



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular**

**Identificação e validação da expressão de genes tipo miraculina em estágio precoce da interação incompatível entre *Coffea arabica* e *Meloidogyne incognita***

Leonardo de Amorim Vidal

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>: Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Coorientadora: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF

FEVEREIRO/2024



LEONARDO DE AMORIM VIDAL

**Identificação e validação da expressão de genes tipo miraculina em estágio precoce da interação incompatível entre *Coffea arabica* e *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andrea Queiroz Maranhão

Coorientadora: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF  
FEVEREIRO/2024

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Leonardo de Amorim Vidal

Título: Identificação e validação da expressão de genes tipo miraculina em estádio precoce da interação incompatível entre *Coffea arabica* e *Meloidogyne incognita*

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Aprovado em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof Dr.: Daniel Mendes Pereira Ardisson de Araújo

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_

Dra.: Natalia Florencio Martins

Instituição: Embrapa Agroindústria Tropical

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_

Suplente Prof<sup>a</sup>. Dra. Thais Ribeiro Santiago

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura:\_\_\_\_\_

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

VIDAL, L. de A. **Identificação e validação da expressão de genes tipo miraculina em estágio precoce da interação incompatível entre *Coffea arabica* e *Meloidogyne incognita*.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, p.55. 2024.

Documento formal, autorizando reprodução do presente trabalho para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzido sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

VIDAL, L. de A. Identificação e validação da expressão de genes tipo miraculina em estágio precoce da interação incompatível entre *Coffea arabica* e *Meloidogyne incognita*. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, p.71. 2024.

1. Interações planta-patógeno.
2. Resposta imunológica.
3. Resistência
4. Transcritoma.
5. Expressão Diferencial.
6. Nematóide das galhas.

*Ao meu pai, minha mãe, minha irmã, avós e namorada,  
dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me conceder o dom da vida e por nunca me abandonar.

Aos meus pais, Wady Nagem Vidal e Sandra Scherrer de Amorim Nagem Vidal, e à minha irmã, Isabella de Amorim Vidal, e minha namorada Patrícia Ramos, por todo apoio e incentivo.

À minha coorientadora Érika Valeria Saliba Albuquerque Freire por todos os ensinamentos, auxílio e suporte, essenciais para a realização deste trabalho.

À professora orientadora Andrea Queiroz Maranhão pelos conselhos e ensinamentos essenciais para a realização deste trabalho.

À pesquisadora Diana Fernandez por seus conselhos e ensinamentos.

Aos amigos Paulo Victor Lustosa, Caio Augusto Torres e Leonardo Zanchi pela amizade e parceria de sempre.

Aos colegas de laboratório Eliza Bellard, Vivian Lucena, Erick Queiroz, Gabriel Borges, Enzo Mendes, Aline Arrorellas e Camila Vilarinho por todo apoio e pelos vários cafés tomados ao longo da elaboração deste trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela disponibilização de toda a infraestrutura para o bom andamento e execução dos experimentos.

Ao CNPq e Consórcio de Pesquisa dos Cafés do Brasil agradeço o financiamento de bolsa no período de realização do trabalho.

À Universidade de Brasília por ter contribuído com vários dos conhecimentos prévios para este trabalho.

Sou Grato!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
1.1 O CAFÉ .....	16
1.2 O NEMATOIDE.....	17
1.3 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE - HR .....	22
1.4 ÁCIDO JASMÔNICO.....	25
1.5 MIRACULINA.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. ARTIGO – SUBMETIDO À REVISTA <i>PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY - PMPP</i> .....	31
4. DISCUSSÃO.....	54
4.1 ANÁLISE FUNCIONAL <i>IN SILICO</i> - GO .....	54
4.2 ANÁLISE FUNCIONAL <i>IN SILICO</i> - MAPMAN .....	55
4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	58
4.4 VALIDAÇÃO FUNCIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR .....	59
5. CONCLUSÃO .....	60
6. PERSPECTIVAS .....	61
BIBLIOGRAFIA .....	62
APÊNDICE I.....	69
APÊNDICE II.....	71

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Esquema representando o ciclo de vida de *M. inconita* com início na oviposição da massa de ovos, ecdise de J1 para J2, migração nosolo até o sub-ápice radicular, penetração na raiz, estabelecimento do sítio de alimentação (células gigantes – Giant cells), ecdises de J2 para J3, J3 para J4 e por fim J4 para fêmea, que se torna sedentária e inicia uma nova liberação de massa de ovos. B) Seção transversal da raiz mostrando células gigantes no sítio de alimentação estabelecido no protoxilema. Fonte: Rutter, Franco e Gleason (2022). ..... 18
- Figura 2 – Fotomicrografia de juvenil de segundo estágio de *M. incognita* penetrando raiz de tomateiro. Foto: William Wergin e Richard Sayre. Colorização: Stephen Ausmus. U.S. Department of Agriculture em “Newly discovered chemical is a highly targeted killer of parasitic worms” ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3 - Corte longitudinal de raiz de *C. arabica* ‘IAC15’ (suscetível) mostrando o estabelecimento do sítio de alimentação (célula multinucleada e multivacuolada destacada em verde) pelo nematoide (seta branca). Foto: Érika Albuquerque. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 – A) Raiz de *C. arabica* com sintomas de meloidoginose por *M. incognita* Fonte: Campos e Villain (2005). B) Vista aérea de reboleira de *M. paranaensis* em cafezal. Fonte: Campos e Villain (2005). ..... 21
- Figura 5 – Esquema representando modelo de resposta zigue-zague. Esse modelo possui quatro fases, na primeira fase os PAMPs (losangos) são liberados pelo nematoide e percebidos pelas PRRs das plantas. Na fase dois os nematoides que tiveram sucesso e burlaram a PTI por meio de efetores dão início à ETS. A fase três inicia com o reconhecimento de efetores (Avr-R vermelho) pelas NB-LRR, gerando a ETI, que geralmente ultrapassa o limite para estabelecimento da HR. Na fase quatro, os nematoides que por ventura sobreviveram, provavelmente perderam o efetor vermelho, e adquiriram novos efetores (Avr-R azul) que podem suprimir a ETI. Fonte: Jones e Dangl (2006). ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6 – HR (fluorescência azul clara indicada pela seta azul clara) em raiz de cafeeiro resistente com nematoide (fluorescência azul escuro indicada pela seta azul escuro) no espaço intercelular. .... **Erro! Indicador não definido.**



FIGURAS DO ARTIGO – SUBMETIDO À REVISTA PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY – PMPP

- Figure 1 - Functional annotation of *C. arabica* transcripts. A) Top 30 PFAM domains; B) Top 15 Biological Processes and Molecular Functions and top five Cellular Component GO terms; C) GO enrichment analysis. Blue bubbles represent GO-enriched terms in the non-inoculated samples. Red bubbles represent GO-enriched terms in the inoculated samples. Bubble sizes are related to GO enrichment fold values. The X-axis represents the transformed **FDR** values. The dotted line marks the statistics threshold of  $FDR < 0.05$ . Specific GO terms are grouped into more general ones..... 39
- Figure 2 - Volcano plot: Red dots represented differentially expressed genes (DEGs) ( $|\log_2FC| \geq 1$ ;  $FDR < 0.05$ ). A to G highlights miraculin DEGs. .... 40
- Figure 3 – MapMan showing all DEGs between Upregulated (red) and Downregulated (blue) R plants at 6 DPI. Individual genes are represented by small squares. The color key represents reads per kb per million reads (RPKM) normalized  $\log_2$  transformed counts. Red represents up-regulation and dark blue represents downregulation when compared to basal expression. The miraculin genes were assigned as PR-genes..... 41
- Figure 4 – Multiple amino-acid sequence alignment of the N-terminal part (without signal peptide) of selected *C. arabica* MLP sequences (CaMir) with other MLP genes from *C. canephora* (CcMir) and MLP reference genes from seven other species. The grey scale represents the similarity level of the sequences at that specific position, the closer to black more sequences present the same amino acid, and the closer to white the fewer sequences present that same amino acid. A) Highlighted in the red box is the Kunitz motif characteristic from the MLP family. B) Highlighted in blue boxes are the positions of the conserved cysteines. These two characteristics are the main characteristics of the miraculin family..... 42
- Figure 5 - Dendrogram reconstructed by maximum likelihood (ML) analysis based on the alignment of the selected sequences from *C. arabica* (CaMir) with other miraculin genes from *C. canephora* (CcMir) and reference genes from other species, numbers upon branches are assessed by ML 1000 bootstrap..... 44
- Figure 6 – Graphical representation of the gene expression in the first biological experiment with R plants at 6 DPI. The gene expression was compared to a constitutive gene (UBI9), and then compared with the plants NI vs. I. The interaction *C. arabica* RKN generated two different expression profiles: the first, on CaMir 01 and CaMir 03 and CaMir 05 (red bars) evidencing a

super expression of the genes and the second profile, CaMir 02 and CaMir 04 (blue bars) evidencing the subexpression of the genes. All experiments followed the same line of modulation in gene expression. ....45

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Material suplementar do artigo: Tabela Suplementar I: sequências proteicas de referência utilizadas para desenho do dendrograma:.....	69
Tabela 2 - Material suplementar do artigo: Tabela Suplementar II: primers utilizados nas reações de RT-qPCR: .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Ácido Salicílico – <i>Salicylic Acid</i>
Avr	Genes de avirulência
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar - <i>complementary DNA</i>
cm	Centímetros
Da	Daltons
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DEGs	<i>Differentially Expressed Genes</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico - <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPI	dias pós-inoculação - <i>Days Post Infection</i>
e.g.	<i>exempli gratia</i> – por exemplo
Et	Etileno
ERFs	
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
I	Inoculado
IAA	Ácido indolacético - <i>Indole-3-Acetic-Acid</i>
HR	Reação de Hipersensibilidade - <i>Hypersensitive Response</i>
JA	Ácido Jasmônico - <i>Jasmonic Acid</i>
J2	Juvenil de segundo estágio
kg	Quilograma
KTI	Inibidores de Proteínase do tipo <i>Kunitz</i>
MAMPs	<i>Microbial-Associated Molecular Patterns</i>
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos – <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MLPs	Proteína tipo Miraculina - <i>Miraculin-like Proteins</i>
NB-LRR	<i>Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NI	Não Inoculado
nM	Nanomolar

NO	Óxido Nítrico - <i>Nitric Oxide</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
pb	Par de Bases
PCD	Morte Celular Programada- <i>Programmed Cell Death</i>
IP	Inibidores de Proteinase - <i>Proteinase Inhibitors</i>
PR	Relacionada a patógeno <i>Pathogen Related</i>
PRRs	<i>Plant Pattern Recognition Receptors</i>
PTI	<i>Pattern-Triggered Immunity</i>
RT-qPCR	PCR Quantitativo, PCR em Tempo Real - <i>Real-Time Quantitative PCR</i>
R	Resistente
RKN	<i>Root-knot Nematode</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio – <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPKM	<i>Reads Per kb Per Million Reads</i>
SKTI	<i>Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor</i>
TFs	
TMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

## RESUMO

A produção de café é altamente afetada por patógenos, incluindo o nematoide das galhas *Meloidogine incognita* (root-knot nematode - RKN). Embora existam acessos de *Coffea arabica* resistentes a esse importante nematoide, a resposta imunológica em níveis moleculares ainda não foi elucidada em detalhes. Para isso, foi gerado um transcrito a partir de raízes de cafeeiro resistente (acesso UFV 408-28), coletadas aos seis dias após a inoculação com RKN. Dentre os 2,560 genes diferencialmente expressos (DEGs) nesse transcrito, trinta e duas sequências foram preditas na anotação automática como inibidores de endopeptidases, tipo miraculina,. As análises de enriquecimento por *gene ontology* mostraram que o grupo dos inibidores de endopeptidases, onde se classificam as miraculinas, apresentam uma superexpressão quando *C. arabica* é desafiado contra RKN. As análises pelo MapMan mostraram uma forte alteração na regulação de genes relacionados à parede celular e patógenos (PR), grupo ao qual as miraculinas foram incluídas. A análise de homologia das sequências de miraculinas comparadas às sequências de referência mostrou, que sete das sequências preditas eram de fato miraculinas. Por fim a validação desses genes por RT-qPCR confirmou a alteração da expressão desses genes na interação planta-patógeno. Os resultados apresentados neste trabalho fornecem informações relevantes a respeito do envolvimento das miraculinas nessa interação incompatível e pode contribuir para o desenvolvimento de cultivares resistentes por programas de melhoramento genético.

**Palavras-chave:** Interações planta-patógeno; Resposta imunológica; Resistência; Transcrito; Expressão Diferencial; Nematode das galhas.

## ABSTRACT

Coffee production is highly affected by pathogens, including the root-knot nematode *Meloidogine incognita* (RKN). Although there are accessions of *Coffea arabica* resistant to this important nematode, the immunological response at molecular levels has not yet been elucidated in detail. For this, a transcriptome was generated from resistant coffee plant roots (accession UFV 408-28), collected six days after inoculation with RKN. Among the 2,560 differentially expressed genes (DEGs) in this transcriptome, thirty-two sequences were predicted in the automatic annotation as endopeptidase inhibitors, miraculin type, and presented abundant transcripts. Enrichment analyzes by gene ontology showed that the group of endopeptidase inhibitors, where miraculins are classified, present an overexpression when *C. arabica* is challenged against RKN. MapMan analyzes showed a strong change in the regulation of genes related to the cell wall and pathogens (PR), a group to which miraculins were included. The homology analysis of the miraculin sequences compared to the reference sequences showed that seven of the predicted sequences were in fact miraculins. Finally, the validation of these genes by RT-qPCR confirmed the change in the expression of these genes in the plant-pathogen interaction. The results presented here provide relevant information about the involvement of miraculins in this incompatible interaction and may contribute to developing resistant cultivars in genetic improvement programs.

**Keywords:** Plant-pathogen interaction; Immune response; Resistance; Transcriptome; Differential expression.; Root-knot nematodes.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 O CAFÉ

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo (“Indicadores da Indústria de Café | 2022”, [s.d.]), representando um papel impactante na economia mundial, não apenas pela importância econômica de forma direta, mas também pela função social associada à esta cadeia agrícola.

No ano cafeeiro de 2022/23, foram produzidas 168,2 milhões de sacas de 60 kg de café no mundo, com uma expectativa de produção para a safra de 2023/24 de 178 milhões de sacas (ICO, 2023). O Brasil é protagonista nesse cenário, como maior produtor das duas espécies economicamente mais importantes de café do mundo, tendo produzido na safra de 2022/23 o equivalente a 38,9 milhões de sacas de *Coffea arabica* L. e 16,17 milhões de sacas de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Além disso, é o maior exportador do mundo, com 34,9 milhões de sacas de 60 kg de café de janeiro a novembro de 2023 (CONAB, 2024).

*C. arabica* está classificada com outras 127 espécies no gênero *Coffea*, pertencente à família Rubiaceae, ordem Gentianales, classe Magnoliopsida, filo Streptophyta, reino Viridiplantae, super reino Eukaryota (HYDE; WURSTEN; BALLINGS, [s.d.]). Esta espécie possui seu centro de origem na região montanhosa da Etiópia, sudeste africano (HAARER, 1956), e chegou ao Brasil no início do século XVIII, por volta de 1727, pelos estados do Maranhão e do Grão-Pará (atualmente estado do Pará), onde foi dado início a um longo processo de expansão até o estado da Bahia, em 1770, chegando ao Rio de Janeiro em 1774. Porém, os primeiros parques cafeícolas de fato foram iniciados em 1825, com a chegada da cultura ao interior do estado de São Paulo, no vale do Paraíba (MATIELLO et al., 2016).

O genoma de *C. arabica* é formado por dois conjuntos de cromossomos que deram origem ao híbrido alotetraploide ( $2n=44$ ) que conhecemos atualmente. formado a partir de um evento de cruzamento entre os genitores *Coffea eugenioides* e *C. canephora* (LASHERMES et al., 1999).

As plantas de *C. arabica* apresentam um sistema radicular composto por um eixo pivotante central e raízes laterais finas para absorção de nutrientes. Esse sistema pode atingir até três metros de profundidade para absorção de alguns nutrientes que por ventura estejam em camadas profundas do solo, ainda que 80% das raízes predominantes na absorção nutricional esteja na camada superficial (até 40 cm) do solo (MATIELLO et al., 2016).



## 1.2 O NEMATOIDE

As lavouras de *C. arabica* passam diariamente por desafios ocasionados por pragas e patógenos para se manterem produtivas. Patógenos são os agentes biológicos capazes de causar doenças, estabelecidos como fungos, bactérias, vírus e nematoides.

As principais bactérias que causam doenças em cafeeiros são *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci* e *Xylella fastidiosa* Wells et al., que causam a mancha-aureolada, mancha-foliar bacteriana e queima das folhas, respectivamente (BADEL; ZAMBOLIM, 2019).

Fungos também são importantes agentes causadores de doenças em cafeeiros. Os principais fungos fitopatogênicos que acometem cafeeiros são *Hemileia vastatrix*, *Colletotrichum kahawae*, *Fusarium xylarioides*, *Cercospora coffeicola* e *Phoma* spp., causando, respectivamente, ferrugem do cafeeiro, antracnose dos frutos verdes, murcha do cafeeiro, mancha de olho pardo e mancha de *Phoma*, (LU et al., 2022). Ainda que raras, viroses também podem acometer cafeeiros, como a mancha-anular do cafeeiro (*Coffee ringspot virus* – CoRSV) (BOARI et al., 2006).

