

## VALIDAÇÃO DE SEQUÊNCIAS CANDIDATAS DE SILENCIAMENTO GÊNICO DE *MELOIDOGYNE INCÓGNITA*

Leonardo de Amorim Vidal<sup>1</sup>; Priscila Grynberg<sup>2</sup>; Anne-Sophie Petitot<sup>3</sup>; Ana Paula Zotta Mota<sup>4</sup>; Roberto Coiti Togawa<sup>5</sup>; Diana Fernandez<sup>6</sup>; Érika Valéria Saliba Albuquerque<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Bolsista CNPq, Agronomia, Universidade de Brasília-UnB, leonardoamorimvidal@gmail.com

<sup>2</sup> Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, priscila.grynberg@embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisadora, PhD, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier-França, anne-sophie.petitot@ird.fr

<sup>4</sup> Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, anazottamota@gmail.com

<sup>5</sup> Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, roberto.togawa@embrapa.br

<sup>6</sup> Pesquisadora, PhD, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier-França diana.fernandez@ird.fr

<sup>7</sup> Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, erika.albuquerque@embrapa.br

**RESUMO:** *Meloidogyne incognita*, *root-knot nematode* (RKN), é um dos patógenos mais prejudiciais na agricultura mundial e devastadores em cafezais. Programas de melhoramento genético visando a introgressão de genes R tem resultado em quebra de resistência. A maior parte dos defensivos químicos tem se mostrado ineficientes no controle desta praga, bem como as tentativas de controle biológico. Em trabalhos anteriores foi observado que genes homólogos a miraculina foi superexpresso em raízes de cafeeiro de genótipo resistente entre 5 e 6 dias após a infecção por RKN. Foram sequenciadas amostras de raízes por *Illumina HiSeq 4000*, gerando mais de 800 milhões de *reads* de 2x100 de bases. Expressão diferencial *in silico* e a análise do enriquecimento por GO indicam que algumas famílias gênicas são fortemente diferencialmente expressas em respostas resistentes à infecção. 14 genes superexpressos da superfamília de inibidores de proteinases tipo Kunitz similares à Miraculina foram identificados. A evidência até o momento de que a miraculina está fortemente ligada à resposta imune da planta ao RKN, pois a CoMir foi superexpressa em resposta a infecção por bicho mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*). Este estudo mostra a análise de expressão de genes tipo Miraculina por *qPCR* tempo real em raízes de cafeeiro, e a correlação dessa expressão com estresses bióticos na resposta a estresses da planta. Esses genes podem ser importantes atores na resposta imune da planta, podendo ser potencialmente utilizados em abordagens de desenvolvimento de controle de nematoides e pragas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Meloidogyne incognita*, *Coffea arabica*, miraculina, miraculina-like, inibidores de proteinase, inibidores tipo Kunitz.

### Involvement of Miraculin-Like Proteins in the coffee immune response to root-knot nematode

**ABSTRACT:** *Meloidogyne incognita*, *root-knot nematode* (RKN), is one of the most harmful pathogens to worldwide agriculture and very devastating at the coffee culture areas. Genetic enhancement programs that objective the introgression of resistant genes have shown resistance break. Most of the agrochemical have been considerate inefficient, as well as the attempts of biological control. The research group observed that homologous genes to miraculin were overexpressed in coffee roots, when infected by RKN at 5 or 6 days after the infection. The root samples were sequenced by *Illumina HiSeq 4000*, generating more than 800 million of reads of 2x100 bases. The differential expression. *In silico* and the GO analyses indicate that some gene families are very differentially expressed during the plant resistant reaction to the infection by RKN. 14 overexpressed genes from the Kunitz proteinase inhibitor like miraculin were identified. Until the moment the evidence is that miraculin is strongly connected to the immune plant response to RKN infection because CoMir was overexpressed in response to the infection by coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*), and by RKN. This study shows the analyses of genes like miraculin by RT-qPCR of coffee root samples, and the correlation between this expression and the biotic stresses at the plant response to these stresses. These genes may be important players at the plant immune response and being able to be in approaches of this pathogen control.

