanalyzer e gel de agarose. Após tratamento com DNase, foi feita uma mistura equimolar dos RNAs para as três repetições biológicas por dia e por clone. Parte dessa mistura (3µg) foi enviada para sequenciamento através da plataforma Illumina. Os dados gerados foram organizados e analisados por meio de RNAseq e Excel, sendo o genoma de referência um duplo haplóide de *C. canephora* (Denoeud et al., 2014). Após as análises utilizando-se o software QSeq, foram obtidos os valores quantitativos de expressão para cada gene do transcriptoma de referência (25.574 genes) para cada uma das 24 bibliotecas analisadas (Tabela 1). Também com os dados obtidos por meio do QSeq, foram calculados, utilizando o Excel, os valores de QC, que correspondem ao quociente entre os valores de expressão para cada amostra, para cada DAI e para cada gene, nas condições controle (ex: $QC_{4DAI} = 14C_{4DAI} / 22C_{4DAI}$). Também foram calculados os valores de FI (Fator de Indução) para cada amostra, para cada DAI e para cada gene. (ex: $FI_{14DAI} = 14I_{4DAI} / 14C_{4DAI}$). E por fim, foram calculados os valores de Q para cada clone, para cada DAI e para cada gene ($Q = FI_{14} / FI_{22}$) para cada tempo de coleta (4, 8, 12, 20, 32 e 45 DAI), representando quantitativamente a diferença de expressão genica entre os clones 14 e 22, em resposta à infecção por nematoides. Os valores de QC, FI e Q foram plotados por cromossomo, conforme a localização dos genes no genoma de referência de *C. canephora*. Vale ressaltar que conforme descrito em Denoeud et al. (2014), o cromossomo 0 contém sequências que não puderam ser ligados ao mapa genético de *C. canephora* e portanto, a ordem dos genes não pode ser confirmada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do sequenciamento, 24 bibliotecas de raízes inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis* foram geradas em um total de 2.000.574.216 *reads* gerados. Quando analisamos os dados de QC ($QC = 14C/22C$), os genes que apresentaram expressão diferencial antes e depois da inoculação eram, em sua maioria, genes que codificam proteínas de resistência a patógenos com exceção dos *no hits*, que são genes de função desconhecida (Figura 1). A expressão desses genes aumentou na presença do patógeno, com exceção dos genes 10974001 e 37300001 (cc-nbs-lrr e no hit respectivamente) cuja expressão foi menor após infecção. No entanto, a expressão desses genes que expressaram antes da infecção foi menor do que dos genes que expressaram somente após o contato com o patógeno (FI e Q – Figura 2). Os genes que codificam proteínas de resistência, particularmente aquelas portadoras do domínio nbs-Lrr (nucleotide-binding site-leucine-rich repeat), genes que codificam cisteína proteases, genes envolvido na síntese de fenólicos como o cinamil álcool desidrogenase, o que codifica proteína “*Lignin-forming*”, além dos que atuam na síntese de quitinase e citocromo P450 foram os que obtiveram valor de expressão maior no clone resistente (14) que no suscetível (22). Parte desses genes se destacaram, também quanto a expressão, mais no clone 14 inoculado que em seu controle.

Tabela 1. Bibliotecas geradas e número total de *reads* produzidos por meio do sequenciamento por Illumina (HiSeq 2000) de raízes dos clones 14 e 22 de *C. canephora* inoculadas e não inoculadas com *M. paranaensis*. Não foi obtido o número de *reads* referente ao nematoide presente nas raízes infectadas.

Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads	Amostra	Número de Reads
22-C-4	43.505.229	22-I-8	43.928.311	22-C-20	38.236.209	22-I-32	39.883.430
	43.505.229		43.928.311		38.236.209		39.883.430
14-C-4	41.579.878	14-I-8	40.166.360	14-C-20	41.627.956	14-I-32	36.480.218
	41.579.878		40.166.360		41.627.956		36.480.218
22-I-4	52.983.526	22-C-12	32.334.626	22-I-20	46.349.288	22-C-45	39.859.919
	52.983.526		32.334.626		46.349.288		39.859.919
14-I-4	48.637.742	14-C-12	42.685.241	14-I-20	39.637.808	14-C-45	34.687.270
	48.637.742		42.685.241		39.637.808		34.687.270
22-C-8	42.305.791	22-I-12	43.303.216	22-C-32	42.032.227	22-I-45	49.815.585
	42.305.791		43.303.216		42.032.227		49.815.585
14-C-8	46.240.336	14-I-12	36.301.015	14-C-32	34.194.393	14-I-45	43.511.534
	46.240.336		36.301.015		34.194.393		43.511.534
TOTAL de <i>reads</i> : 2.000.574.216							

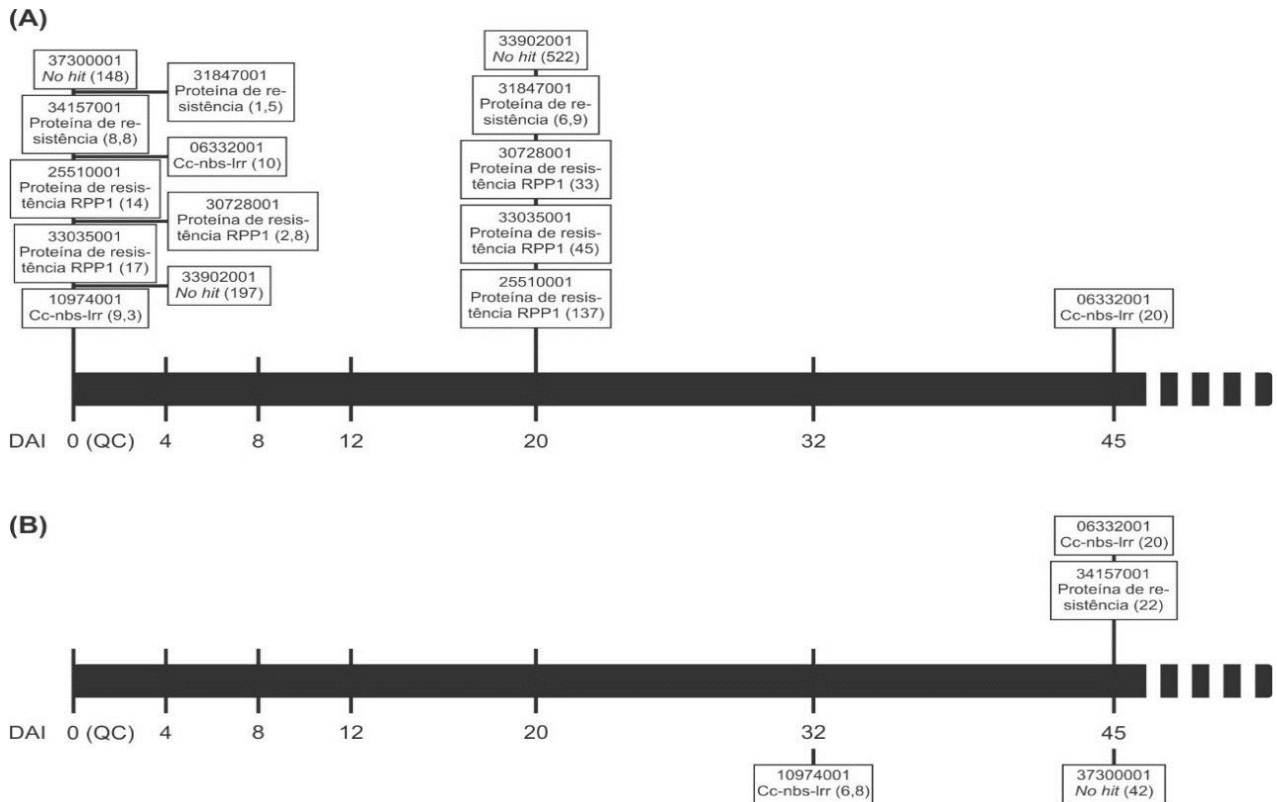


Figura 1. Genes de resistência que mais se destacaram antes (QC) e após a infecção por *M. paranaensis*, quanto ao Q (A) e o FI (B) em diferentes tempos. A escala de tempo em dias após a inoculação (DAI) e representada abaixo de cada gráfico. Os genes que estão acima da barra do gráfico tiveram sua expressão aumentada em relação ao tempo zero (QC) e o que se encontra abaixo da barra a expressão diminuiu. O número entre parênteses que acompanha cada gene representa o valor da expressão.