Por fim, os nematoides integram o último grupo dos fitopatógenos, onde as espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* são nocivas à cultura do café (OLIVEIRA; ROSA, 2018). Os nematoides são animais invertebrados, geralmente de corpo cilíndrico, alongado e com extremidades afiladas. Esses animais estão classificados no filo Nematoda. Nesse filo estão contidos alguns dos gêneros de fitopatógenos mais importantes para a agricultura mundial (e.g. *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera*, *Pratylenchus*, *Rodopholus*, *Rotylenchulus*, *Nacobbus* e *Tylenchulus*), com mais de 4500 espécies de fitonematoides parasitas de plantas (“Nematóides - Portal Embrapa”, [s.d.]).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são conhecidos como nematoides das galhas (*Root-knot nematode* – RKN). Esse gênero compreende mais de 70 espécies, de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (“Taxonomy Browser”, [s.d.]). As espécies desse gênero são polífagas e podem apresentar mais de 3000 espécies de plantas hospedeiras (DE LEY; BLAXTER, 2002). São registradas 18 espécies do gênero infectando plantas de café em diferentes partes do mundo, dessas, seis são registradas parasitando essa cultura no Brasil, sendo elas: *M. exigua* Göldi, 1887, *M. incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrante & Almeida 1996, *M. coffeicola*

Lordello & Smith, 1960, *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. izalcoensis* Carneiro, Almeida, Gomez & Hernandez, 2005 (SALGADO; REZENDE, 2010; STEFANELO et al., 2019). Os nematoides desse gênero iniciam o ciclo de vida (Figura 1A) com a postura da massa de ovos (média de 400 a 500 ovos) pela fêmea no parênquima cortical (Figura 1B), mantendo a massa de ovos interna à planta, ou na superfície radicular, expondo a massa de ovos para o ambiente externo à raiz. O embrião inicia seu desenvolvimento em juvenil de primeiro estágio (J1), ainda no ovo, o J1 sofre ecdise e origina o juvenil de segundo estágio (J2). Os J2 então eclodem dos ovos e iniciam o processo de migração no solo buscando o ápice radicular, guiado por exsudatos liberados pelas raízes (ABAD et al., 2009).

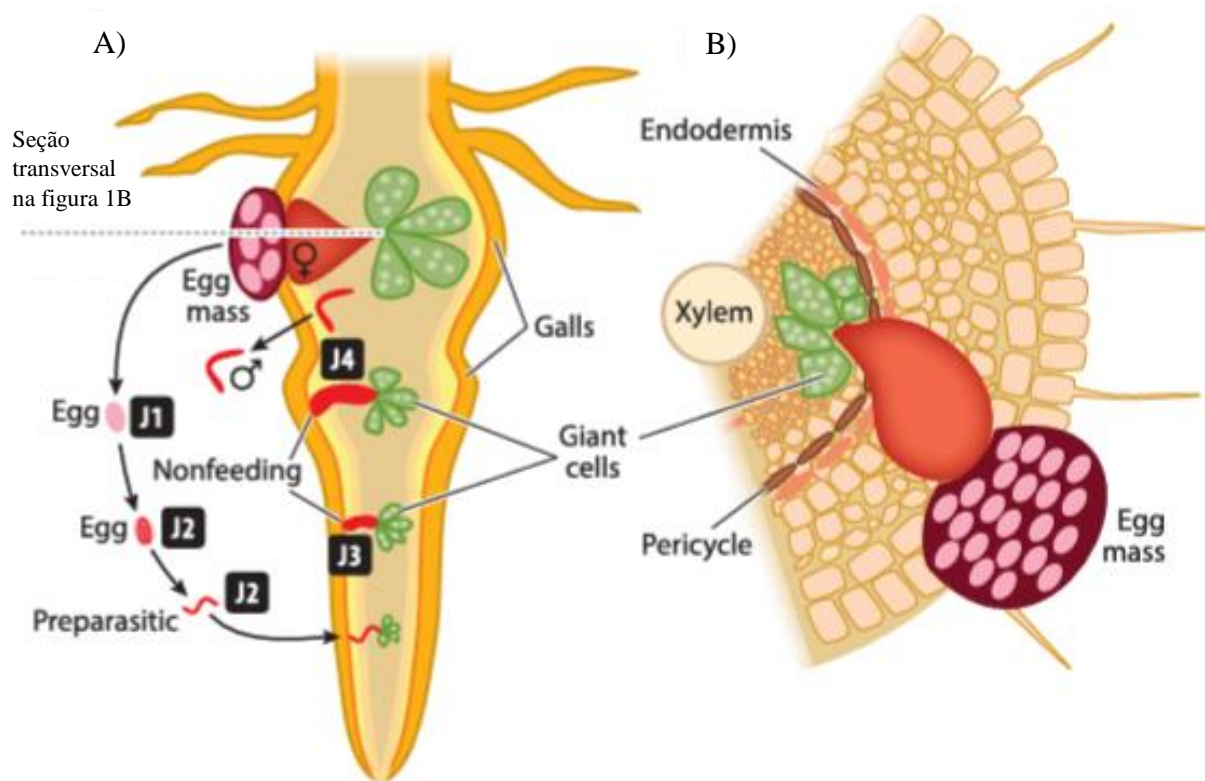


Figura 1 – A) Esquema representando o ciclo de vida de *M. inconita* com início na oviposição da massa de ovos, ecdise de J1 para J2, migração no solo até o sub-ápice radicular, penetração na raiz, estabelecimento do sítio de alimentação (células gigantes – *Giant cells*), ecdises de J2 para J3, J3 para J4 e por fim J4 para fêmea, que se torna sedentária e inicia uma nova liberação de massa de ovos. B) Seção transversal da raiz mostrando células gigantes no sítio de alimentação estabelecido no protóxilema. Fonte: Rutter, Franco e Gleason (2022).

Ao encontrarem a superfície da raiz, os J2 (Figura 2) liberam uma quantidade massiva de enzimas, predominantemente degradadoras de parede celular, que permitem a penetração nas raízes e migração intercelular para atingir o cilindro vascular em busca das células do protóxilema para estabelecerem o sítio de alimentação, onde vão passar por mais três ecdises: J2 para J3, J3 para J4, e por fim J4 para fêmea jovem (RUTTER; FRANCO; GLEASON, 2022; TAYLOR; SASSER, 1983). A fêmea se torna sedentária e dá início ao processo de

amadurecimento, produção e liberação de ovos. A reprodução é assexuada por partenogênese (ABAD et al., 2009; KOUTSOVOULOS et al., 2020).



Figura 2 – Fotomicrografia de juvenil de segundo estágio de *M. incognita* penetrando raiz de tomateiro. Foto: William Wergin e Richard Sayre. Colorização: Stephen Ausmus. U.S. Department of Agriculture em “Newly discovered chemical is a highly targeted killer of parasitic worms”.

Para o estabelecimento do sítio de alimentação, o nematoide utiliza o estilete para injetar secreções produzidas pela glândula esofágica, rica em efetores, que induzem mitoses sucessivas



em algumas células (de 5 a 7 células, na maioria dos casos) do protoxilema radicular, porém sem a fase final da divisão celular (citocinese), resultando em células gigantes multinucleadas (Figura 3) (ALBUQUERQUE et al., 2010; RUTTER; FRANCO; GLEASON, 2022). Uma vez estabelecido esse sítio de alimentação, o nematoide começa a se alimentar da seiva da planta rica em fotoassimilados (ABAD et al., 2003; DE ALMEIDA ENGLER et al., 1999). O citoplasma das células do sítio de alimentação se torna denso e rico em mitocôndrias, plastídios e ribossomos, além de apresentarem complexos de Golgi bem desenvolvidos e um retículo endoplasmático liso amplo (ABAD et al., 2003)

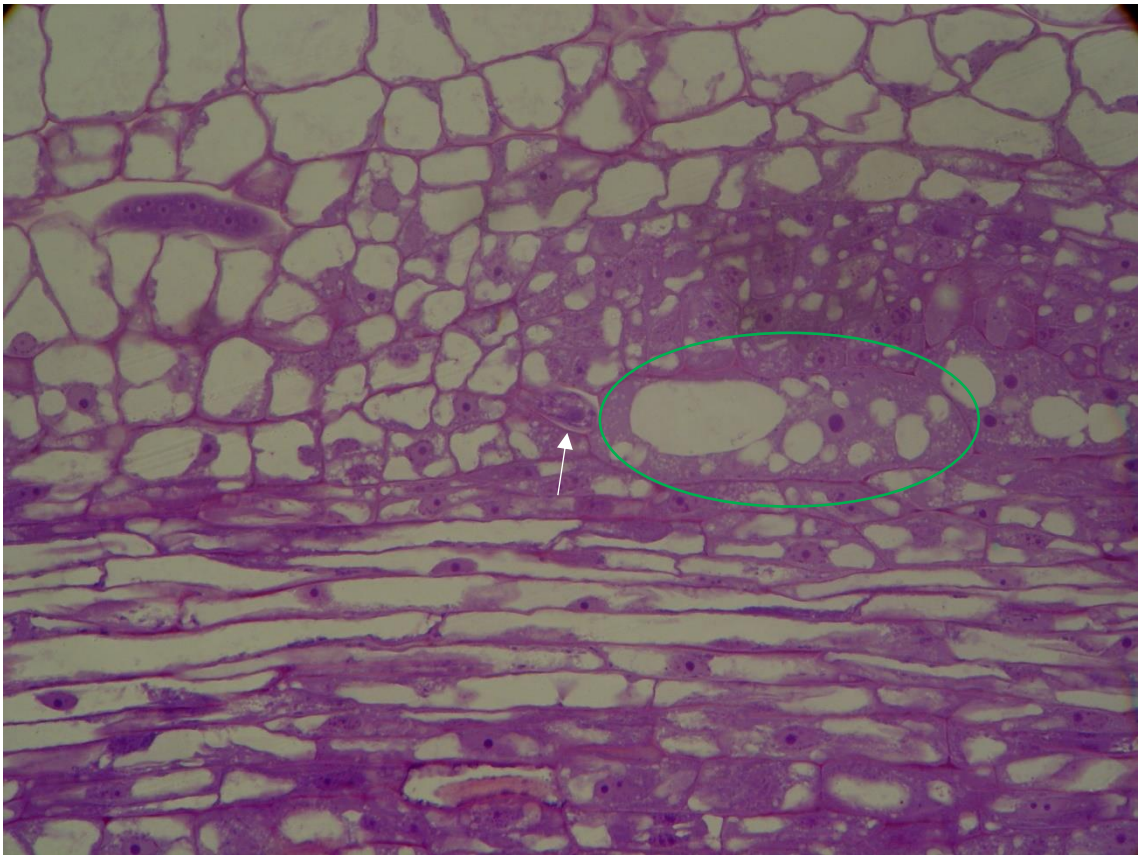


Figura 3 - Corte longitudinal de raiz de *C. arabica* 'IAC15' (suscetível) mostrando o estabelecimento do sítio de alimentação (célula multinucleada e multivacuolada destacada em verde) pelo nematoide (seta branca). Foto: Érika Albuquerque

As fêmeas adultas possuem corpo piriforme e comprimento médio entre 0,44 e 1,30 mm e largura variando entre 0,325 e 0,700 mm (EISENBACK, 1985; SASSER et al., 1983). Segundo Carneiro et al., (2004), os machos de *M. incognita* são caracterizados morfológicamente e apresentam elementos essenciais para a distinção entre algumas espécies, tais como *M. incognita*, *M. paranaenses*, *M. konaensis*. Por serem partenogenéticos mitóticos, *M. incognita* não necessita ou raramente necessita de machos para a reprodução (CHITWOOD; PERRY, 2009).

A meloidoginose desenvolvida em cafeeiros não apresenta sintomas convencionais, como as galhas, presentes na maioria das plantas. As plantas de *C. arabica* quando suscetíveis a esse patógeno apresentam engrossamento, necroses e rachaduras nas raízes (Figura 4A) (CARNEIRO et al., 1996). Consequências como desfolha e mortalidade são frequentes em plantas acometidas com meloidoginose, podendo apresentar, ainda, clorose e dificuldade de absorção de água e nutrientes e um intenso depauperamento. A distribuição desse tipo de nematoide no campo se dá em manchas distribuídas de forma irregular, essa formação é denominada de reboleira (Figura 4B) (OLIVEIRA; ROSA, 2018).



Figura 4 – A) Raiz de *C. arabica* com sintomas de meloidoginose por *M. incognita* Fonte: Campos e Villain (2005). B) Vista aérea de reboleira de *M. paranaensis* em cafezal. Fonte: Campos e Villain (2005).

A espécie *M. incognita* é altamente agressiva a plantas de *C. arabica*, pois, na maioria das vezes, causa a morte das plantas infectadas, gerando perdas significativas na produção. Os

prejuízos chegam a 15% na média global e ultrapassam essa média no Brasil, gerando 20% de prejuízo (OLIVEIRA; ROSA, 2018).

### 1.3 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE - HR

Plantas passam diariamente por diferentes estímulos, sejam bióticos ou abióticos e respondem a isso em níveis moleculares (FERNANDES et al., 2009). Essas respostas moleculares são diferentes de acordo com o gerador de determinado estímulo. A percepção de agentes patogênicos próximos às raízes de plantas é dada pela percepção de padrões moleculares associados a patógenos ou microrganismos – *pathogen- or microbe-associated molecular patterns* (PAMPs ou MAMPs) e padrões moleculares associados a danos – *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (YU et al., 2017). MAMPs ou PAMPs são moléculas exógenas produzidas por microrganismos - bactérias, fungos, oomicetos e nematoides, e altamente conservadas (COUTO; ZIPFEL, 2016; TEIXEIRA et al., 2019). Já os DAMPs, são compostos endógenos liberados pela planta após um ferimento ou herbivoria (KAWA; BRADY, 2022).

Esses dois grupos de moléculas são percebidos pela planta por meio dos receptores de reconhecimento de padrões de planta – *plant pattern recognition receptors* (PRRs), presentes na membrana plasmática (BOLLER; FELIX, 2009; JONES; DANGL, 2006). Essa sinalização inicia uma resposta imunológica em cascata contra o patógeno percebido, denominada imunidade desencadeada por padrão - *pattern-triggered immunity* (PTI) (COUTO; ZIPFEL, 2016).

Algumas das primeiras reações da planta na PTI são o fechamento dos estômatos, a restrição da transferência de nutrientes do citosol para o apoplasto, o aumento da produção e secreção de fitoalexinas (como camalexina), peptídeos e proteínas relacionadas à defesa da planta, produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e deposição de calose, gerando a ativação de metabólitos antimicrobianos e hormônios de defesa, como ácido salicílico (SA), etileno (Et) e ácido jasmônico (JA) (PANIGRAHI; SAHOO; SATAPATHY, 2021). Em alguns casos, a planta gera uma resposta de morte celular programada – *programmed cell death* (PCD) rápida, localizada e induzida presente na resposta ou reação de hipersensibilidade – *Hypersensitive response* (HR) (BALINT-KURTI, 2019).

Ao longo da evolução, patógenos foram desenvolvendo mecanismos para superar a PTI, de forma a permitir o desenvolvimento da doença por eles causada e a completude de seu ciclo

de vida. Essa forma de “burlar” a PTI foi chamado de susceptibilidade desenvolvida por efector – *Effector-Triggered Susceptibility* (ETS) (CUI; TSUDA; PARKER, 2015). A percepção de efetores do patógeno pela planta pode ser feita através da detecção de efetores conservados de cada patógeno.

As plantas que não reconhecem o patógeno por um meio ou pelo outro são ditas suscetíveis, já as que reconhecem, por possuírem algum gene de resistência (R genes), são ditas como resistentes e dão início a uma resposta imunológica chamada de imunidade desencadeada por efector - *Effector-Triggered Immunity* (ETI) (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). A ETI é dada pela percepção dos efetores dos patógenos pelas proteínas de resistência (R proteínas) intracelulares ou transmembrânicas das plantas, que se ligam com alta especificidade aos efetores (PENG; VAN WERSCH; ZHANG, 2018; ZHANG; ZHOU, 2010).

A coevolução das proteínas R nas plantas e dos genes de avirulência (Avr) nos patógenos deu origem ao modelo chamado zigue-zague (JONES; DANGL, 2006) que consiste em quatro fases (Figura 5). Nesse modelo, a fase um se inicia quando PAMPs ou MAMPs são reconhecidos pelas PRRs resultando em PTI (que pode interromper o avanço do patógeno). A fase dois, inicia com a liberação de efetores pelo patógeno que contribuem para a avirulência, resultando na ETS, permitindo que o patógeno estabeleça seu sítio de alimentação, ou na interferência sobre a PTI. Na fase três, ocorre o reconhecimento de um efector específico do patógeno pela planta por proteínas específicas - *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat* (NB-LRR), esse reconhecimento desencadeia uma ETI, como uma forma amplificada e acelerada de PTI, que por ultrapassar um limiar gera a indução de uma HR local. Na quarta fase, os patógenos que não foram eficientes em estabelecer seus sítios de alimentação ou prosseguir com seu ciclo de vida são eliminados, os outros são forçados pela seleção natural a diversificar seus efetores para não serem reconhecidos ou a adquirir novos efetores supressores da ETI, porém a supressão da ETI favorece a planta no sentido de reconhecer com facilidade os novos efetores adquiridos pelo patógeno, desencadeando novamente a ETI (JONES; DANGL, 2006).