**KEY WORDS:** *Meloidogyne incognita*, *Coffea arabica*, miraculin, miraculin-like, proteinase inhibitor, Kunitz.

### INTRODUÇÃO

*Meloidogyne incognita*, *root-knot nematode* (RKN), é um dos patógenos mais prejudiciais nos cultivos cafeícolas (*Coffea arabica*). O RKN apresenta em seu ciclo de vida os estádios de ovo, juvenil (4 estádios) e adulto, o juvenil 2 (J2) é o estágio infectivo, que penetra no ápice radicular e migra dentro da raiz estabelecendo seu sitio de alimentação induzindo a formação de células gigantes (Fig.1a), que geram galhas radiculares causando prejuízos severos à hospedeira. Acessos de cafeeiros resistentes a RKN mostraram reações do tipo HR em resposta a *M. incognita* (Fig.1b) mostrando alteração na expressão do gene referente à miraculina em nosso transcrito.

Proteínas *miraculin-like* (MLP) são membros da família de genes Kunitz inibidores de proteinase. Primeiramente foi descrita em tomate e nomeada de LeMir (BRENNER et al., 1998), como sendo uma proteína envolvida na resposta

imune vegetal ao RKN, após isso foram observados inibidores de proteinase do tipo Kunitz similar à miraculina em soja (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004), em café foi identificada uma proteína tipo miraculina e foi nomeada de CoMir (MONDEGO et al., 2011). Algumas evidências na literatura mostram a miraculina como um importante componente na reação do cafeeiro a estresses bióticos, como por exemplo a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) e o bicho mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) (CARDOSO et al., 2014).

O objetivo foi estudar a expressão de genes de PIs tipo Kunitz em cafeeiro por i) busca de genes homólogos em bancos de dados de genômica e transcritômica ii) validação de genes por *real-time qPCR*. Foram identificados 14 genes de PIs tipo Kunitz, proteínas tipo miraculina por expressão diferencial *in silico* e enriquecimento de GO. Foi constatada a expressão diferencial dos genes por análises de *qPCR* em raízes de cafeeiros resistentes infectados por *M. incognita*. Provavelmente proteínas tipo miraculina possuem um papel importante na interação incompatível café-RKN.

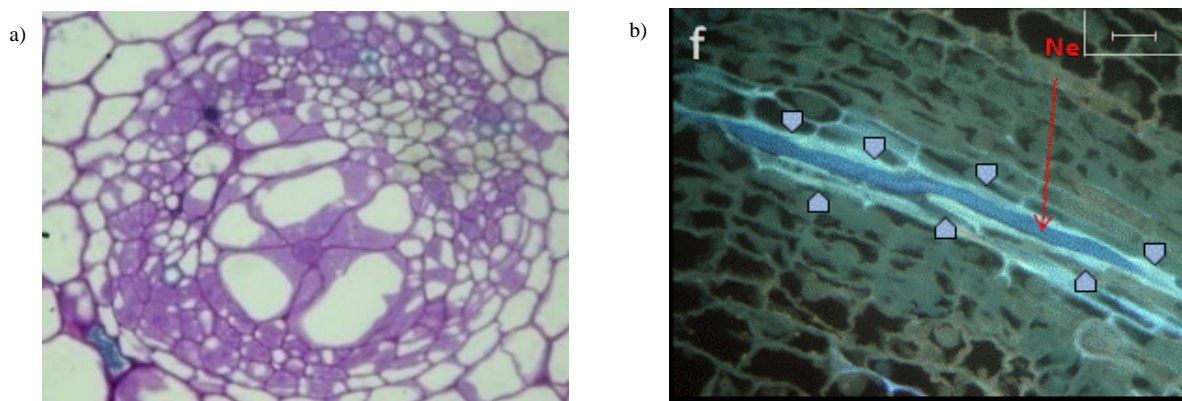


Figura 1. Observação histológica, sob microscópio de luz, de raízes de cafeeiro infectados por *M. incognita*: a) sítio de alimentação com 5 células gigantes em planta de genótipo suscetível; b) Reação do tipo HR fluorescente ao redor do nematoide em planta de genótipo resistente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A seleção de genes inibidores de proteinases tipo Kunitz para design de primers foi feita a partir de projetos anteriores: i) Expressão diferencial em cafeeiros resistentes a RKN em fase precoce infectivo (ALBUQUERQUE et al., 2017); ii) a partir do projeto Embrapa Nemcontrol, onde foram identificados genes diferencialmente expressos no transcrito de cafeeiros resistentes (R) e suscetíveis (S) infectados por RKN, identificados por grupos ortólogos e por enriquecimento de GO, iii) gene da miraculina descrito em cafeeiro, CoMir, superexpresso em cafeeiros infestados por bicho mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) (MONDEGO et al., 2011).