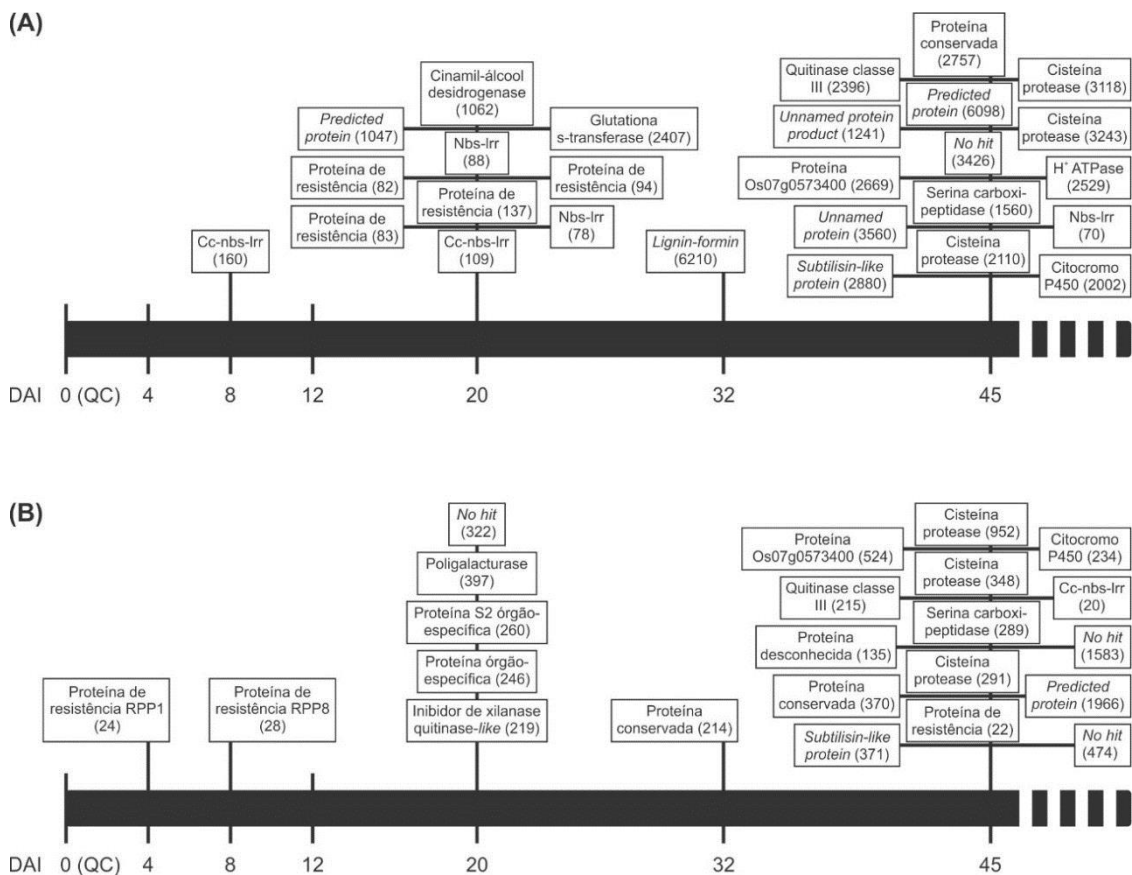


Figura 2. Proteínas putativas relacionadas aos genes que mais se destacaram quanto ao Q (A) e o FI (B), em diferentes tempos, após a infecção por *M. paranaensis*. O número entre parênteses que acompanha cada proteína putativa representa o valor da expressão do gene que a codifica.