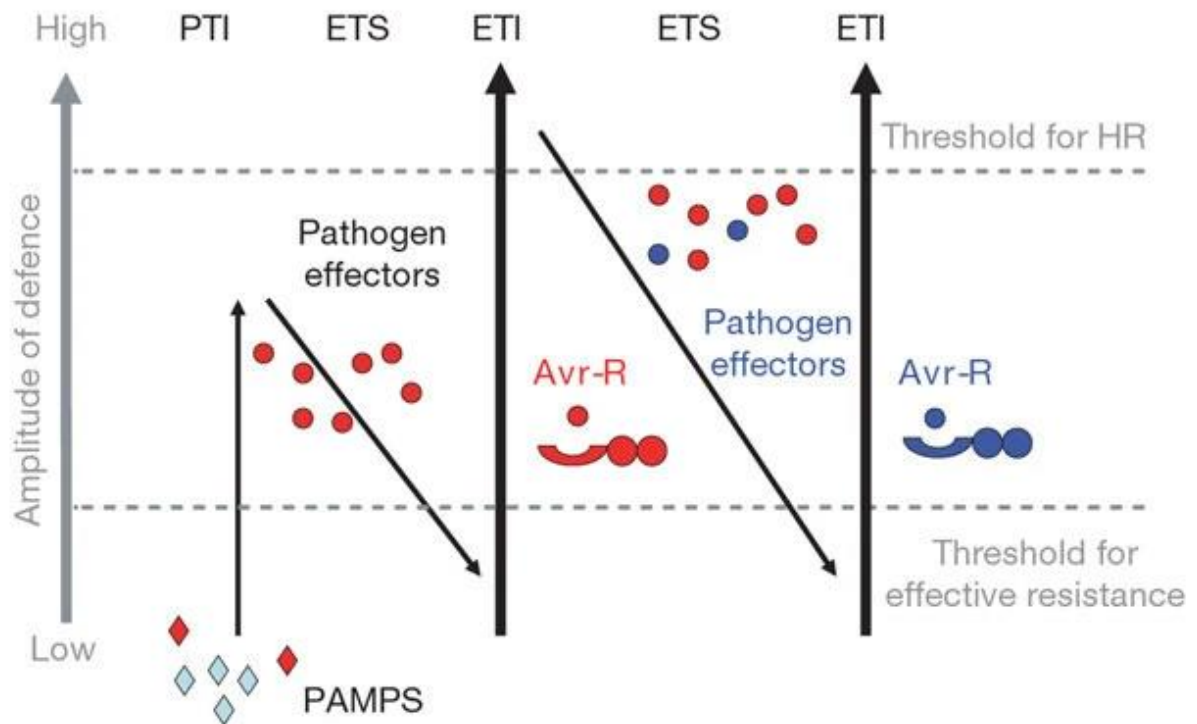


Figura 5 – Esquema representando modelo de resposta zig-zague. Esse modelo possui quatro fases, na primeira fase os PAMPs (losangos) são liberados pelo nematoide e percebidos pelas PRRs das plantas. Na fase dois os nematoides que tiveram sucesso e burlaram a PTI por meio de efetores dão início à ETS. A fase três inicia com o reconhecimento de efetores (Avr-R vermelho) pelas NB-LRR, gerando a ETI, que geralmente ultrapassa o limite para estabelecimento da HR. Na fase quatro, os nematoides que por ventura sobreviveram, provavelmente perderam o efetor vermelho, e adquiriram novos efetores (Avr-R azul) que podem suprimir a ETI. Fonte: Jones e Dangl (2006).

Reações tipo HR são casos clássicos de resistência gene a gene associadas a resistências raça-específicas, quando um determinado genótipo de uma planta é resistente a um raça específica de patógeno (BALINT-KURTI, 2019; FLOR, 1971). A relação gene a gene entre planta e patógeno é determinada pelo desenvolvimento ou não da doença. Quando a planta desenvolve a doença é tida como suscetível, caso contrário, resistente. Para cada gene de resistência (R gene) dominante na planta há um Avr correspondente no patógeno. A resistência se configura com a presença dos dois genes na interação entre planta-patógeno (BALINT-KURTI, 2019). Muitas vezes, a resistência mediada por genes R estão associados a HR, caracterizadas pela rápida morte celular apoptótica localizada, além de necrose local para impedir o avanço do patógeno até o sítio de alimentação (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015).



Em cafeeiro, Albuquerque et al. (2017) descreveram uma HR (resposta em nível molecular) em interação incompatível entre o acesso resistente UFV408-28 de *C. arabica* e *M. incognita*, em um momento precoce da infecção, aos 6 d p.i. (Figura 6). A análise de diferentes genes, que tiveram sua expressão alterada nesse momento da interação, evidenciou uma série de alterações na expressão de diversos deles, principalmente os genes relacionados à defesa da planta, incluindo os genes relacionados as vias de sinalização hormonal de SA, JA, Et, genes tipo miraculina e genes relacionados a ROS.

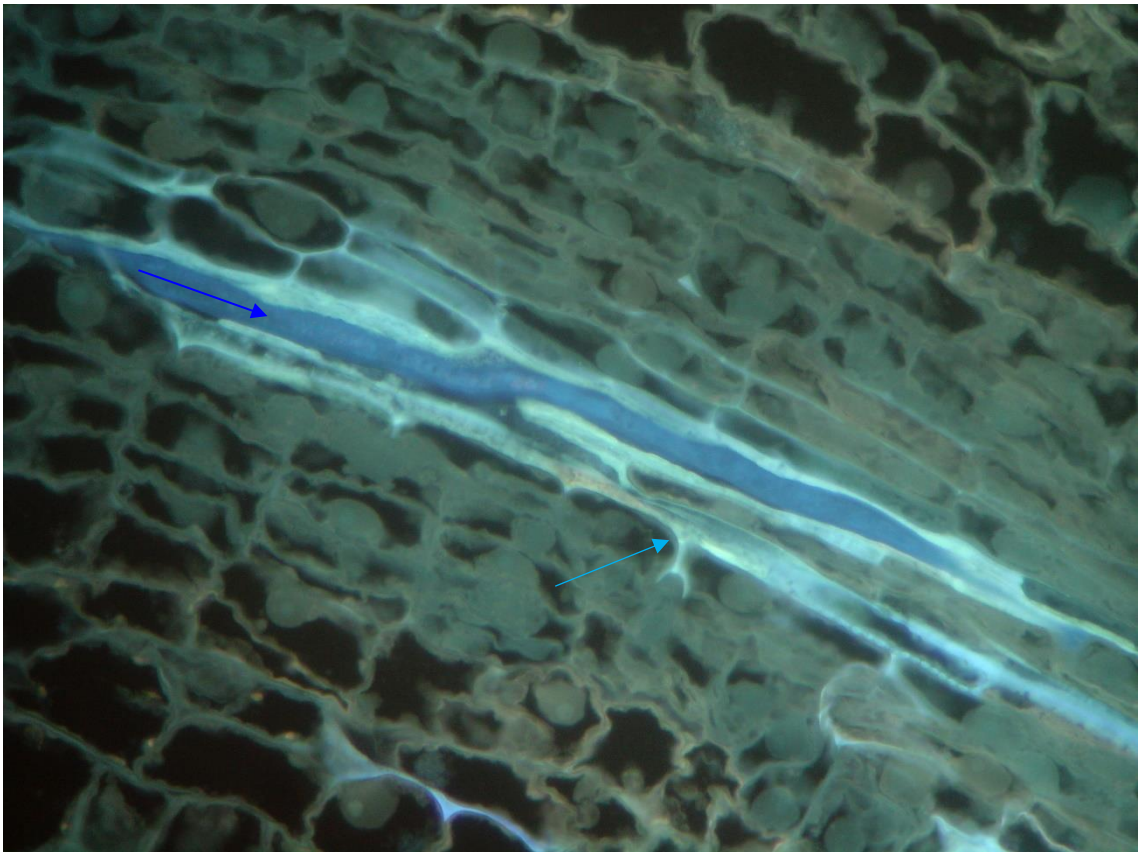


Figura 6 – HR (fluorescência azul clara indicada pela seta azul clara) em raiz de cafeeiro resistente com nematoide (fluorescência azul escura indicada pela seta azul escura) no espaço intercelular.

#### 1.4 ÁCIDO JASMÔNICO

A sinalização do sistema imunológico das plantas é feita principalmente por metabólitos secundários ou hormônios: JA, SA e Et (MENG; ZHANG, 2013; NAHAR et al., 2011; PANIGRAHI; SAHOO; SATAPATHY, 2021; PIETERSE et al., 2009). Esses três hormônios estão muito relacionados ao sistema de defesa das plantas por meio da sinalização de defesa de duas vias: SA dependente e JA dependente. Por existir um *crossstalk* entre as duas vias que otimizam a resposta a patógenos, elas não atuam de forma independente na resposta a ferimentos (KUNKEL; BROOKS, 2002; PRZYBYLSKA; OBREPALSKA-STEPLOWSKA,

2020). A via SA dependente está relacionada a resistência estabelecida de forma sistêmica, enquanto a via JA dependente está relacionada a reações de defesa a ferimentos. Essa via possui um *crosstalk* com a sinalização da via do Et de forma sinérgica e antagônica, atuando nos diferentes momentos da resposta imunológica das plantas a diferentes patógenos (KUNKEL; BROOKS, 2002).

O JA é um importante hormônio das plantas, notadamente envolvido nas respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos, além de participar dos processos de desenvolvimento da planta (PANIGRAHI; SAHOO; SATAPATHY, 2021). O JA regula o desenvolvimento dos estames e tricomas, abertura estomática, expansão foliar, regulação do ciclo celular, transporte de glicose, indução de senescência de folhas e degradação da clorofila. Além disso, está envolvido na resposta imunológica a estresses, ativando a maquinaria de defesa das plantas (GHORBEL et al., 2021).

O JA é um hormônio importante nas interações planta-nematoide. Estudos realizados em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (COOPER; JIA; GOGGIN, 2005), tomate silvestre (*S. peruvianum* L.) (FUJIMOTO et al., 2011) arroz (*Oryza sativa* L.) (NAHAR et al., 2011), soja [*Glycine max* (L.) Merr., 1917] (HU et al., 2017) e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (GLEASON et al., 2016) demonstraram que a aplicação tópica foliar de JA ou de seu derivado volátil (metil jasmonato) em plantas pode aumentar a resistência de plantas a RKN (TOPALOVIC' et al., 2020).

Cooper, Jia e Goggin (2005) testaram a aplicação foliar da JA em duas linhagens de *Lycopersicon esculentum* Mill (atualmente: *S. lycopersicum*), uma suscetível e outra resistente a algumas espécies do gênero *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, e *M. arenaria* (Neal, 1889). Nesse trabalho as duas linhagens continham o gene de resistência *Mi-1.2* e foram desafiadas com *M. javanica* *M. incognita*. Após a aplicação, mesmo as plantas suscetíveis, apresentaram uma queda na produção de ovos, fato ainda mais pronunciado na linhagem resistente estimulada por JA, demonstrando a eficiência deste hormônio em aumentar a resistência da planta a RKN.

Plantas de *Arabidopsis* foram inoculadas com *M. hapla* por Gleason et al. (2016) e receberam tratamento foliar com metil jasmonato para testar a indução de resistência a esse nematoide. Como resultado, as plantas tratadas apresentaram 50% de redução na quantidade de

galhas presentes nas raízes em relação às plantas controle que não receberam metil jasmonato. Nahar et al. (2011) aplicaram metil jasmonato em plantas de arroz (*O. sativa*) e as desafiaram com *M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965, observando aos 14 d p.i. uma redução de 64% no número de galhas por raiz e 55% no número de galhas por grama de raiz, em relação às plantas controle, que receberam aplicação com Tween 20 (0,02% v/v).

Alguns experimentos demonstraram que respostas imunológicas incompatíveis naturais a estresses por esses patógenos podem ser dependentes de picos elevados na sinalização de JA, ainda nos primeiros instantes da infecção pelo nematoide. Du et al. (2021) submeteram plantas de *S. peruvianum* ‘PI 126443’, a estresse por *M. incognita* e realizaram aplicação tópica de JA. Essa espécie de tomate silvestre apresenta o gene *Mi-3* em seu genoma conferindo resistência natural a *M. incognita*. Apesar do claro envolvimento do JA nas interações planta-nematoide, alguns autores consideram que a compreensão do papel de JA nas respostas de plantas a estresses bióticos ainda não foi bem elucidada, devido ao seu largo espectro de atuação nos diferentes processos biológicos (e.g. desenvolvimento da planta e regeneração de raízes) (ZHOU et al., 2019).

## 1.5 MIRACULINA

*Miraculin-like Proteins* (MLPs) se mostraram vinculadas a respostas imunológicas a estresses bióticos em plantas (TSUKUDA et al., 2006). MLPs são inibidores de tripsina que inibem a atividade proteolítica de patógenos e pragas alterando a capacidade de digestão de patógenos e pragas (CONANT; WOLFE, 2008; GAHLOTH et al., 2011; RYAN, 1990; TSUKUDA et al., 2006). Essa característica levou essas proteínas a serem classificadas como inibidores de proteinase (PI) do tipo Kunitz (KTI). Esses PIs apresentam um domínio específico característico da superfamília Kunitz, já as MLPs, além do domínio, apresentam seis cisteínas conservadas que formam três pontes de bissulfeto na porção N-terminal (SELVAKUMAR et al., 2011).

Miraculina é uma glicoproteína presente no fruto de *Synsepalum dulcificum* Daniell, 1852, que tem capacidade de alterar a percepção de humanos dos sabores azedo e ácido em sabor doce. O referido fruto é proveniente de um arbusto nativo, originalmente da região tropical do Oeste e região central do continente africano. Conhecida como “fruta dos milagres”.

Kurihara e Beidler (1968) isolaram a miraculina do fruto de *S. dulcificum*, uma glicoproteína, insípida, termolábil, de peso molecular aproximado de 44 kDa, desnaturada

quando em contato com solventes orgânicos em alta concentração e quando em contato com enzimas proteolíticas. Brenner et al. (1998) descreveu uma molécula cuja identidade com alguma proteína conhecida foi de 54% idêntica a uma proteína de miraculina. Essa proteína foi induzida pela presença de *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 em *S. lycopersicum*, e foi nomeada de LeMir. Em 1998, Karrer, Beachy e Holt identificaram uma proteína 68% idêntica à miraculina em experimentos de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN desafiados com TMV (*Tomato mosaic Virus*) em uma resposta com reações de hipersensibilidade. Em Lee et al. (1999) plantas de *O. sativa* foram transformadas com gene de inibidor de proteinase do tipo Kunitz (KTI do inglês ‘Kunitz tripsina inhibitor’) para promover resistência a cigarrinha marrom do arroz (*Nilaparvata lugens* Stsl, 1854). Os experimentos provocaram a morte de ninfas de *N. lugens* alimentadas com *O. sativa* transformadas.

O efeito inseticida de proteínas do tipo miraculina foi registrado em plantas de *Murraya koenigii* (L.) Sprengel, ao causar a morte de pupas e adultos de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1808) e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775), que se alimentaram de plantas que expressavam uma MLP 39% idêntica à miraculina nativa (GAHLOTH et al., 2011). Plantas de *C. arabica* submetidas a estresse por bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella* Guérin-Ménéville, 1842), apresentaram uma alteração na expressão de uma proteína que foi caracterizada como miraculina e nomeada CoMir (*Coffee Miraculin-like gene*) (MONDEGO et al., 2011).

Em 2017, Albuquerque et al. descreveram a superexpressão de um gene de MLPs na interação incompatível entre raízes de *C. arabica* (acesso resistente UFV408-28) e *M. incognita*, em estágio precoce da infecção, aos 5 e 6 DPI associada a resposta de HR. Nesse estudo, dentre as proteínas que tiveram sua expressão modulada ao estresse por *M. incognita*, o grupo das miraculinas apresentou sua expressão altamente modulada em plantas resistentes.

Apesar das evidências na literatura de que proteínas do tipo miraculinas estão envolvidas na resposta de diferentes plantas a diversos estresses bióticos (insetos, fungos, vírus e nematoides), ainda não está claro o mecanismo de atuação dos membros dessa família gênica no sistema imune vegetal.

Em trabalhos anteriores do grupo, foi feita avaliação histopatológica das pontas de raízes de *C. arabica* (acesso UFV 408-28) com *M. incognita* em diferentes tempos de coleta (2, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 28, 34, e 49 DPI), onde observou-se que 6 DPI como o ponto da infecção em que a planta apresentava maior quantidade de nematoides nas raízes e presença de HR (reação em nível molecular) (ALBUQUERQUE et al., 2010). Em seguida, o estudo da expressão de genes

associados à resposta a nematoides em amostras da fase precoce da infecção (4, 5 e 6 DPI) mostrou maior número de DEGs em 6 DPI, sendo que um gene do tipo miraculina apresentou superexpressão significativa no genótipo resistente inoculado (ALBUQUERQUE et al., 2017). Ainda, foi gerado banco de dados de transcrito dessa interação para estudo comparativo da incompatibilidade com outros patossistemas planta-nematoide (MOTA et al., 2020), onde observou-se diferentes genes tipo miraculina com maiores e menores valores de *foldchange*.

Considerando-se haver apenas um gene do tipo miraculina de cafeeiro suscetível publicado e a disponibilidade de acesso ao transcrito de cafeeiro resistente com a presença de diversos genes preditos de miraculinas, este trabalho visou identificar e validar as expressões gênicas dos candidatos da interação incompatível na fase precoce da infecção.

## 2. OBJETIVOS

### GERAL

Compreender a interação incompatível entre *C. arabica* UFV 408-28 e *M. incognita*, em níveis moleculares, com ênfase na família das miraculinas, visando contribuir para o desenvolvimento de ferramentas para o melhoramento genético de cultivares de cafeeiro para resistência a nematoides.

### ESPECÍFICOS

- Identificar representantes da família de miraculina no transcrito de *C. arabica*;
- Verificar a homologia de *C. arabica* e *C. canephora*;
- Comparar genes de referência com genes de outras plantas;
- Identificar o domínio e outros elementos característicos dos genes de miraculina nas sequências identificadas;
- Fazer a caracterização funcional *in silico* por meio de enriquecimento de GO, expressão diferencial, participação em vias metabólicas (MapMan);
- Validação da expressão gênica por RT-qPCR.

**3. ARTIGO – SUBMETIDO À REVISTA *PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* -  
PMPP**

**Miraculin family genes are implicated in the *Meloidogyne incognita*  
incompatible interaction with resistant *Coffea arabica***

Leonardo Vidal <sup>1,2</sup>, Eliza F. M. B. Nascimento <sup>1</sup>, Priscila Grynberg<sup>1</sup>, Roberto Togawa<sup>1</sup>, Andrea Q. Maranhão<sup>2</sup>, Anne-Sophie Petitot<sup>3</sup>, Diana Fernandez<sup>4</sup>, Érika V. S. Albuquerque <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Genetic Resources & Biotechnology, Brasília 70770-917, Brazil; leonardoamorimvidal@gmail.com (L.V.); lizabellard@gmail.com (E.F.M.B.N.); priscila.grynberg@embrapa.br (P.G.); roberto.togawa@embrapa.br (R.T.); erika.albuquerque@embrapa.br (E.V.S.A)

<sup>2</sup> Universidade de Brasília, UnB, 70910-900, Brazil leonardoamorimvidal@gmail.com (L.V.); andrea.q.maranhao@gmail.com (A.Q.M.)