Após a seleção foram recuperadas as sequências proteicas através do *Coffee Genome Hub* (<http://coffee-genome.org/advanced>), *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a partir de um banco de dados de acesso restrito de transcrito de cafeeiros x *M. incognita*. Foram eliminadas as redundâncias das sequências que resultaram em um mesmo representante da família gênica. Foram desenhados primers específicos para cada gene alvo utilizando a ferramenta *Primer3plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

As reações de *qPCR* foram executadas utilizando a *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*). Foram utilizadas três replicadas biológicas independentes dos genótipos resistentes (R) e suscetível (S) de raízes de cafeeiros infectadas por RKN, utilizando-se um total de 10µL de volume por poço, sendo 5µL de *template* (H<sub>2</sub>O ou cDNA), 0,2 µL de *primer* F+R (10 µM) 4,8 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*. as condições para as reações incluíram uma fase de ativação da enzima com 2 minutos de duração a 95°C, em seguida 40 ciclos a 95°C (15 s) e 58°C (1 min), por fim foi feita a fase de dissociação das amostras (HE et al., 2016). Para verificar a eficiência dos primers, foram feitos pools de cDNA de amostras R e S. Para maximizar a acurácia dos resultados foram calculadas as eficiências das reações no LinReg PCR.

Foi feito o alinhamento das sequências proteicas foi feito utilizando a ferramenta *Geneious 8* ® utilizando-se os parâmetros padrão do programa para alinhamentos *ClustalW*. As árvores filogenéticas foram feitas por *neighbourhood joining* (TAMURA et al., 2011) em *bootstrap* de 1000 vezes. Após o desenho da árvore filogenética, foram eliminadas as sequências que possuíam 100% de identidade, permanecendo apenas as sequências únicas. Foi verificada a presença do domínio característico das PIs tipo Kunitz [L/I/V/M]-x-D-x-[E/D/N/T/Y]-[D/G]-[R/K/H/D/E/N/Q]-x-[L/I/V/M]- (x)5-Y-x-[L/I/V/M] na cauda N-terminal da sequência (LASKOWSKI; KATO, 1980), e das cisteínas conservadas nas sequências. Um novo alinhamento foi feito com as sequências restantes verificando-se as distâncias e diferenças entre as sequências, permitindo o desenho de uma nova árvore filogenética com alguns genes de referência, já descritos como MLPs (SELVAKUMAR et al., 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises no banco de dados de acesso restrito foram selecionados 32 genes candidatos homólogos às PIs tipo Kunitz e a miraculina. O desenho dos *primers* foi eficiente na discriminação dos genótipos R e S para comparação de expressão diferencial. O gene alvo nomeado de CoMir12 foi expresso diferencialmente em plantas de cafeeiro, quando comparados os genótipos R e S, mostrando que este gene está intimamente ligado à resposta imune da planta à infecção por RKN (Fig.2).

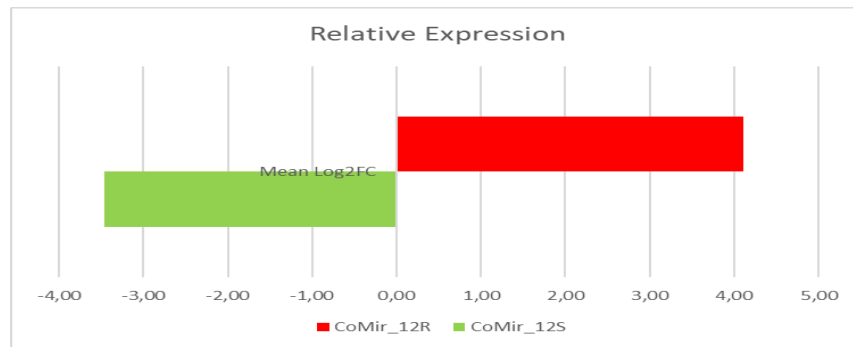


Figura 2. Gráfico de expressão diferencial de um dos candidatos a miraculina.