Quando se observa a expressão desses genes através do tempo (DAI), percebe-se que parte dos genes que se destacaram mostrou maior diferença de expressão nos dias que corresponde ao final do ciclo de infecção. No entanto, na linha Q (FI14/FI22) há uma separação temporal entre os genes de resistência, que tiveram maior diferença de expressão na primeira metade dos dias avaliados, e os genes que atuam na contenção/eliminação do patógeno.

A diferença de expressão entre os clones foi maior do que dentro do mesmo clone. Essa observação (juntamente com os dados obtidos por meio de QC) sugerem a presença de uma resistência basal no clone 14 o que permitiria uma resposta mais rápida e efetiva de resistência. Então, o clone 14 pode ser mais eficiente do que o clone 22 na contenção de *Meloidogyne* devido à presença de moléculas relacionadas à defesa, como proteínas nbs-Lrr, antes do contato com o patógeno.

A maioria dos genes de resistência descritos em plantas contém o sítio de ligação de nucleotídeo NB e o domínio rico em repetições de Leucina LRR pertencendo, portanto, a uma grande família conhecida como NBS-LRR (Van der Biezen & Jones, 1998; Lukasik & Takken, 2009). Como exemplo desses genes de defesa contra nematoides, têm-se o gene *Mi* de tomateiro e que atua contra espécies de *Meloidogyne* (Hwang & Williamson, 2003) e o gene *Gro-1-4* de batata e que atua contra patótipo do nematoide *Globodera rostochiensis* (Paal et al., 2004).

As cisteína proteínases (CP) pertencem a um grande grupo de proteínas que estão envolvidas na morte celular programada, desenvolvimento de tecidos, eliminação de tecidos e órgãos da planta, resposta a patógenos e pragas, dentre outras funções (Greenberg, 1996; 1997; Pennell & Lamb, 1997; Chichkova et al., 2004; Lepelley et al., 2012). Estão incluídas nesse grupo de proteases as caspases, papaínas e catepsinas. As caspases são cisteínas dependentes de aspartato que são essenciais na morte celular programada. Ligninas são compostos fenólicos encontrados nas paredes secundárias do sistema vascular vegetal e que estão envolvidas nos mecanismos de defesa contra patógenos, tanto estruturais como bioquímicos (Barber & Mitchell, 1997) assim como o cinamil álcool desidrogenase também está envolvido lignificação e resposta à patógenos (Kiedrowski et al., 1992).

Os genes que atuam na produção de lignina & cisteína expressaram mais no clone resistente que no clone suscetível após os 20 DAI o que coincide com o colapso do sítio de alimentação, a reação de hipersensibilidade e a morte dos nematoides observados no clone 14 (Lima et al., 2015). Observando globalmente todos os genes que apresentaram perfis diferenciais de expressão, fica claro que há uma sobreposição temporal entre a expressão dos genes de resistência e os que codificam proteínas que atuam no processo de resistência. Então, o primeiro grupo de genes atuaria no reconhecimento do patógeno (proteínas de resistência) e o segundo grupo na contenção e eliminação do mesmo.

CONCLUSÕES

1. Genes de resistência com domínio rico em leucina (LRR), codificador de cisteína protease-proteínas envolvidas na síntese de lignina e outros fenólicos, além de genes (*no hits*) de função desconhecida dentre outros, tiveram expressão diferencial detectada em ensaio *in silico* e, por isso, são candidatos para futuros estudos que visam a validação dos mesmos por meio de qPCR.
2. O clone 14 apresentou um *background* para resistência a patógenos, com a expressão de genes codificando para proteínas de resistência antes da infecção. Este resultado pode sugerir que este cafeeiro pode estar mais preparado para defesa contra invasão de patógenos que o clone 22.
3. Os genes que apresentaram expressão diferencial, entre os clones, antes da entrada do patógeno, tiveram expressão aumentada com a infecção por *M. paranaensis* com exceção dos genes 10974001 e 37300001. No entanto, a expressão desses genes não foi alta quando comparada aos genes que expressaram somente após a infecção.
4. Houve, entre os clones 14 e 22, uma separação temporal dos perfis de expressão dos genes que codificam proteínas de resistência e dos genes que atuam na contenção ou eliminação de *M. paranaensis*.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) pelo provimento dos clones de *C. canephora* utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBER, M. S. & MITCHELL, H. J. Regulation of phenylpropanoid metabolism in relation to lignin biosynthesis in plants. *International Review of Cytology* 172: 243-293. (1997).
- CARNEIRO, R. M. D. G., CARNEIRO, R. G., ABRANTES, I.M.O., SANTOS, M.S.N. & ALMEIDA, S.A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasiting coffee in Brazil. *Journal of Nematology* 28: 177-189. (1996).
- CHICHKOVA, N., KIM, S., TITOVA, E., KALKUM, M., MOROZOV, V., RUBTSOV, Y., KALININIA, N.,