<sup>3</sup> IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UMR DIADE Univ. Montpellier, IRD, CIRAD, Montpellier, France; anne-sophie.petitot@ird.fr (A.S.P.);

<sup>4</sup> IRD, Institut de Recherche pour le Développement, UMR PHIM (Plant Health Institute), Univ. Montpellier, IRD, CIRAD, INRAE, Institute Agro, Montpellier, France; diana.fernandez@ird.fr (D.F)

\* Correspondence: erika.albuquerque@embrapa.br; Tel.: +55-61-3448-4664

## ABSTRACT

*Meloidogyne incognita* severely affects coffee production; however, the gene actors of the molecular defense mechanism against this important root-knot nematode (RKN) remain to be better studied. To understand the defense mechanism against this pathogen, an RNA sequencing analysis was performed using *M. incognita* inoculated resistant *Coffea arabica* (access UFV408-28) roots during the early-stage response at six days after inoculation. Among the differentially expressed genes (DEGs), thirty-two putative miraculin genes showing a strong amplitude response to the biotic stress caused by the pathogen. The genes classified via Gene Ontology (GO) analysis demonstrated that the endopeptidase inhibitor activity, where miraculins are allocated, was the most significantly up-regulated group. MapMan analyses showed that cell wall and hormone signaling pathways are mainly repressed, while the Pathogen related (PR) genes, including miraculins, were both over and under expressed. Comparison with reference genes revealed the phylogenetic relation of seven miraculin genes that grouped separately. Finally, functional validation by RT-qPCR confirmed the modulation of miraculins in response to *M. incognita* inoculation. Taken together, our analyses provide valuable information of the plant host defense against *M. incognita* and bring insights for coffee breeding to enhance resistance against this pathogen. Miraculin genes as a part of the plant's defense response to the challenge of *M. incognita* and maybe other RKNs.

**Keywords:** differential expression, immune response, plant-pathogen interaction, RT-qPCR, root-knot nematode, transcriptome.



## INTRODUCTION

Coffee is one of the most consumed beverages in the world by a large part of population, as evidenced by the forecast for coffee production in 2023/24 is 171.4 million bags (60 kilograms), led by Brazil (66,3 million bags), Vietnam (27,5 million bags) and Colombia (11,5 million bags) [1].

In Neotropical countries, *i.e.* the realm comprising the tropical terrestrial ecoregions of the Americas and the entire South America [2]. The main producers of coffee (*Coffea* spp.) are mostly affected by pathogens and pests like the nematodes from the *Meloidogyne* genus, known as root-knot nematodes (RKN). To aggravate this threat to the coffee (*Coffea arabica* L.) production, conventional chemical control of RKN raises the production costs and threatens the environment, human health, and product quality [3].

Among RKN species that infect coffee plants worldwide, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Chitwood, 1949) is considered the most aggressive and damaging species [4]. Coffee fields infected by *M. incognita* present a high rate of plant mortality and severe vigor due to pathogen aggressiveness to the roots [5].

Persistent in tropical soils for more than a year, RKN eggs hatch to deliver infective juvenile larva of the second stage (J2) [6]. As obligate endoparasites, the J2 seek the host roots to penetrate the subapical region and establish their feeding sites [5]. Virulence effectors are injected through the RKN stylet to induce the formation of giant and multinucleated cells [7,8] that results in the formation of galls and, consequently, thickening, necrosis, and cracking of the infected roots [5]. The damage results in low water and nutrient absorption by the roots, which results in less vigor and reduced plant growth [5].

Effector-triggered immunity (ETI) is an important defense mechanism of plants triggered by the recognition of the virulence effectors injected by the pathogen, which most of the time results in cell death at the infection site, known as the hypersensitive cell death response (HR) [9]. When occurring at early infection times, HR effects may hinder nematode penetration and migration. At later stages of the infection cycle, it can prevent the formation of the feeding site and the development of the adult form and/or new eggs [10].

The analysis of the relative expression of genes in plant-pathogen interactions is important to decrypt the metabolic pathways implicated in HR and ETI at the plant immune response [11,12]. Gene regulation studies have added knowledge to plant physiology and made possible the exploration and development of different approaches and strategies to control pathogens [11].

In this context, the Miraculin-like proteins (MLPs) gene family was linked to the plant responses to biotic stresses [13]. The Miraculin protein originally found in the West African berry *Synsepalum dulcificum* (Schum. et Thonn.) Daniell has the remarkable ability to modify taste perception in humans. When consumed, Miraculin temporarily alters taste receptors on the tongue, causing sour or acidic foods to taste sweet. This phenomenon has led to the *S. dulcificum* berry being dubbed the “miracle fruit”.

MLPs exhibit significant sequence identity to the *S. dulcificum* miraculin protein. MLPs are glycoproteins of the Soybean Kunitz-type proteinase inhibitor (PI) superfamily that have trypsin-inhibiting activity to limit cell damage related to cell stress, including biotic stress. Besides the Kunitz family domain, the peculiarity of MLPs is the presence of six conserved cysteines in the N-terminal portion, that allows the formation of three disulfide bridges [14].

Several studies showed that MLPs are able of inhibiting the proteolytic activity of various pests and pathogens [13,15–17]. In tomato (*Solanum lycopersicum* L.), *M. javanica* (Treb) Chitwood induced the expression of a gene 54% identical to the *S. dulcificum* miraculin and also induced the secretion by root tips of the tomato miraculin (LeMir) at an early infection time [18]. Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) inoculated with tobacco mosaic virus (TMV)-based expression vector displayed an HR and one specific clone has demonstrated that Kunitz type trypsin inhibitors may act as a positive regulator and triggers a necrotic response most similar to a normal HR [19]. Japonica rice (*Oryza sativa* L.) transformed with a soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) gene showed toxicity towards the brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stål) and reduced the damage caused by this insect herbivory [20].

In coffee plants (*C. arabica*), a MLP named CoMir was upregulated during the incompatible interaction with the coffee leaf miner (CLM) (*Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville)) [21]. In our previous study on the incompatible interaction of coffee (*C. arabica* resistant accession UFV408-28) with *M. incognita*, a significant increase of a CoMir-related MLP gene expression was observed at six days post-infection (DPI) associated to the onset of HR-like cell death at nematode infection sites [22].

In this study, we analyzed the whole transcriptome of *C. arabica* accession UFV 408-28 roots generated during the incompatible interaction with *M. incognita* to assess the differential expression of coffee MLP family members in response to RKN infection.

## MATERIAL AND METHODS

### Biological material

The *C. arabica* accession UFV408-28 resistant (R) to *M. incognita* race I used in this study was maintained in a controlled greenhouse at IRD (France) and inoculated as previously described in Albuquerque et al., 2010. For the specific study of MLP gene expression analysis by RT-qPCR, root samples from 5 plants inoculated (I) or Non inoculated (NI) were collected at 6 DPI, pooled, and used for total RNA extraction and cDNA obtaining as described in Albuquerque et al., 2017. Three independent biological experiments were conducted with 10 plants per experiment for each group.

### Transcriptome assembly

The whole transcriptomic analysis in this study was generated from total RNA prepared from the biological samples of our previous work [22]. The RNA-Seq libraries were constructed from three NI and three I, 6 DPI- cDNA samples and were sequenced using Illumina HiSeq-2500 technology, paired-end reads up to 100 pb at the Roy J. Carver Biotechnology Center, (University of Illinois, Urbana-Champaign, USA). Trimmomatic (version 0.39) [24] was used for quality control (leading:3, trailing:3, slidingwindow:4:15 and minlen:36). Clean sequences were mapped to *C. canephora* Pierre ex Froehner genome version v1.0 [25] with the genome-guided program Star (version 2.5.2b) [26] and submitted to the NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under BioProject accession number PRJNA796786. HTSeq-count (version 0.90) [27] was used for sequences counting (parameters: -s no -r pos -t gene -m union -i <Name>) using the *C. canephora* gff3 file. Trinity v.2.5.0 genome guided mode [28] and EvidentialGene tr2aacds.pl pipeline script was used for transcriptome assembly [29]. The algorithm BLASTn was applied for transcriptome annotation, using the annotated coffee genome as a database (<https://coffee-genome-hub.southgreen.fr/>).

The similarity of samples was explored with principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering, both unsupervised methods. We intended to check if sample replicates clustered together and confirm if nematode inoculation is responsible for the major source of variation. To do so, log<sub>2</sub>-transformed normalized counts calculated by the DESeq2 rlog command [30] were used to produce a sample distance matrix, which was loaded at ClustVis web tool [31] to produce the figures. EdgeR [32] genewise negative binomial generalized linear models with quasi-likelihood tests (glmQLFit) was used to produce the differential gene expression tables between samples. A false discovery rate (FDR) cutoff of 0.05 was set. Induced and repressed genes were used, separately, for gene ontology (GO) enrichment analysis with a

hypergeometric distribution test implemented by FUNC software [33]. An FDR cutoff of 0.05 was also set for this analysis. Bubble and volcano plots were created using the ggplot2 R package [34].

### **Functional analysis**

A functional analysis was performed using PFAM annotation software (version 35.0) [35] and GO enrichment terms (version 4.0) [36]. The redundant terms were removed using AmiGO2 and Revigo [37]. MapMan ontology analyses was performed on the differentially expressed genes (DEGs) in resistant coffee plants infected by *M. incognita* with MapMan application software v3.6 (<https://mapman.gabipd.org/>) [38].

### **Phylogeny analysis**

*C. arabica* MLP were identified at RNA-Seq data, and the protein sequences were retrieved from the Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>). The search for the conserved Kunitz signature motif [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] and conserved cysteines (C), that characterize the miraculin family at protein sequences, was performed at Geneious® 8 software (version 8.0.5) [14]. The *C. arabica* sequences that presented the characteristics required (named CaMir) were aligned with *C. canephora* MLP sequences (CcMir) and other reference sequences from other plant species pulled out from the literature (supplementary table 1) [14]. Because MLPs are secreted proteins, the putative signal sequence was searched with SignalP. Sequences without signal peptide were aligned using the Geneious®8 alignment algorithm. The alignment was used to construct the maximum likelihood (ML) dendrogram with 1000 times bootstrap [39].

### **Functional validation by RT-qPCR**

Each sequence was aligned using BLAST at the RNA-Seq restricted data base to acquire the coding sequence of that specific miraculin candidate at *C. arabica*. Specific primers were designed to amplify the MLP selected sequences by RT-qPCR using the following parameters: 60 °C ± 3 °C melting temperature (T<sub>m</sub>), 18 - 27 pb primer length, and 100-600 pb amplicon length (supplementary table 2) at the *Primer3Plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) [40] and synthesized by Invitrogen®. Primers were used at 200 nM with the GoTaq® RT-qPCR Master Mix (Promega®), according to the following steps, 95 °C for 2 minutes to activate the enzyme, followed by 40 amplification cycles of 15 seconds at 95 °C and 1 minute at 58 °C, lastly the samples were submitted to the denaturation curve [41].

The RT-qPCR reactions were performed with the Applied 7500-Fast machine from Applied Biosystems®. The amplification data were validated using LinRegPCR, removing

possible bias from the sample data [42]. For all primer pairs tested, efficiencies varied from 1.8 to 2.0 (data not shown). Primers specificity were checked by the presence of a single sequence-specific peak in the amplicon dissociation curve. In addition, the sequences of amplicons from MLP candidate reactions were checked after Sanger sequencing at Genewiz (Steißlingen, Germany).

The differential gene expression between I and NI plants was measured by the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) [43] using the Ubiquitin 9 as the reference gene [44].

## RESULTS

### RNA-Seq quality, assembly and genome mapping

From 395,690,722 reads, we recovered more than 90% of high-quality reads (386,475,596) that were uniquely mapped to *C. canephora* genome version v1.0. We obtained 25,677 transcripts, of which 21,850 (85,1%) were annotated after blasting the sequences against the coffee genome. 17,869 (69,6%) and 13,137 (51,2%) transcripts were annotated with 3,766 PFAM (Figure 1A) and 1,166 GO terms (Figure 1B).

The similarity between biological replicates was confirmed by unsupervised clustering methods (supplementary figure 01). Control and inoculated samples formed two distinct groups. Such results indicate the reproducibility of the samples, and that inoculation was an important factor in differentiating the groups. We found 2,560 differentially expressed genes (DEGs) in response to nematode inoculation 2,000 down regulated and 560 up regulated.

The GO enrichment analysis revealed that genes associated with the microtubule motor activity are highly down regulated ( $-\text{Log}_{10}(\text{FDR}) = -18,77$ ) after nematode inoculation and transcripts associated with DNA replication are strongly down regulated ( $-\text{Log}_{10}(\text{FDR}) = -6,23$ ). On the other hand, endopeptidase inhibitor activities are strongly up regulated ( $-\text{Log}_{10}(\text{FDR}) = 10,98$ ) (Figure. 1C). Miraculins are proteins part of the endopeptidase inhibitor group that was strongly upregulated at *in silico* analyses, as shown at the volcano plot (Figure 2) ( $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0.05$ ).

1

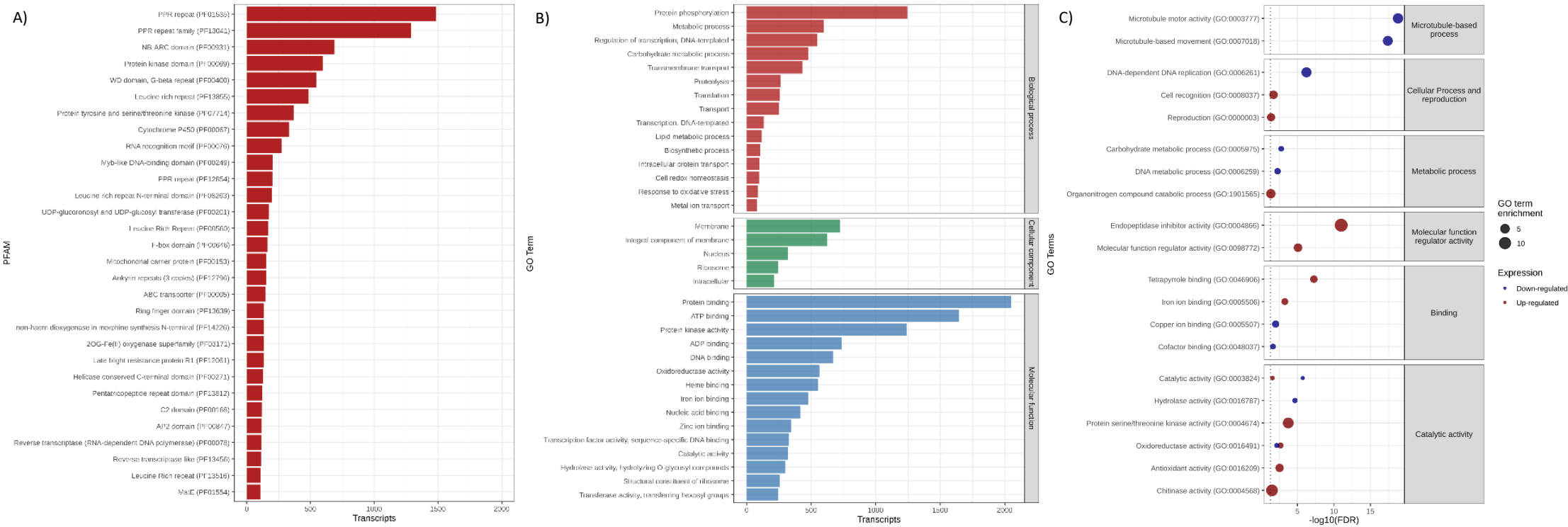


Figure 1 - Functional annotation of *C. arabica* transcripts. A) Top 30 PFAM domains; B) Top 15 Biological Processes and Molecular Functions and top five Cellular Component GO terms; C) GO enrichment analysis. Blue bubbles represent GO-enriched terms in the non-inoculated samples. Red bubbles represent GO-enriched terms in the inoculated samples. Bubble sizes are related to GO enrichment fold values. The X-axis represents the transformed **FDR** values. The dotted line marks the statistics threshold of  $FDR < 0.05$ . Specific GO terms are grouped into more general ones.

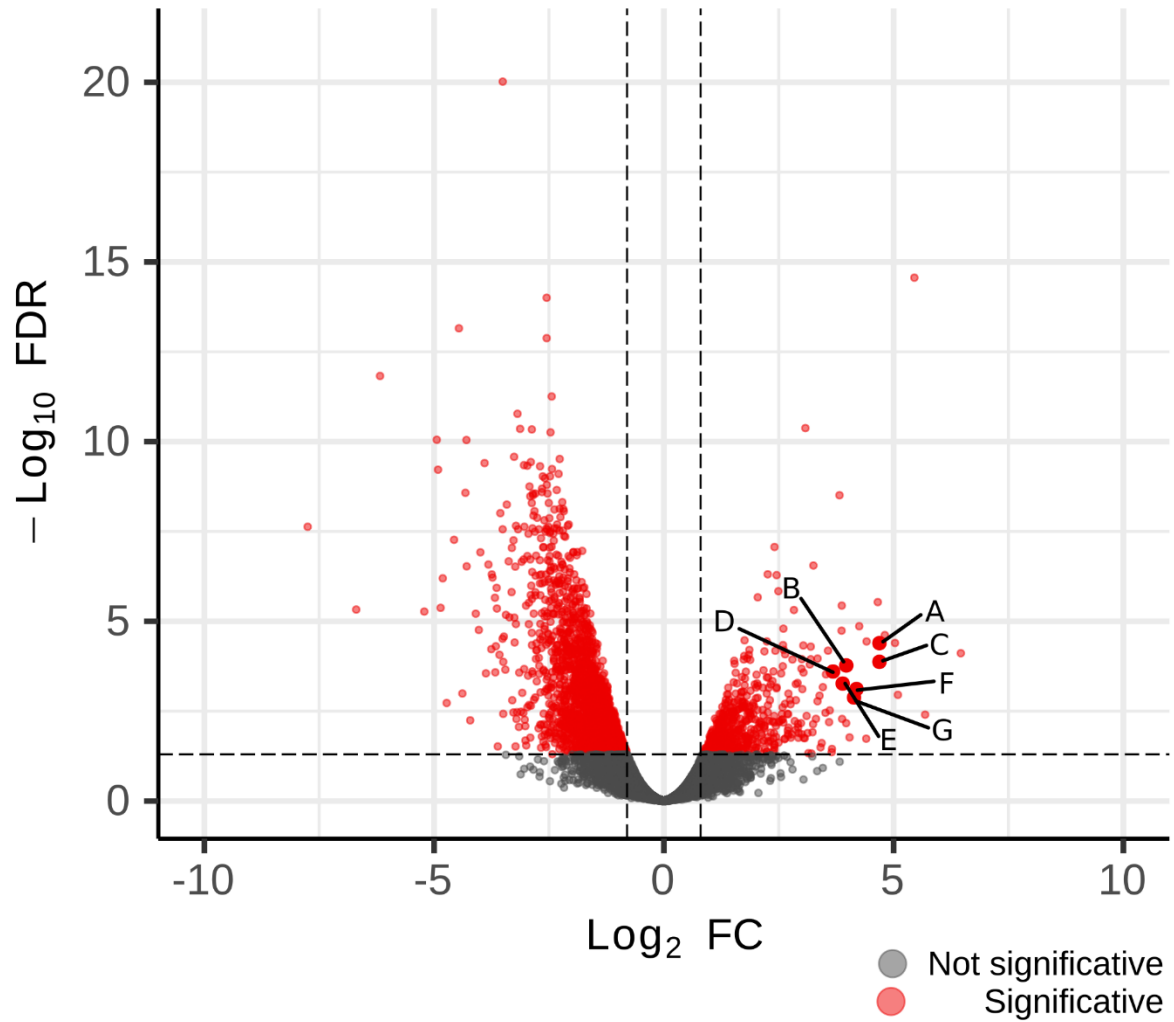


Figure 2 - Volcano plot: Red dots represented differentially expressed genes (DEGs) ( $|\text{log}_2\text{FC}| \geq 1$ ;  $\text{FDR} < 0.05$ ). A to G highlights miraculin DEGs.