Após as análises do alinhamento (Fig.3) e da árvore filogenética (Fig.4), ficou demonstrado que os genes selecionados realmente são *miraculin*-like provavelmente são diferentes pois as diferenças entre esses genes, nos domínios, são evidentes e grandes, e não são alelos nos subgenomas do cafeeiro. Foi demonstrado que algumas PIs foram diferencialmente expressas aos 6 dias após a infecção por *Meloidogyne incognita*, em raízes de cafeeiro.

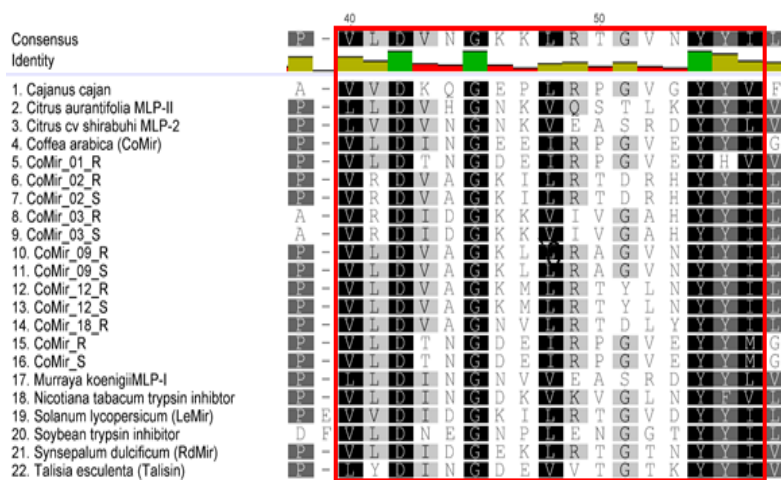


Figura 3. Alinhamento de genes de referência com as sequências candidatas. Em vermelho o domínio característico das proteínas tipo Kunitz.

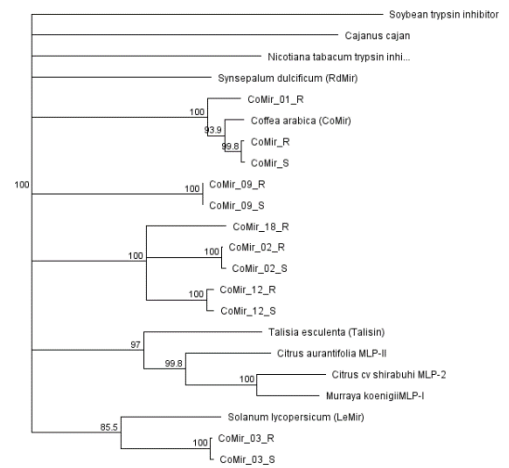


Figura 4. Árvore filogenética de genes de referência com as sequências candidatas.

## CONCLUSÕES

Os resultados indicam que proteínas tipo miraculina estão ligadas à resposta imune da planta a RKN, podendo ser um bom ponto de partida para o desenvolvimento de bioativos tecnológicos e melhoramento genético para resistência da planta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E. V. S. et al. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 127, n. 3, p. 365–373, 1 jul. 2010.
- BRENNER, E. D. et al. Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiology*, v. 118, n. 1, p. 237–247, set. 1998.

CARDOSO, D. C. et al. Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner-toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. *BMC genomics*, v. 15, p. 66, 24 jan. 2014.

MONDEGO, J. M. C. et al. Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation. *Planta*, v. 233, n. 1, p. 123–137, 1 jan. 2011.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, v. 378, n. 3, p. 705–716, 15 mar. 2004.

ALBUQUERQUE, E. V. S. et al. Early responses of coffee immunity-related genes to root-knot nematode infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 100, p. 142–150, 1 dez. 2017.

HE, Y. et al. Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR in *Gentiana macrophylla*. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 2016.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein Inhibitors of Proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, v. 49, n. 1, p. 593–626, 1980.

SELVAKUMAR, P. et al. Molecular evolution of miraculin-like proteins in soybean Kunitz super-family. *Journal of Molecular Evolution*, v. 73, n. 5–6, p. 369–379, dez. 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 1 out. 2011.