- TALIANSKY, M. & VARTAPETIAN, A. A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell* 16:157-171. (2004).
- DENOEUDE F, CARRETERO-PAULET L, DEREPPER A, DROC G, GUYOT R, PIETRELLA M, ZHENG C, ALBERTI A, ANTHONY F, APREA G, AURY JM, BENTO P, BERNARD M, BOCS S, CAMPA C, CENCI A, COMBES MC, CROUZILLAT D, DA SILVA C, DADDIEGO L, DE BELLIS F, DUSSERT S, GARSMEUR O, GAYRAUD T, GUIGNON V, JAHN K, JAMILLOUX V, JOËT T, LABADIE K, LAN T, LECLERCQ J, LEPELLEY M, LEROY T, LI LT, LIBRADO P, LOPEZ L, MUÑOZ A, NOEL B, PALLAVICINI A, PERROTTA G, PONCET V, POT D, PRIYONO , RIGOREAU M, ROUARD M, ROZAS J, TRANCHANT-DUBREUIL C, VANBUREN R, ZHANG Q, ANDRADE AC, ARGOUT X, BERTRAND B, DE KOCHKO A, GRAZIOSI G, HENRY RJ, JAYARAMA, MING R, NAGAI C, ROUNSLEY S, SANKOFF D, GIULIANO G, ALBERT VA, WINCKER P The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science* 345:1181-1184. (2014).
- GREENBERG, J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:525-545. (1997).
- GREENBERG, J.T. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of UUSA* 93: 12094-12097. (1996).
- HWANG, C.F. & WILLIAMSON, V.M. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *The Plant Journal* 34:585-593. (2003).
- KIEDROWSKI, S; KAWALLECK, P; HAHNBROCK, K; SOMSSICH, I. E; DANGL, J. L. Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus. *EMBO Journal* 11: 4677-4684. (1992).
- LEPELLEY, M., BEN AMOR, M., MARTINEAU, N., CHEMINADE, G., CAILLET, V. & MCCARTHY, J. Coffee cysteine proteinases and related inhibitors with high expression during grain maturation and germination. *BMC Plant Biology* 12:31. (2012).
- LIMA, E.A., FURLANETTO, C., NICOLE, M., GOMES, A. C., ALMEIDA, M. R. A., JUNIOR, A. J., CORREA, V. R., SALGADO, S. M., FERRÃO, M. A. G., & CARNEIRO, R. M. D.G. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Phytopathology*, aceito para publicação, <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-08-14-0232-R> (2015).
- LUKASIK, E. & TAKKEN, F.L.W. Standing strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12:427-436. (2009).
- PAAL, J., HENSELEWSKI, H., MUTH, J., MEKSEM, K., MENÉNDEZ, C.M., SALAMINI, F., BALLVORA, A. & GEBHARDT, C. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *The Plant Journal* 38: 285-297. (2004).
- PENNELL, R.I. & LAMB, C. Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9: 1157-1168. (1997).
- ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: Star, J.L., Cook, R. & Bridge, J. (Eds.) *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford. CABI. pp. 25-41. (2002).
- VAN DER BIEZEN, E.A. & JONES, J.D.G. The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* 8: 226-227. (1998).