## Functional analysis

All the DEGs were mapped to terms in the MapMan database looking for significantly enriched pathway terms during infection (Figure 3). MLP candidate genes were mapped as pathogen-related genes (PR-genes) in the defense genes category, this category has shown both behaviors, down and up regulation in RKN presence, this profile was also confirmed by functional analysis via RT-qPCR. Auxins, brassinosteroid, cell wall and beta glucanase showed strong repression at the presence of the nematode at root tips.

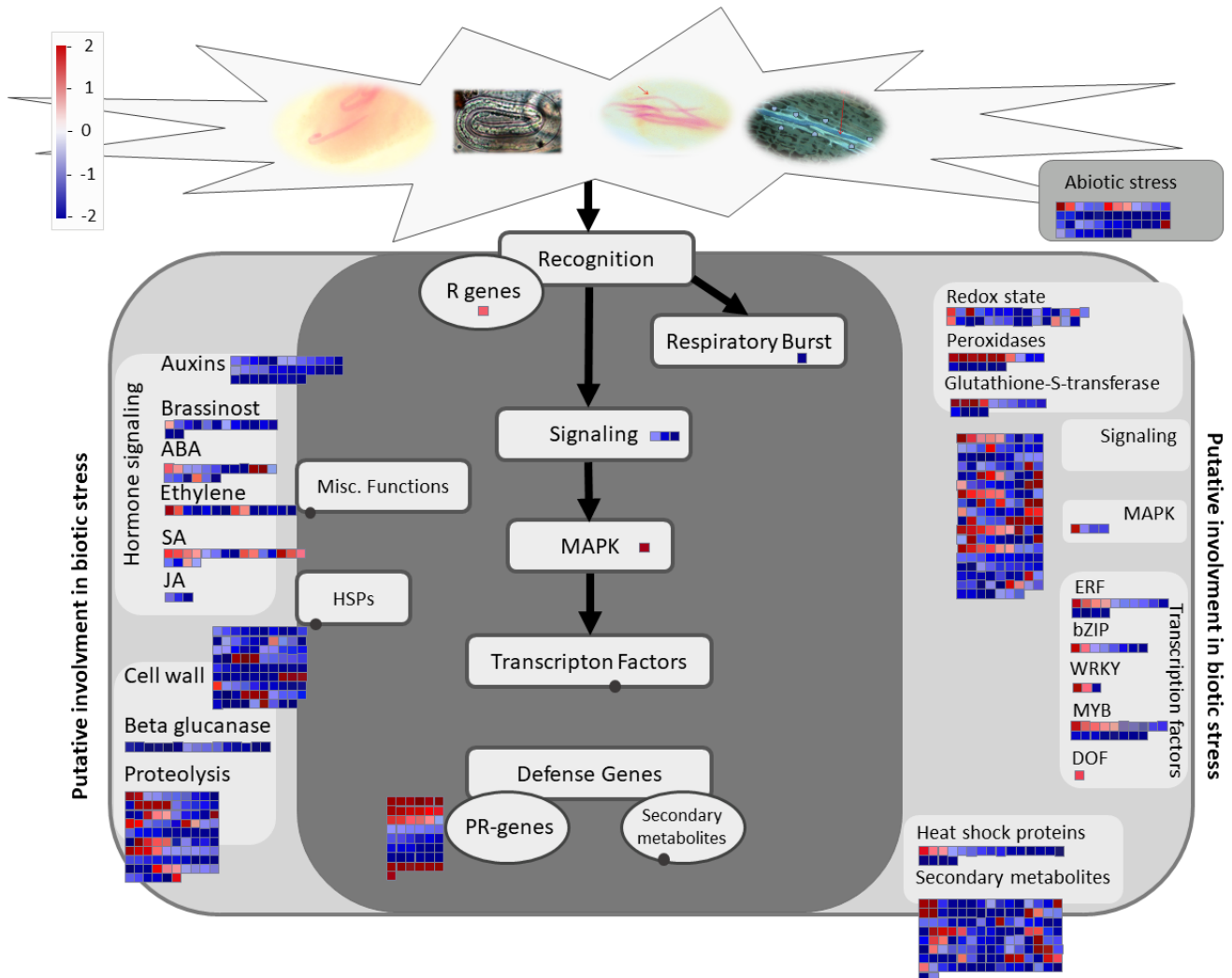


Figure 3 – MapMan showing all DEGs between Upregulated (red) and Downregulated (blue) R plants at 6 DPI. Individual genes are represented by small squares. The color key represents reads per kb per million reads (RPKM) normalized log<sub>2</sub> transformed counts. Red represents up-regulation and dark blue represents downregulation when compared to basal expression. The miraculin genes were assigned as PR-genes.

## Phylogenetic analysis

Search for the different putative protein members of the MLP family in the *C. arabica* transcriptome generated for this study and other available sequences at NCBI resulted in 7 different proteins (CaMir) that harbored the conserved Kunitz signature motif [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] (Figure 4A), and 6 conserved cysteines (Figure 4B) [14]. In addition, we retrieved seven homologous MLP genes sequences (CcMir) from the *C. canephora* genome. Signal P helped identifying putative peptide signal sequence for each MLP selected. Multiple alignment of the N-terminal part (without signal peptide) of the seven identified *C. arabica* MLP sequences (CaMir) with other MLP genes from *C. canephora* (CcMir) and MLP and other kunitz-like or trypsin inhibitor reference genes from seven other species: *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *N. tabacum*, *S. lycopersicum*, *S. palustre* Schltdl., *Theobroma bicolor* L., *Glycine max* (L.) Merrill is presented in Figure 4.

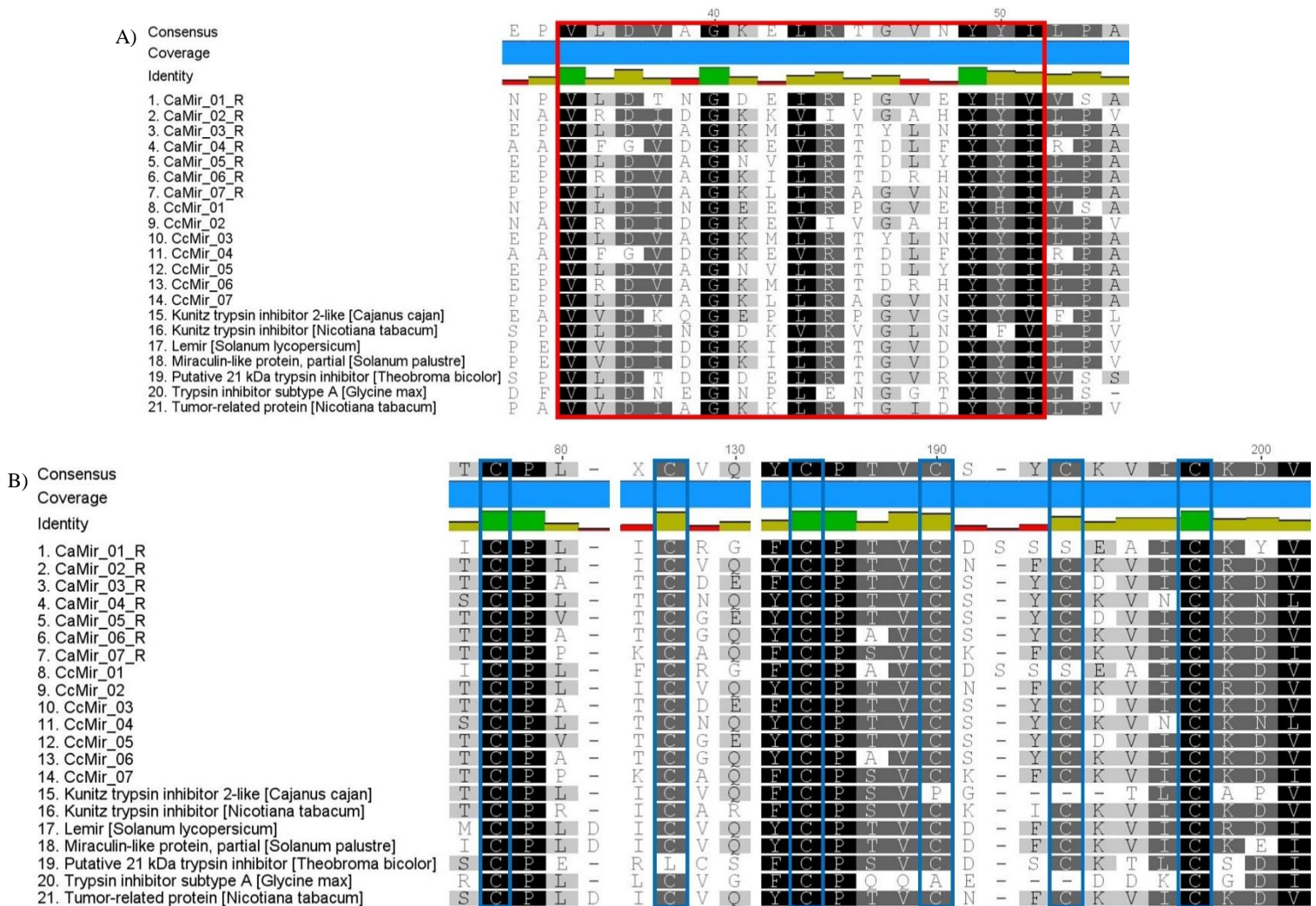


Figure 4 – Multiple amino-acid sequence alignment of the N-terminal part (without signal peptide) of selected *C. arabica* MLP sequences (CaMir) with other MLP genes from *C. canephora* (CcMir) and MLP reference genes from seven other species. The grey scale represents the similarity level of the sequences at that specific position, the closer to black more sequences present the same amino acid, and the closer to white the fewer sequences

present that same amino acid. A) Highlighted in the red box is the Kunitz motif characteristic from the MLP family. B) Highlighted in blue boxes are the positions of the conserved cysteines. These two characteristics are the main characteristics of the miraculin family.

Although the alignment generated a consensus sequence, there were a few positions that have shown some differences from the expected variation. At the domain, the third position (Asp37) was supposed to be an Aspartic acid, but CaMir 4 and CcMir 4 presented a Glycine instead. At the fifth position of the domain (Glu, Asp, Asn, Thr, Tyr -39), it was expected that most of the sequences presented Glutamic acid, Aspartic acid, Asparagine, Threonine or a Tyrosine, however the consensus was Alanine, mostly presented by coffee sequences (CaMir 3, 5, 6, 7 and CcMir 3, 5, 6, 7) (Figure 4A), although one of the reference genes (Tumor-related protein [*N. tabacum*]) presented Alanine.

Whilst the cysteines, the putative 21 kDa trypsin inhibitor of *T. bicolor* does not present the second cysteine, the Kunitz trypsin inhibitor two sequences from *C. cajan* and the Trypsin inhibitor subtype A of *G. max* do not show the fourth or the fifth cysteine (Figure 4B).

The fifth cysteine is also missing at the CaMir 1 and CcMir 1 (Figure 4B). From the alignment was possible to design the dendrogram (Figure 5) demonstrating the distance between the selected genes and the reference genes. The dendrogram also showed the grouping of the sequences of *C. arabica* (CaMir) and *C. canephora* (CcMir).

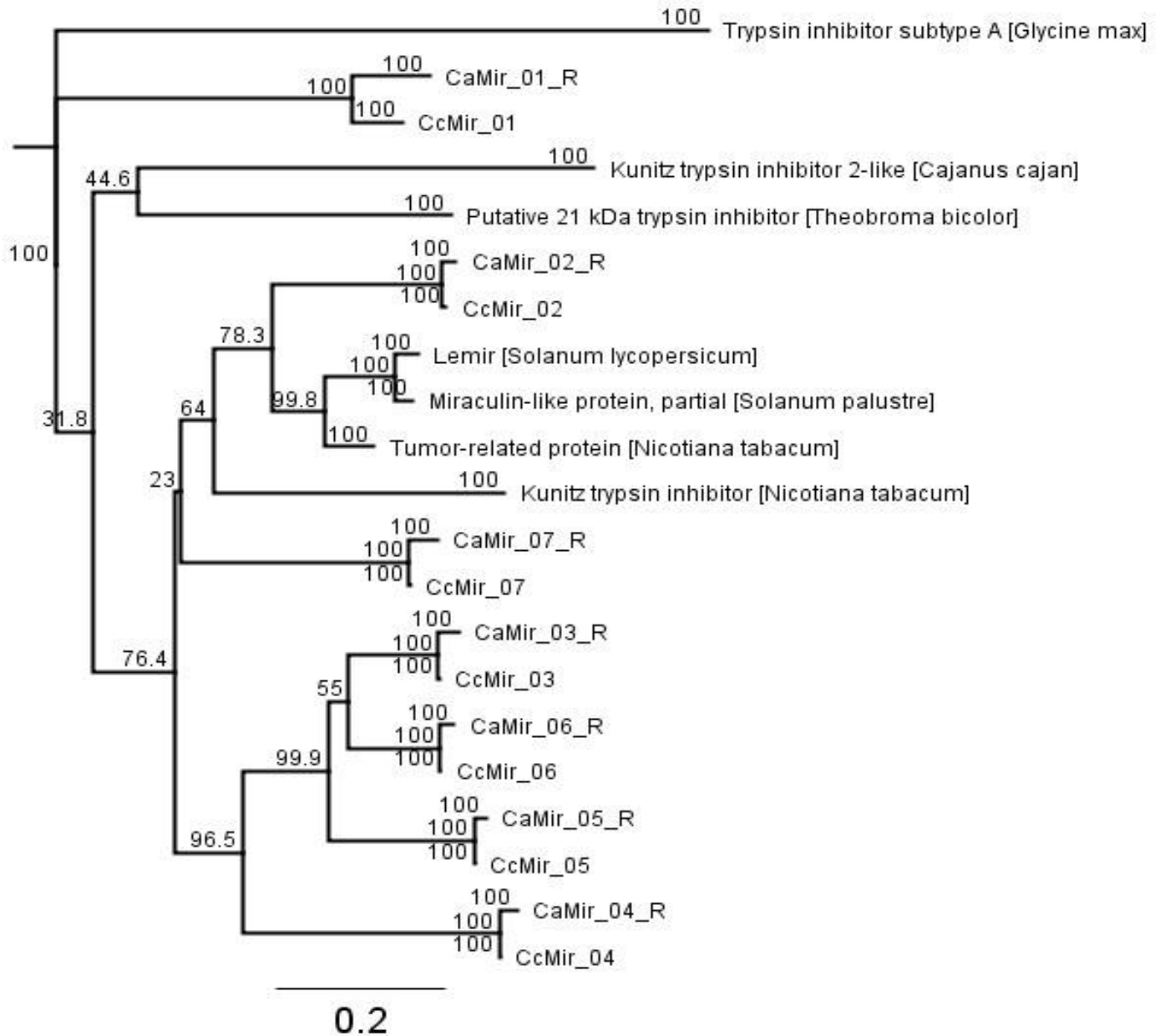


Figure 5 - Dendrogram reconstructed by maximum likelihood (ML) analysis based on the alignment of the selected sequences from *C. arabica* (CaMir) with other miraculin genes from *C. canephora* (CcMir) and reference genes from other species, numbers upon branches are assessed by ML 1000 bootstrap.

### Differential expression

The selected genes were analyzed according to the gene expression *via*  $-\Delta\Delta\text{CT}$  using Ubiquitin 9 (UBI9) as the constitutive reference gene. The analyzed genes presented two different gene expression patterns (Figure 6). CaMir 01, CaMir 03 and CaMir 05 had their expression upregulated about five times, and the second gene expression pattern was the downregulation of the genes CaMir 02 and CaMir 04, about 3,32 times to the CaMir 02 and 4,99 times to the CaMir 04.

The amplicons were sequenced by Sanger sequencing by Genewiz (Steißlingen, Germany) validating the transcriptome.

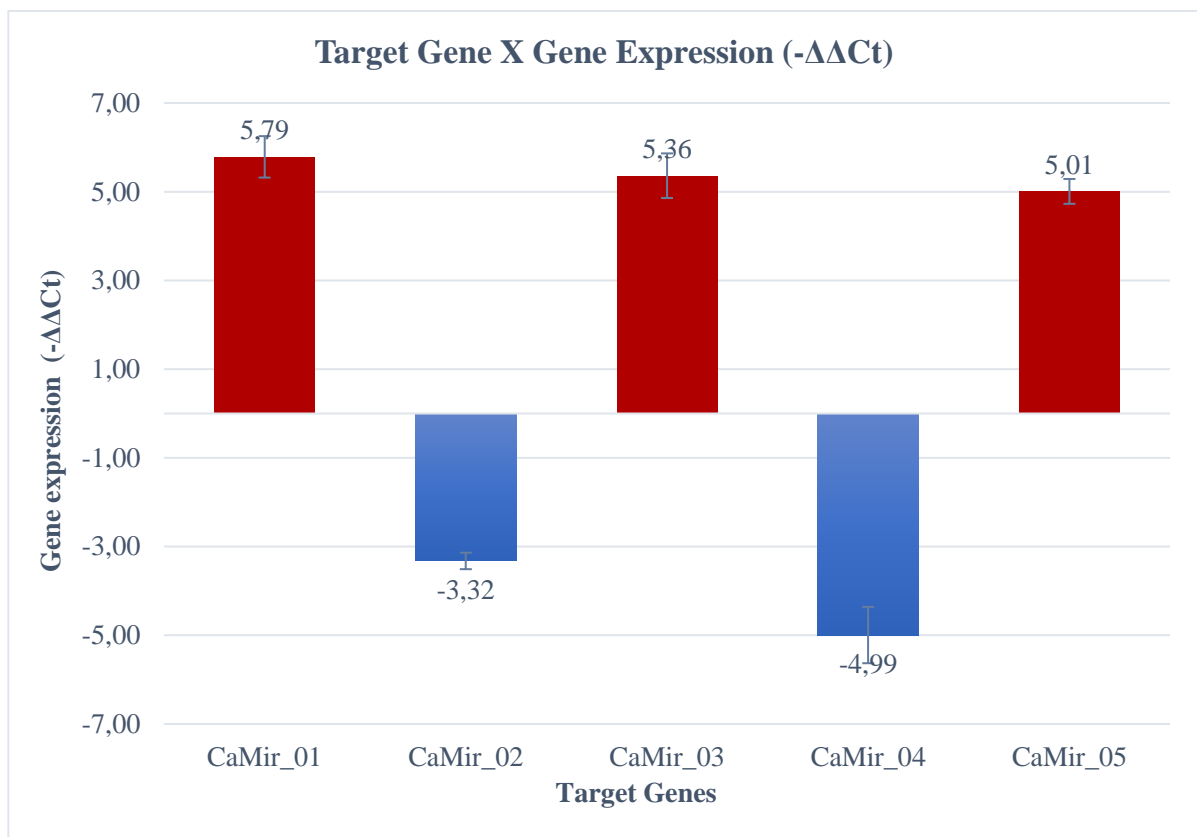


Figure 6 – Graphical representation of the gene expression in the first biological experiment with R plants at 6 DPI. The gene expression was compared to a constitutive gene (UBI9), and then compared with the plants NI vs. I. The interaction *C. arabica* RKN generated two different expression profiles: the first, on CaMir 01 and CaMir 03 and CaMir 05 (red bars) evidencing a super expression of the genes and the second profile, CaMir 02 and CaMir 04 (blue bars) evidencing the subexpression of the genes. All experiments followed the same line of modulation in gene expression.

## DISCUSSION

Miraculin has the ability to transform flavour, it is deeply involved in plant immune response to biotic stresses. We studied some miraculin candidates at an incompatible interaction that involves the resistant access UFV 408-28 of *C. arabica* and the nematode *M. incognita*. This interaction deregulates a series of genes to provide the resistance phenotype its characteristics that it requires [23].

The most common PFAM domains at the transcriptome generated from the incompatible interaction between *C. arabica* and RKN were the PPR repeat (PF01535) and the PPR repeat family (PF13041). The third most common protein domain found was NB-ARC (PF00931). GO annotation showed that coffee transcripts act strongly on protein, nucleotide, ion and heterocyclic compound binding. Some catalytic activities, such as protein kinase and oxidoreductase activities are GO terms very frequent as well.

GO annotation has also annotated several modifications in the expression of Kunitz-like genes including many miraculin-like genes. This family of genes has been called attention because these genes have been reported to be related to some interactions between coffee plants and biotic stresses such as coffee rust (*Hemileia vastatrix*) (unpublished information), and CLM [45], and many other plant biotic stresses such as at the *M. javanica* in tomato (*S. lycopersicum* L.) [18], genetic modified rice (*O. sativa*) to respond to brown plant hopper (*N. lugens* Stål) [20].

At the alignment, the studied sequences presented high similarity to the ones already deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) as miraculin in other species, including at *C. canephora*, demonstrating that these candidates can be related to the *C. arabica* parental subgenome from *C. canephora*.

Some of the sequences presented a few differences at the domain and at the cysteines, two of the most important characteristics of the miraculin family. At the reference genes, those differences were expected because not all of them were miraculins, some were Kunitz proteins and other were trypsin inhibitor, only. The coffee sequences that presented differences can present that as an artifact of the sequence but those differences were not enough to do not characterize as miraculin family member.

The grouping of the sequences at the dendrogram (Figure 5) has shown that miraculin from *C. arabica* and miraculins from *C. canephora* are close related when compared with other plant taxa even the closest ones like LeMir (miraculin of *S. lycopersicum*). Each *C. arabica*

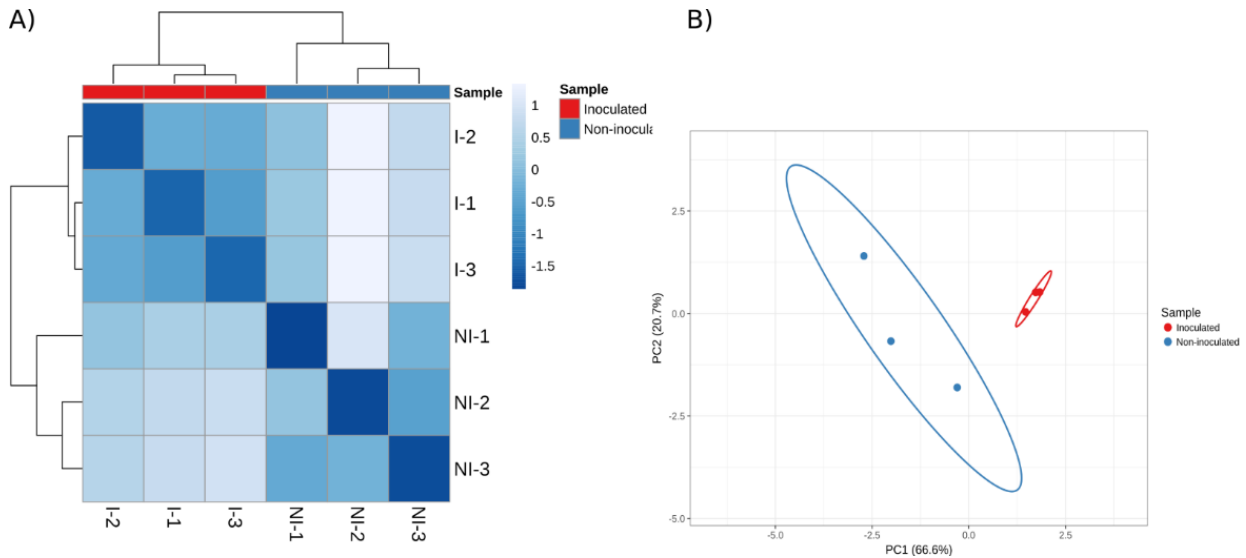
miraculin candidate grouped with one *C. canephora*. The parental relation between *C. canephora* (parental) and *C. arabica* (hybrid) [46] is a possible explanation to this proximity at the dendrogram.

The high repression of the hormone pathways can such as auxins, brassinosteroids is closely related to the plant immune response to biotic stress generated by the nematode (Figure 3) [47]. In particular the repression of the genes related to cell wall can be closely related to the infection by the nematode because its feeding site is formed by the giant and multinucleated cells, that is arising from the non-division of the cells induced by *M. incognita* at the root [7,8].

The plant-pathogen interaction generated a modulation in the expression of the analyzed genes. This interaction generated two different behaviors (Figure 6), the first observed behavior was the induction of the expression of the genes CaMir 01, CaMir 03 and CaMir 05, and the second behavior was the repression of the genes CaMir 02 and CaMir 04. These two behaviors can be explained because these genes are members of a family [48].

The study of genes belonging to the miraculin family, with the aid of the transcriptome generated from the interaction between *C. arabica* and *M. incognita*, is an interesting strategy to analyze the differential expression of these genes related to the immune response of coffee. In addition to being a tool that will help the elaboration of different strategies and approaches for the control of this important pathogen.

Natural resistance is a very challenging resistance mode to be applied because it is a gene-to-gene resistance. UFV408-28 plants possess this very particular ability via a very good and precise mode of resistance, the HR-like [23]. HR is triggered by ETI that is started by the detection of the pathogen effectors, and it is possible due to the presence of the R gene in the plant genome, this is one of the most complex resistance modes in plants because of the number of molecules evolved at the process [9]. MLPs are some of the molecules involved in many immune system responses from a variety of different plants, most of them involving ETI [11].



Supplementary Figure 1 – Biological replicate samples analysis. A) Hierarchical clustering. Rows are centered; unit variance scaling is applied to rows. Both rows and columns are clustered using correlation distance and average linkage. B) Principal component analysis. Unit variance scaling is applied to rows; SVD with imputation is used to calculate principal components. X and Y axis show principal component 1 and principal component 2 that explain 66.6% and 20.7% of the total variance, respectively. Prediction ellipses are such that with probability 0.95, a new observation from the same group will fall inside the ellipse. (Figure produced by ClustVis).

**Supplementary Materials:** The following are available online at xxx

**Author Contributions:** Conceptualization, É.V.S.A.; writing original draft preparation, L.A.V., E.F.M.B.N., D.F. and É.V.S.A.; writing review and editing, L.A.V., E.F.M.B.N., and É.V.S.A.; supervision, D.F. and É.V.S.A.; project administration, É.V.S.A.; funding acquisition, É.V.S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This original article was funded by Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café — CBP&D/Café and Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, grant number 10.18.20.004.00.00. The fellowships of LAV and EFMBN were funded by Fundação de Apoio à Pesquisa—FUNAPE.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable?

**Informed Consent Statement:** Not applicable?

**Data Availability Statement:** Not applicable?

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## REFERENCES



- [1] U.S.D. of A.F.A.S. USDA-FAS, Coffee: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service, Washington, DC, Estados Unidos, 2023.  
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf> (accessed December 28, 2023).
- [2] J. Dantas, I.O. Motta, L.A. Vidal, E.F.M.B. Nascimento, J. Bilio, J.M. Pupe, A. Veiga, C. Carvalho, R.B. Lopes, T.L. Rocha, L.P. Silva, J.R. Pujol-Luz, É.V.S. Albuquerque, A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)—A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries, *Insects* 12 (2021) 1130. <https://doi.org/10.3390/insects12121130>.
- [3] N. Fitoussi, E. Borrego, M.V. Kolomiets, X. Qing, P. Bucki, N. Sela, E. Belausov, S. Braun Miyara, Oxylinins are implicated as communication signals in tomato–root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) interaction, *Sci Rep* 11 (2021) 326.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79432-6>.
- [4] M.F.A. Santos, C. Furlanetto, M.R.A. Almeida, M.D.G. Carneiro, F.C. Mota, A.C.M.M. Gomes, N.O.R. Silveira, J.G.P. Silva, P. Castagnone-Sereno, M.S. Tigano, R.M.D.G. Carneiro, Biometrical, biological, biochemical and molecular characteristics of *Meloidogyne incognita* isolates and related species, *Eur J Plant Pathol* 134 (2012) 671–684.  
<https://doi.org/10.1007/s10658-012-0018-1>.
- [5] S.M.L. Salgado, W.C. Terra, The root-knot nematode: importance and impact on coffee in Brazil., *Integrated Nematode Management: State-of-the-Art and Visions for the Future* (2021) 238–244. <https://doi.org/10.1079/9781789247541.0033>.
- [6] J.N. Sasser, C.C. Carter, *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II: Methodology*, Raleigh, North Carolina, 1985.
- [7] P. Abad, B. Favery, M.N. Rosso, P. Castagnone-Sereno, Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction, *Molecular Plant Pathology* 4 (2003) 217–224.
- [8] J. de Almeida Engler, V. De Vleeschauwer, S. Burssens, J.L. Celenza Jr., D. Inzé, M. Van Montagu, G. Engler, G. Gheysen, Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia, *The Plant Cell* 11 (1999) 793–807. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.793>.
- [9] B.P.M. Ngou, P. Ding, J.D.G. Jones, Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system, *The Plant Cell* 34 (2022) 1447–1478.  
<https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>.
- [10] K. Sato, Y. Kadota, K. Shirasu, Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes, *Frontiers in Plant Science* 10 (2019).  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01165> (accessed December 27, 2023).
- [11] J. Ling, Z. Mao, M. Zhai, F. Zeng, Y. Yang, B. Xie, Transcriptome profiling of *Cucumis metuliferus* infected by *Meloidogyne incognita* provides new insights into putative defense regulatory network in Cucurbitaceae, *Sci Rep* 7 (2017) 3544.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03563-6>.

- [12] J. Zhu, A. Moreno-Pérez, G. Coaker, Understanding plant pathogen interactions using spatial and single-cell technologies, *Commun Biol* 6 (2023) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05156-8>.
- [13] S. Tsukuda, K. Gomi, H. Yamamoto, K. Akimitsu, Characterization of cDNAs Encoding Two Distinct Miraculin-like Proteins and Stress-related Modulation of the Corresponding mRNAs in Citrus jambhiri Lush, *Plant Molecular Biology* 60 (2006) 125–136. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2941-4>.
- [14] P. Selvakumar, D. Gahloth, P.P.S. Tomar, N. Sharma, A.K. Sharma, Molecular evolution of miraculin-like proteins in soybean Kunitz super-family, *J Mol Evol* 73 (2011) 369–379. <https://doi.org/10.1007/s00239-012-9484-5>.
- [15] G.C. Conant, K.H. Wolfe, Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions, *Nature Reviews Genetics* 9 (2008) 938–950. <https://doi.org/10.1038/nrg2482>.
- [16] D. Gahloth, U. Shukla, A. Birah, G.P. Gupta, P.A. Kumar, H.S. Dhaliwal, A.K. Sharma, Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculin-like protein against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 78 (2011) 132–144. <https://doi.org/10.1002/arch.20448>.
- [17] C.A. Ryan, Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens, *Annual Review of Phytopathology* 28 (1990) 425–449.
- [18] E.D. Brenner, K.N. Lambert, I. Kaloshian, V.M. Williamson, Characterization of LeMir, a Root-Knot Nematode-Induced Gene in Tomato with an Encoded Product Secreted from the Root, *Plant Physiology* 118 (1998) 237–247. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.237>.
- [19] E.E. Karrer, R.N. Beachy, C.A. Holt, Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response, *Plant Mol Biol* 36 (1998) 681–690. <https://doi.org/10.1023/A:1005949304445>.
- [20] S. In Lee, S.-H. Lee, J. Choon Koo, H. Jin Chun, C.O. Lim, J. Hee Mun, Y. Han Song, M. Je Cho, Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice, *Molecular Breeding* 5 (1999) 1–9. <https://doi.org/10.1023/A:1009660712382>.
- [21] J.M.C. Mondego, O. Guerreiro-Filho, M.H. Bengtson, R.D. Drummond, J.D. Felix, M.P. Duarte, D. Ramiro, M.P. Maluf, M.C. Sogayar, M. Menossi, Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation, *Plant Sci.* 169 (2005) 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.020>.
- [22] E.V.S. Albuquerque, A.-S. Petitot, J.P. da Silva, M.F. Grossi-de-Sa, D. Fernandez, Early responses of coffee immunity-related genes to root-knot nematode infection, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100 (2017) 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.09.001>.
- [23] E.V.S. Albuquerque, R.M.D.G. Carneiro, P.M. Costa, A.C.M.M. Gomes, M. Santos, A.A. Pereira, M. Nicole, D. Fernandez, M.F. Grossi-de-Sa, Resistance to Meloidogyne incognita expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*, *Eur J Plant Pathol* 127 (2010) 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9603-3>.

- [24] H.J. Kang, Y.I. Kawasawa, F. Cheng, Y. Zhu, X. Xu, M. Li, A.M.M. Sousa, M. Pletikos, K.A. Meyer, G. Sedmak, T. Guennel, Y. Shin, M.B. Johnson, Ž. Krsnik, S. Mayer, S. Fertuzinhos, S. Umlauf, S.N. Lisgo, A. Vortmeyer, D.R. Weinberger, S. Mane, T.M. Hyde, A. Huttner, M. Reimers, J.E. Kleinman, N. Šestan, Spatio-temporal transcriptome of the human brain, *Nature* 478 (2011) 483–489. <https://doi.org/10.1038/nature10523>.
- [25] F. Denoeud, L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, C. Zheng, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J.-M. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M.-C. Combes, D. Crouzillat, C. Da Silva, L. Daddiego, F. De Bellis, S. Dussert, O. Garsmeur, T. Gayraud, V. Guignon, K. Jahn, V. Jamilloux, T. Joët, K. Labadie, T. Lan, J. Leclercq, M. Lepelley, T. Leroy, L.-T. Li, P. Librado, L. Lopez, A. Muñoz, B. Noel, A. Pallavicini, G. Perrotta, V. Poncet, D. Pot, Priyono, M. Rigoreau, M. Rouard, J. Rozas, C. Tranchant-Dubreuil, R. VanBuren, Q. Zhang, A.C. Andrade, X. Argout, B. Bertrand, A. de Kochko, G. Graziosi, R.J. Henry, Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V.A. Albert, P. Wincker, P. Lashermes, The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis, *Science* 345 (2014) 1181–1184. <https://doi.org/10.1126/science.1255274>.
- [26] A. Dobin, C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, T.R. Gingeras, STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics* 29 (2013) 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
- [27] S. Anders, P.T. Pyl, W. Huber, HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data, *Bioinformatics* 31 (2015) 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>.
- [28] M.G. Grabherr, B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, A. Regev, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nat Biotechnol* 29 (2011) 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- [29] D. Gilbert, Gene-omes built from mRNA seq not genome DNA, *F1000Research* 5 (2016). <https://doi.org/10.7490/f1000research.1112594.1>.
- [30] L.J. Stewart, C.Y. Ong, M.M. Zhang, S. Brouwer, L. McIntyre, M.R. Davies, M.J. Walker, A.G. McEwan, K.J. Waldron, K.Y. Djoko, Role of Glutathione in Buffering Excess Intracellular Copper in *Streptococcus pyogenes*, *mBio* 11 (2020) e02804-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02804-20>.
- [31] T. Metsalu, J. Vilo, ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap, *Nucleic Acids Research* 43 (2015) W566–W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>.
- [32] M.D. Robinson, D.J. McCarthy, G.K. Smyth, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics* 26 (2010) 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- [33] K. Prüfer, B. Muetzel, H.-H. Do, G. Weiss, P. Khaitovich, E. Rahm, S. Pääbo, M. Lachmann, W. Enard, FUNC: a package for detecting significant associations between gene

sets and ontological annotations, *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 41.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-41>.

[34] H. Wickham, *ggplot2 Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer International Publishing, Cham, 2016.

[35] E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, R. Durbin, Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments, *Proteins* 28 (1997) 405–420.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(199707\)28:3<405::aid-prot10>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(199707)28:3<405::aid-prot10>3.0.co;2-l).

[36] M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, G. Sherlock, Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat Genet* 25 (2000) 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.

[37] F. Supek, M. Bošnjak, N. Škunca, T. Šmuc, REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms, *PLOS ONE* 6 (2011) e21800.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>.

[38] O. Thimm, O. Bläsing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Krüger, J. Selbig, L.A. Müller, S.Y. Rhee, M. Stitt, mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes, *The Plant Journal* 37 (2004) 914–939. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02016.x>.

[39] L.-F. Fu, Z.-B. Xin, F. Wen, S. Li, Y.-G. Wei, Complete chloroplast genome sequence of *Elatostema dissectum* (Urticaceae), *Mitochondrial DNA Part B* 4 (2019) 838–839.  
<https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1567292>.

[40] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm, S.G. Rozen, Primer3--new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res* 40 (2012) e115–e115.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.

[41] Z.L. Duan, W.H. Han, L. Yan, B. Wu, Reference gene selections for real time quantitative PCR analysis of gene expression in different oat tissues and under salt stress, *Biologia Plantarum* 64 (2020) 838–844. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.153>.

[42] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H.L. Deprez, A.F.M. Moorman, Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neuroscience Letters* 339 (2003) 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4).

[43] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods* 25 (2001) 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

[44] L.A. Mueller, T.H. Solow, N. Taylor, B. Skwarecki, R. Buels, J. Binns, C. Lin, M.H. Wright, R. Ahrens, Y. Wang, E.V. Herbst, E.R. Keyder, N. Menda, D. Zamir, S.D. Tanksley, The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond, *Plant Physiology* 138 (2005) 1310–1317. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060707>.

- [45] J.M.C. Mondego, M.P. Duarte, E. Kiyota, L. Martínez, S.R. de Camargo, F.P. De Caroli, B.S.C. Alves, S.M.C. Guerreiro, M.L.V. Oliva, O. Guerreiro-Filho, M. Menossi, Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation, *Planta* 233 (2011) 123–137. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1284-9>.
- [46] P. Lashermes, M.-C. Combes, J. Robert, P. Trouslot, A. D’Hont, F. Anthony, A. Charrier, Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome, *Mol Gen Genet* 261 (1999) 259–266. <https://doi.org/10.1007/s004380050965>.
- [47] C.M.J. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, S.C.M. Van Wees, Hormonal Modulation of Plant Immunity, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28 (2012) 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>.
- [48] Y. Li, H. Han, M. Fu, X. Zhou, J. Ye, F. Xu, W. Zhang, Y. Liao, X. Yang, Genome-wide identification and expression analysis of NAC family genes in *Ginkgo biloba* L., *Plant Biology* 25 (2023) 107–118. <https://doi.org/10.1111/plb.13486>.

#### 4. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores do grupo de pesquisa, o acesso UFV408-28 havia sido testado em ensaios de patogenicidade e caracterizado como moderadamente resistente às raças 1, 2 e 3 de *M. incognita*, apresentando HR em nível molecular (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Em seguida, a partir dos estádios precoces da infecção do acesso resistente, foram caracterizados os perfis de expressão de genes, conhecidamente responsivos em interações semelhantes em outros patossistemas. Nessa análise o gene *MIRAC* (putativo de miraculina), se destacou como um dos mais ativados (ALBUQUERQUE et al., 2017). As miraculinas de cafeeiro também foram representadas como DEGs responsivos a RKN no grupo de IP contendo ortólogos de outras três espécies hospedeiras: *Arachis stenosperma* Krapov. & W. C. Greg, soja (*G. max*) e arroz selvagem (*O. glaberrim* Steud.) (MOTA et al., 2020).

Assim, dando prosseguimento para aprofundar os conhecimentos do envolvimento dos genes tipo miraculina na reação imune do acesso UFV 408-28, os dados e o material biológico destes trabalhos foram utilizados nas análises e experimentos de validação discutidos a seguir.

##### 4.1 ANÁLISE FUNCIONAL *IN SILICO* - GO

Para avaliar o possível envolvimento desses genes na interação UFV408-28 com *M. incognita*, foi feita a análise de representatividade ( $|\log_2FC|$ ) e significância ( $|-Log_{10}(FDR)|$ ) dos transcritos por domínios PFAM, termos GO e enriquecimento dos GO (Figura 1 - artigo) e representação por Volcano Plot (Figura 2 artigo). Nos agrupamentos de domínio PFAM e *Biological function* (Figura 1 A, B - artigo), as proteínas kinases se destacam em quarto e terceiros lugares, respectivamente, em número de transcritos. O enriquecimento por *gene ontology* (GO) das sequências na planta resistente durante a interação incompatível pela presença do nematoide (Figura 1C - artigo) evidenciou as sequências de RNA com mais genes de expressão alterada. Em termos de significância, a atividade motora dos microtúbulos (GO: 0003777) ( $|-Log_{10}(FDR)|= 18,77$ ) e o movimento baseado em microtúbulos (GO: 0007018) ( $|-Log_{10}(FDR)|= 17,37$ ) demonstrou repressão, sendo que estes GOs são relacionados ao comportamento das vias metabólicas hormonais, tanto de JA quanto de SA, entre outros, como auxinas, giberelinas e ácido abscísico (LING et al., 2017). Além disso, a alta significância

atividade ( $|\text{-Log}_{10}(\text{FDR})| = 10,98$ ) e representatividade do grupo onde se encontram as miraculinas, que correspondem aos inibidores de endopeptidases também foram evidenciadas (GO: 0004866).

Os DEGs analisados foram utilizados para compor o *volcano plot*, com DEGs de alta significância destacados em vermelho, e DEGs não significativos destacados em cinza. Dentre os DEGs significativamente expressos, os genes tipo miraculina (Figura 2 A a G - artigo) se destacaram por apresentarem alta significância na superexpressão, quando comparados aos tratamentos inoculado (I) com não inoculado (NI).

#### 4.2 ANÁLISE FUNCIONAL *IN SILICO* - MAPMAN

O MapMan (Figura 3 - artigo) possibilitou a compreensão dos diferentes processos metabólicos envolvidos na interação incompatível entre *M. incognita* e o acesso UFV408-28 de *C. arabica*, pois classificou os DEGs em grupos funcionais. Os grupos que se mostraram mais alterados nessa interação foram destacados no gráfico, são eles: *R-genes*, *respiratory burst*, sinalização, MAP quinases, fatores de transcrição, *Heat Shock proteins*, metabólitos secundários, *PR-proteins* e sinalização hormonal.

A queima respiratória – *respiratory burst* – é uma das primeiras etapas possíveis na HR, e consiste na liberação massiva de ROS (e.g. peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Em interações incompatíveis é frequente a liberação e acumulação de ROS, seguida pela sinalização de degradação das ROS por peroxidases, que apresentaram expressão altamente alterada no MapMan, além de apresentarem cooperação do NO em interações incompatíveis. Outros componentes envolvidos nesse processo, como a ativação das GS transferase e a inibição do estado redox, também são fortemente modulados por participarem da via de queima respiratória (MELILLO et al., 2006). A via de sinalização é ativada na presença de ROS provocando uma cadeia de sinalizações para que a planta possa apresentar uma reação à presença do patógeno em níveis moleculares, ativando diferentes vias, como as proteínas quinases, ativadas por mitógenos – *Mitogen Activated protein Kinases* (MAPKs), além dos fatores de transcrição e das vias hormonais (GHORBEL et al., 2021).

As MAPKs têm a função de coordenar a regulação entre JA e SA nas respostas imunológicas das plantas. Entretanto, também atua em conjunto com outras vias, como os fatores de transcrição WRKY e na indução de SA para ativação da queima respiratória

(GHORBEL et al., 2021; RISEH; VAZVANI; KENNEDY, 2023). Os fatores de transcrição são importantes atores na resposta da planta a estresses bióticos, quando R-genes estão envolvidos, pois atuam nas reações das plantas resistentes, principalmente em rotas metabólicas vinculadas ao estresse oxidativo, desencadeado pela queima respiratória (ALBUQUERQUE et al., 2017; PETITOT et al., 2013).

Os fatores de transcrição (TF) WRKY são uma família de TFs e são os principais reguladores das repostas da planta envolvendo PTI e ETI, atuando na sinalização de morte celular em HRs relacionadas a patógeno (AKIO AMORIM et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2017). Por serem uma família de proteínas, sua expressão pode ser diferente dependendo do membro em análise, comportamento que pode ser observado na representação gráfica do MapMan (Figura 3 - artigo). Esse comportamento “não uniforme” ainda pode ser influenciado por não haver sincronismo perfeito entre todos os nematoides que penetram na raiz, logo cada nematoide induz alterações diferentes na expressão de um determinado fator (AKIO AMORIM et al., 2017). Outro importante TF, envolvido na morte celular é o bZIP, que também apresentou expressão alterada no MapMan (Figura 3 - artigo). Esse TF possui vários papéis no metabolismo da planta, dentre eles, a regulação da defesa da planta a patógenos (ALBUQUERQUE et al., 2017).

Fatores de resposta ao etileno - *Ethylene response factors* (ERFs), são TFs vinculados à resposta de defesa das plantas e integram a resposta de defesa do JA e Et, além de mediar a via de defesa da planta e a sinalização relacionada ao ABA, também modulam a expressão de PR-genes nas vias de resposta a estresse por patógenos (AKIO AMORIM et al., 2017).

Em relação aos genes de formação de parede celular, as vias metabólicas relacionadas estão predominantemente reprimidas, o que pode ser explicado pela dificuldade de estabelecimento de sítios de alimentação imposta pela planta resistente. Por ser moderadamente resistente, o acesso UFV408-28 impede a formação das galhas que requerem quantidades massivas de células formadas ao redor do sítio de alimentação estabelecido (ALBUQUERQUE et al., 2010; TAYLOR; SASSER, 1983).

As alterações de expressão no grupo de PR- *proteins* podem ser decorrentes da relação das PR-*proteins* com os genes R, vinculados à resistência gene-a-gene da planta. Essas alterações, tanto de superexpressão quanto de repressão, são reações da planta à indução de ETI do patógeno nas raízes. Os diferentes perfis de expressão se devem aos diferentes estádios da infecção presentes nas raízes. Por se tratar de um processo biológico, nem todos os nematoides



estarão no mesmo momento da infecção no mesmo local, fazendo com que diferentes indivíduos secretem efetores em tempos diferentes, reprimindo *PRs* em instantes diferentes. Porém, a resposta da planta pode ser a indução das *PRs* sinalizada pela presença de sinalizadores de JA (ANROOP KAUR et al., 2022; MACHARIA; BELLIENY-RABELO; MOLELEKI, 2020). Os inibidores de endopeptidases, grupo que engloba as *KTI*s e, por consequência, as miraculinas, foram enquadrados no grupo dos *PR-genes* na análise do MapMan. As *KTI*s podem ser considerados membros da família de inibidores de protease PR-6 (GRAHAM et al., 2003), essa classificação pode trazer novas abordagens para compreensão de estresses bióticos em escala molecular, principalmente em interações incompatíveis.

Dentre as vias de sinalização dos hormônios vegetais, os transcritos relacionados ao JA formaram um grupo reprimido, enquanto os de SA se mostraram divididos entre reprimidos e induzidos. O comportamento antagonico ente JA e SA é esperado, pois são vias que envolvem o *crossstalk* e que se opõem quando a planta está submetida a estresses bióticos (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2017). Esse comportamento dos genes de JA pode decorrer da resistência da planta a *M. incognita*, uma vez que em plantas suscetíveis existem relatos do comportamento inverso, ocorrendo uma superexpressão de genes relacionada à atividade de microtúbulos e de movimentação do citoesqueleto (HARDHAM, 2013).

Apesar de serem hormônios relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, ocorre *crossstalk* das rotas metabólicas de JA com as rotas de auxinas. Quando a planta é submetida a estresses bióticos ou abióticos ocorrem alteração dos processos biológicos liderados pela alteração de uma auxina específica - ácido indolacético - *indole-3-acetic-acid* (IAA) - com JA. O *crossstalk* entre auxina e JA, por vezes, leva a supressão das auxinas, como demonstrado no MapMan (Figura 3 - artigo) (WANG et al., 2021). O JA é um hormônio vegetal que possui muitas funções na planta, não apenas no sistema de defesa, mas participando também de rotas metabólicas do crescimento, regulação da abertura estomática, ciclo celular, transporte de glicose e ativação da maquinaria de defesa das plantas. Para cada situação, possui um fator diferente, seja ele metabólico, molecular ambiental ou particular do próprio RKN. A influência no comportamento da sinalização de JA é variada gerando diferentes respostas a cada estímulo simultaneamente. Com isso, a avaliação do comportamento do JA na interação planta-patógeno torna-se trabalhosa (GHORBEL et al., 2021), ainda que, alguns trabalhos demostrem que o JA endógeno de plantas suscetíveis não apresenta capacidade de reduzir a suscetibilidade de plantas a RKNs (PRZYBYLSKA; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, 2020). Muitas plantas têm respostas muito positivas quando estimuladas com JA tópico, uma vez que essa aplicação

se mostrou eficiente em forçar uma reação ao patógeno nas plantas testadas (COOPER; JIA; GOGGIN, 2005; FUJIMOTO et al., 2011; GLEASON et al., 2016; HU et al., 2017; NAHAR et al., 2011).

O JA pode ter sua expressão reprimida ou aumentada em diferentes situações, tanto em interações compatíveis, quanto incompatíveis, e ainda em situações em que é aplicado de forma tópica ou de forma endógena. Na interação incompatível entre *C. arabica* acesso UFV408-28 e *M. incognita*, em momento precoce da interação, o JA foi reprimido aos 6 DPI.

Além do JA e do SA, outras vias de sinalização hormonal sofrem alterações com a presença do patógeno, por exemplo: brassinosteróides (BR), ácido abscísico (ABA), e etileno (Et). Esses hormônios desempenham papéis diferentes na resposta imunológica das plantas. Brassinosteróides (BR) estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas e possuem *crosstalk* com as vias de JA. Esse *crosstalk* possui implicações na regulação das vias de defesa, principalmente pelo fato de baixas concentrações de BR atuarem como sinalizadores positivos nas vias de sinalização de JA. ABA é um hormônio importante na resposta de plantas a estresses abióticos, e por vezes possui papel antagônico ao JA nas vias de crescimento e desenvolvimento da planta. Ainda que apresentem papéis antagônicos em algumas vias, ABA e JA possuem um importante *crosstalk* quando a planta está submetida a estresses ambientais (GHORBEL et al., 2021). Assim como observado com outros hormônios, o JA também possui *crosstalk* com Et, em especial quando a planta está sob ataque por patógenos necrotróficos ou hemibiotróficos. Esse compartilhamento das rotas ocorre de forma sinérgica para ativar proteínas de defesa da planta nesses patossistemas (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). Por vezes em sistemas planta-patógeno, a produção de Et ocorre a partir da sinalização das MAMPs (SATO; KADOTA; SHIRASU, 2019).

### 4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Na análise das sequências por alinhamento, foram excisados os peptídeos sinal (manuscript results - Signal P) presentes nos genes de miraculina (Figura 4 - artigo). No dendrograma, observou-se que os representantes identificados no transcrito de *C. arabica* resistente podem ser ortólogos de *C. canephora*, por terem sido agrupados um a um de cada genótipo (Figura 5 - artigo). Essa possibilidade existe, pois *C. canephora* é um dos genitores diploides que compõem o genoma alotetraploide de *C. arabica*.

#### 4.4 VALIDAÇÃO FUNCIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

A análise dos dados de RT-qPCR dos genes de interesse permitiu validar as sequências de interesse de miraculinas, corroborando os dados de perfil de expressão *in silico*, embora tenham ocorrido divergências em dois dos genes avaliados. Nos experimentos *in vitro* (RT-qPCR), os genes *CaMir 2*, *CaMir 3* e *CaMir 5* apresentaram perfis de expressão semelhantes aos resultados obtidos *in silico* (transcritoma). Já os genes *CaMir 1* e *CaMir 4* tiveram perfis de expressão, nos testes *in vitro*, divergentes dos resultados obtidos *in silico*. Os comportamentos divergentes ocorreram em decorrência da baixa eficiência dos iniciadores da RT-qPCR, com baixa qualidade de amplificação dos alvos. Os produtos de amplificação dos genes de miraculina foram enviados para sequenciamento e analisados por alinhamento de sequências, tornando possível a validação dos genes de interesse.

Em paralelo, a partir do transcritoma, foram selecionados genes *upregulated* e *downregulated*. Esses genes foram submetidos a RT-qPCR, e também confirmaram o perfil de expressão demonstrado nas análises *in silico*.

Assim, foi possível demonstrar que, além do dado anterior da superexpressão de um representante das miraculinas na interação do cafeeiro com *M. incognita* (ALBUQUERQUE et al., 2017), outros membros desta família participam da resposta imune da planta hospedeira, uma vez que tiveram expressão alterada na presença do nematoide.

## 5. CONCLUSÃO

A geração do transcrito de raízes do acesso UFV408-28 resistente a *M. incognita* permitiu a elucidação da presença de membros da família das miraculinas em plantas de cafeeiro resistentes a *M. incognita*, além do entendimento do efeito de alguns hormônios (e.g. JA e SA).

Desta forma, a partir da anotação automática do transcrito de vários genes tipo miraculina foi possível determinar quais são homólogos de miraculinas e quais pertencem a outras enzimas da família Kunitz, ou ainda de outras famílias. Ainda que exista o relato de apenas um membro dessa família (CoMir) descrito na resposta imunológica de plantas de cafeeiro a estresse biótico desafiadas com bicho-mineiro do cafeeiro, a comparação das sequências aqui descritas nos permitiram evidenciar 5 homólogos de miraculinas. A análise da expressão diferencial de genes tipo miraculina em raízes de *C. arabica* em interações incompatíveis a *M. incognita* apresentou perfis diferentes de expressão para cada membro da família em análise por se tratar de uma superfamília (Kunitz).

Os resultados demonstrados neste trabalho geraram avanços consideráveis no conhecimento do envolvimento da família das miraculinas, na resposta imunológica de plantas a estresses bióticos, particularmente ao RKN *M. incognita*.

## 6. PERSPECTIVAS

Validar por transformação genética o envolvimento dos diferentes membros da família das miraculinas para avaliar e caracterizar a reação do acesso UFV408-28 em resposta ao *M. incógnita*. Um grupo de pesquisa do renomado IAC- SP, está trabalhando especificamente para isto visando controle de ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatix*) e do bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*):

[https://www.linkedin.com/feed/update/urn:li:activity:7151306731677982721?updateEntityUrn=urn%3Ali%3Afs\\_feedUpdate%3A%28V2%2Curn%3Ali%3Aactivity%3A7151306731677982721%29](https://www.linkedin.com/feed/update/urn:li:activity:7151306731677982721?updateEntityUrn=urn%3Ali%3Afs_feedUpdate%3A%28V2%2Curn%3Ali%3Aactivity%3A7151306731677982721%29).

Assim, podemos colaborar com este e outros centros de pesquisa que já trabalharam com miraculina em cafeeiro para adicionar os nematoides das galhas nesses projetos em andamento.

## BIBLIOGRAFIA

- ABAD, P. et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2003.
- ABAD, P. et al. Invasion, feeding and development. **Root-knot nematodes**, CABI Books. p. 163–181, jan. 2009.
- AKIO AMORIM, L. L. B. et al. Transcription Factors Involved in Plant Resistance to Pathogens. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 4, p. 335–351, 1 abr. 2017.
- 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.
- 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.
- ANROOP KAUR et al. Pathogenesis-Related Proteins and Their Transgenic Expression for Developing Disease-Resistant Crops: Strategies Progress and Challenges. Em: HAIPING WANG (Ed.). **Case Studies of Breeding Strategies in Major Plant Species**. Rijeka: IntechOpen, 2022. p. Ch. 6.
- BADEL, J. L.; ZAMBOLIM, L. Coffee bacterial diseases: a plethora of scientific opportunities. **Plant Pathology**, v. 68, n. 3, p. 411–425, 2019.
- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. 1163–1178, 2019.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 521–539, 6 abr. 2015.
- BOARI, A. DE J. et al. Vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 192–194, jun. 2006.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, 2009.

- 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, 1 set. 1998.
- CARNEIRO, R. et al. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**, v. 6, n. 2, p. 287–298, 1 jan. 2004.
- CARNEIRO, R. M. D. G. et al. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a Root-Knot Nematode Parasitizing Coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v. 28, n. 2, p. 177–189, jun. 1996.
- CHITWOOD, D. J.; PERRY, R. N. Reproduction, physiology and biochemistry. **Root-knot nematodes**, p. 182–200, 2009.
- CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da safra brasileira de café. Acompanhamento da safra brasileira de café. v. 1, n. 1, p. 47, jan. 2024.
- CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 12, p. 938–950, 1 dez. 2008.
- COOPER, W. R.; JIA, L.; GOGGIN, L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1953–1967, set. 2005.
- COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 537–552, set. 2016.
- CUI, H.; TSUDA, K.; PARKER, J. E. Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 487–511, 2015.
- DANIELL, W. F. **Pharm. J.**, v. 11, 1852.
- DE ALMEIDA ENGLER, J. et al. Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia. **The Plant Cell**, v. 11, n. 5, p. 793–807, 1 maio 1999.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M. Systematic position and phylogeny. Em: **The biology of nematodes**. [s.l.] Taylor & Francis, 2002. p. 1–30.

- DU, C. et al. Effects of salicylic acid, jasmonic acid and reactive oxygen species on the resistance of *Solanum peruvianum* to *Meloidogyne incognita*. **Scientia Horticulturae**, v. 275, p. 109649, 3 jan. 2021.
- EISENBACK, J. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). **An advanced treatise on Meloidogyne**, v. 1, p. 47–77, 1985.
- FERNANDES, C. DE F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. 2009.
- FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971.
- FUJIMOTO, T. et al. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1084–1097, 1 jul. 2011.
- GAHLOTH, D. et al. Bioinsecticidal activity of *Murraya koenigii* miraculin-like protein against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 3, p. 132–144, 2011.
- GHORBEL, M. et al. Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 8, p. 1471–1494, 1 ago. 2021.
- GLEASON, C. et al. OPDA Has Key Role in Regulating Plant Susceptibility to the Root-Knot Nematode *Meloidogyne hapla* in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- GRAHAM, M. Y. et al. Induced expression of pathogenesis-related protein genes in soybean by wounding and the *Phytophthora sojae* cell wall glucan elicitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, n. 3, p. 141–149, 1 set. 2003.
- HAARER, A. E. **Modern coffee production**. [s.l.] Leonard Hill [Books] Limited, London, 1956.
- HARDHAM, A. R. Microtubules and biotic interactions. **The Plant Journal**, v. 75, n. 2, p. 278–289, 2013.
- HU, Y. et al. Exogenous application of methyl jasmonate induces defence against *Meloidogyne hapla* in soybean. **Nematology**, v. 19, n. 3, p. 293–304, 1 jan. 2017.



HYDE, M.; WURSTEN, B.; BALLINGS, P. **Coffea Flora of Zimbabwe website**.

Disponível em: <<https://eol.org/pages/39907518/articles>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

ICO, I. C. O. **Coffee Market Report – December 2023**. Londres - Inglaterra: International Coffee Organization, dez. 2023. Disponível em:

<<https://www.icocoffee.org/documents/cy2023-24/cmr-1223-e.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

IN LEE, S. et al. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 1999.

**Indicadores da Indústria de Café | 2022. ABIC**, [s.d.]. Disponível em:

<<https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2022/>>. Acesso em: 23 jan. 2024

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, nov. 2006.

KARRER, E. E.; BEACHY, R. N.; HOLT, C. A. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. **Plant Molecular Biology**, v. 36, n. 5, p. 681–690, 1 mar. 1998.

KAWA, D.; BRADY, S. M. Root cell types as an interface for biotic interactions. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 11, p. 1173–1186, 1 nov. 2022.

KOUTSOVOULOS, G. D. et al. Population genomics supports clonal reproduction and multiple independent gains and losses of parasitic abilities in the most devastating nematode pest. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 2, p. 442–457, 2020.

KUNKEL, B. N.; BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 325–331, 1 ago. 2002.

KURIHARA, K.; BEIDLER, L. M. Taste-modifying protein from miracle fruit. **Science (New York, N.Y.)**, v. 161, n. 3847, p. 1241–1243, 20 set. 1968.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259–266, 1 mar. 1999.

LING, J. et al. Transcriptome profiling of *Cucumis metuliferus* infected by *Meloidogyne incognita* provides new insights into putative defense regulatory network in Cucurbitaceae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3544, 14 jun. 2017.

- LU, L. et al. Comprehensive Review of Fungi on Coffee. **Pathogens**, v. 11, n. 4, p. 411, abr. 2022.
- MACHARIA, T. N.; BELLIENY-RABELO, D.; MOLELEKI, L. N. Transcriptome Profiling of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Responses to Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) Infestation during A Compatible Interaction. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1443, set. 2020.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A. et al. Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New Phytologist**, v. 213, n. 3, p. 1363–1377, 2017.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de Café no Brasil: Manual de Recomendações**. 1. ed. Varginha - MG: [s.n.].
- MELILLO, M. T. et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, v. 170, n. 3, p. 501–512, 2006.
- MENG, X.; ZHANG, S. MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 245–266, 2013.
- 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.
- MOTA, A. P. Z. et al. Evolutionarily conserved plant genes responsive to root-knot nematodes identified by comparative genomics. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 295, n. 4, p. 1063–1078, 1 jul. 2020.
- NAHAR, K. et al. The Jasmonate Pathway Is a Key Player in Systemically Induced Defense against Root Knot Nematodes in Rice. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 305–316, 1 set. 2011.
- Nematóides - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/nematoides>>. Acesso em: 16 jan. 2024.
- OLIVEIRA, C. M. G. DE; ROSA, J. M. O. *Nematóides parasitos do cafeeiro*. 2018.

- PANIGRAHI, G. K.; SAHOO, A.; SATAPATHY, K. B. Insights to plant immunity: Defense signaling to epigenetics. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 113, p. 101568, 1 jan. 2021.
- PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 31, n. 4, p. 403–409, abr. 2018.
- PETITOT, A.-S. et al. Promoter analysis of the WRKY transcription factors CaWRKY1a and CaWRKY1b homoeologous genes in coffee (*Coffea arabica*). **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 8, p. 1263–1276, 1 ago. 2013.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, maio 2009.
- PRZYBYLSKA, A.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Plant defense responses in monocotyledonous and dicotyledonous host plants during root-knot nematode infection. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 239–260, 1 jun. 2020.
- RISEH, R. S.; VAZVANI, M. G.; KENNEDY, J. F.  $\beta$ -glucan-induced disease resistance in plants: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 127043, 31 dez. 2023.
- RUTTER, W. B.; FRANCO, J.; GLEASON, C. Rooting Out the Mechanisms of Root-Knot Nematode–Plant Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 60, n. 1, p. 43–76, 2022.
- RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425–449, 1990.
- SALGADO, S. M. DE L.; REZENDE, J. C. DE. Capítulo 12 - Manejo de Fitonematóides em Cafeeiro. Em: **Café Arábica do plantio à colheita**. [s.l.] Embrapa, 2010. v. 1p. 895.
- SASSER, J. et al. The international Meloidogyne project-its goals and accomplishments. **Annual Review of phytopathology**, v. 21, n. 1, p. 271–288, 1983.
- SATO, K.; KADOTA, Y.; SHIRASU, K. Plant Immune Responses to Parasitic Nematodes. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.
- 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.

STEFANELO, D. R. et al. Meloidogyne izarcoensis parasitizing coffee in Minas Gerais state: the first record in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 2, p. 209–212, 1 abr. 2019.

**Taxonomy Browser**. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=189290>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

TAYLOR, A.; SASSER, J. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. **Universidad de Carolina del Norte**, v. 111, 1983.

TEIXEIRA, P. J. P. et al. Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. **Current Opinion in Microbiology**, Environmental Microbiology. v. 49, p. 7–17, 1 jun. 2019.

TOPALOVIĆ, O. et al. Microbes Attaching to Endoparasitic Phytonematodes in Soil Trigger Plant Defense Upon Root Penetration by the Nematode. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

TSUKUDA, S. et al. Characterization of cDNAs Encoding Two Distinct Miraculin-like Proteins and Stress-related Modulation of the Corresponding mRNAs in Citrus jambhiri Lush. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 1, p. 125–136, 1 jan. 2006.

WANG, Y. et al. Function and Mechanism of Jasmonic Acid in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8568, jan. 2021.

YANG, Z. et al. The Chromosome-Level Genome of Miracle Fruit (*Synsepalum dulcificum*) Provides New Insights Into the Evolution and Function of Miraculin. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 804662, 3 jan. 2022.

YU, X. et al. From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 109–137, 2017.

ZHANG, J.; ZHOU, J.-M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Molecular Plant**, v. 3, n. 5, p. 783–793, 1 set. 2010.

ZHOU, W. et al. A Jasmonate Signaling Network Activates Root Stem Cells and Promotes Regeneration. **Cell**, v. 177, n. 4, p. 942–956.e14, 2 maio 2019.

## APÊNDICE I

Tabela 1 - Material suplementar do artigo: Tabela Suplementar I: sequências proteicas de referência utilizadas para desenho do dendrograma:

Species	Annotation	GenBank	Protein Sequence
<i>Nicotiana tabacum</i>	Kunitz trypsin inhibitor	ACL12055.1	MNTLLLLLSLSVIPIALCVPNPSRFLAGSSPSPVLDI NGDKVKVGLNYFVLPVIRGRGGGLLPSNVKQNNT CPRDIIQNSDEVQEGLPVVFAPFNTKKGVVRLSIDL NVRFFTPTICARETIWKLGTYYDDKLKQYFIVTGGV EGNPGPQTLSSWFKIEKLGTDYKFVFCPSVCKICK VICKDVGIYTKDGVRFALSDTPLRVMFKKTF
<i>Solanum lycopersicum</i>	Lemir	AAC63057.1	MKINQLFFPFLILAISFNLSLSSAAESPPEVVDIDGKI LRTGVDYYILPVVRGRGGGLTMDSIGDKMCPLDA VVQEHEIDQGLPLTFTPVDPKKGVIRESTDNIIFS ANSICVQTTQWKLDDFDETTGQYFITLGGDQGNP GVETISNWFKIEKYDRDYKLLYCPTVCFCKVICR DIGIFIQDGVRRALSDVPFKVMFKKA
<i>Solanum palustre</i>	Miraculin-like Protein MLP	AAQ96377.1	TNLKMKTNQLFLPFLILVISSNSFLSSAAESPPEVV DIDGKILRTGVDYYILPVVRGRGGGLTMDSIGDKI CPLDAVVQEHQEIDQGLPLTFTPVNPKKGVIREST DLNIIFSANSICVQTTQWKLDDFDETTGQYFITLGG NQGNGRETISNWFKIEKFDRDYKLLYCPTVCFDC KVICKEIGIFIQDGVRRALSDVPFKVMFKKA
<i>Theobroma bicolor</i>	Putative 21 kDa trypsin inhibitor	AAV41233.1	MKTATAVVLALLAFTSKSYFFGVANAANSPVLDT DGDELRTGVRYVSSIWGAGGGGLALGRATGQ SCPEIVVQRRSDLDNGTPVIFSNADSKDGVVRLST DINIEFVPIRDRLCSTSTVWKLNDYDNSAGKWWV TTDGVRGQPGPNTLTSWFKIERAGVLGYKFRFCPS VCDCKTLCSDIGRHSDDDGQIRLALSDNGWPWM FKKASKTIKQVVNAKH
<i>Glycine max</i>	Trypsin inhibitor subtype A	Q39898_SO YBN	MKSTIFFALFLFCAFTTSYLPSAIADFVLDNEGNPL ENGGTYIYILSDITAFGGIRAAPTGNERCPLTVVQSR NELDKGIGTISSPYRIRFIAEGHPLSLKFDSFAVIML CVGIPTESVVEDLPEGPAVKIGENKDAMDGWFR LERVSDDEFNNYKLVFCPQQAEDDKCGDIGISIDH DDGTRRLVVSKNKPLVVQFQKLDKESLAKKNHG LSRSE
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tumor related protein	AAC49969.1	MKTNQLFLPFLIFTISFNLSLSSAEAPPAVVDIAGK KLRTGIDYYILPVVRGRGGGLTLDSTGNESCPLDA VVQEQQEIKNGLPLTFTPVNPKKGVIRESTDNIKF SAASICVQTTLWKLDDFDETTGKYFITIGGNEGNP GRETISNWFKIEKFERDYKLVYCPTVCNFCCKVICK DVGIFIQDGIIRLALSDVPFKVMFKKAQVVKD

<i>Cajanus cajan</i>	Kunitz trypsin inhibitor 2	XP_0202131 33.1	MKFSMAVPLCLSLLLALNTHPLLA AEPEAVVDKQ GEPLRPGVGYVFP LWADEGGLSLGPTRNKTCPL DVIRDPSFIGLPLTFSAPGFDYIPTLTDLKVDFPVSTI CVQSNVWRLRKEGAGFWFVSADGNPN DITSKFKI ERLEGEHAYEIYSFKFCPSVPGTLCAPVGT FVDTD GTKVMAVGDNI EPYYVRFQKASVNHEKNQAFSIV
----------------------	----------------------------	--------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## APÊNDICE II

Tabela 2 - Material suplementar do artigo: Tabela Suplementar II: primers utilizados nas reações de RT-qPCR:

<b>Gene</b>	<b><i>Forward Primer</i></b>	<b><i>Reverse Primer</i></b>
CaMir_01_R	GCGAGTCGCCTGGTTCCATCG	CGTACACACCTTGCCGCTCACA
CaMir_02_R	GGCCTCCCGTTAACGTTTAC	TATGGTTTCACGGCCTGGAT
CaMir_03_R	CCAGCCAATGTCTTCCGGGGC	ACGAACCACACCTTTCTTCGGGT
CaMir_04_R	GCCTAGAGTCTCAGGCCCCCGG	GCTCAGAGATGGCCTGCCGC
CaMir_05_R	CTGGAGATTCGCCACAGGTT	CAATTTCAGGCAGCCCACAC
CaMir_06_R	ACTGGCTCGGGTGCTTCAGC	TGATGCAAACGCACTCCACATGT
CaMir_07_R	TCGGCCGAGTCACACCGAGT	GAGGTTCGAGGCCCGGACCAT
CaMir_08_R	AAGTGTTGTTTCGAGTGCCTCGTTG	AAGGGCCCAGGCAATGAAATTTGC
Ubiquitina	AATCCGTCCCCGCATGTT	CCAGTGCATCCTGTTGTCTCA