



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ANÁLISE DE MEMBROS DA FAMÍLIA MIRACULINA EM GENOMAS DE
COFFEA ARABICA APÓS INTERAÇÃO COM *MELOIDOGYNE INCOGNITA***

Leonardo de Amorim Vidal

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Orientadora científica: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF
NOVEMBRO/2021



LEONARDO DE AMORIM VIDAL

**ANÁLISE DE MEMBROS DA FAMÍLIA MIRACULINA EM GENOMAS DE
COFFEA ARABICA APÓS INTERAÇÃO COM *MELOIDOGYNE INCOGNITA***

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Agronomia apresentado
junto à Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de
Brasília

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Orientadora científica: Dra. Érika Valéria Saliba Albuquerque

BRASÍLIA - DF
NOVEMBRO/2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Leonardo de Amorim Vidal

Título: Análise de Membros da Família Miraculina em genomas de *Coffea arabica* após Interação com *Meloidogyne incognita*

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Agronomia apresentado junto ao Curso de Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em 04/11/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dra. Érika Valeria Saliba Albuquerque Freire
Genéticos e Biotecnologia

Instituição: Embrapa – Recursos

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dra.: Eliza Fabricio de Melo Bellard do Nascimento
Genéticos e Biotecnologia

Instituição: Embrapa – Recursos

Julgamento: _____

Assinatura: _____

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

VIDAL, L. de A. **Análise de Membros da Família Miraculina em genomas de *Coffea arabica* após Interação com *Meloidogyne incognita***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 37 p.

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 deste trabalho de conclusão de curso 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. **Análise de Membros da Família Miraculina em genomas de *Coffea arabica* após Interação com *Meloidogyne incognita***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 37 p.

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

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

Agradecimentos

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

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

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

Às pesquisadoras Juliana Dantas de Almeida e Diana Isolda Clotilde Fernandez por seus conselhos e ensinamentos.

Ao professor Everaldo Pereira pelo olhar crítico, que muito acrescentou a este trabalho.

Aos amigos Leonardo Zanchi, Caio Augusto Torres e Paulo Victor Lustosa pela amizade e parceria nos vários momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório Camila Vilarinho, Eliza Bellard e Vivian Lucena por todo apoio e por vários dos 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 à Fundação Pro Café agradeço por ter financiado todo o trabalho.

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

Sou Grato!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Objetivos.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 O Café.....	11
2.2 O Nematóide.....	12
2.3 Reações de Hipersensibilidade (RH).....	13
2.4 Miraculina.....	16
2.5 <i>qRT-PCR</i>	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material biológico.....	19
3.2 Busca por sequências candidatas.....	19
3.3 BLAST.....	19
3.4 Alinhamento.....	20
3.5 <i>qRT-PCR</i>	20
3.6 Expressão diferencial.....	21
3.7 Sequenciamento.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5 CONCLUSÕES.....	27
BIBLIOGRAFIA	28
APÊNDICE I.....	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –Fluorescência (azul) correspondente aos sítios necróticos de RH. Seta vermelha indicando o nematoide entre células necróticas de RH. 14
- Figura 2 – Representação em modelo “zigue-zague” da resposta imunológica das plantas. As PAMPs são detectadas, na fase 1, por PRRs, o que desencadeia a PTI. Após a PTI, na fase 2, os patógenos que sobreviveram liberam efetores que burlam a PTI através da ETS. Na fase 3, uma proteína NB-LRR detecta o efector (círculo vermelho) liberado pelo nematoide desencadeia a ETI, que é uma PTI com muito mais intensidade, de forma a induzir à RH. Na fase 4, os patógenos que perderam o efector (em vermelho) podem ter adquirido novos efetores (em azul) por fluxo gênico horizontal, gerando uma nova ETI (JONES; DANGL, 2006). 15
- Figura 3 - Alinhamento das sequências dos genes selecionados com genes de referências. Em vermelho o domínio característico da família Kunitz e em azul as cisteínas conservadas que junto com o domínio, são características da família gênica das miraculinas. Os genes selecionados foram nomeados de CaMir, tendo como sufixo final as letras R ou S, referentes ao respectivo genótipo.22
- Figura 4 - Árvore filogenética dos genes selecionados e genes de referência.23
- Figura 5 - Curva de amplificação de qRT-PCR utilizando os primers CaMir_03_R e CaMir_03_S, em triplicatas técnicas na mesma placa de qRT-PCR. No eixo horizontal está o ciclo da reação, no eixo vertical está representada à amplificação do material do poço selecionado.24
- Figura 6 – Curva de dissociação dos produtos de qRT-PCR. Indicados pela seta verde estão os produtos de reações utilizando o genótipo R, em azul os produtos de genótipos S, em triplicatas técnicas. O eixo horizontal apresenta a temperatura em °C, o eixo vertical apresenta os valores de ΔR25
- Figura 7 – Gráficos demonstrando a expressão gênica em um dos experimentos biológicos comparando a expressão dos genes nos dois genótipos. Em azul a expressão dos genes nas amostras de raízes de plantas S aos 6 DAI, em laranja a expressão dos genes nas plantas R aos 6 DAI. Os genes foram comparados com um gene constitutivo, em seguida comparado as

amostras NI vs. I. Todos os experimentos seguiram a mesma linha de modulação na expressão gênica.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
DAI	Dias Após Infecção
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ETS	<i>Effector-triggered susceptibility</i>
GC	Guanina-Citosina
I	Inoculado
IP	Inibidor de Proteinase
J2	Juvenil 2
MAMPs	<i>Microbial-associated molecular patterns</i>
MCP	Morte Celular Programada
MLPs	<i>Miraculin-like Proteins</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NI	Não Inoculado
nM	Nanomolar
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pb	Par de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
<i>qRT-PCR</i>	<i>PCR Quantitativo, PCR em Tempo Real (Real-Time Quantitative PCR)</i>
R	Resistente
RH	Reação de Hipersensibilidade
RKN	<i>Root-knot Nematode</i>
RNAase	Ribonuclease
RNAi	Ácido Ribonucleico Interferente
S	Suscetível
TMV	<i>Tomato Mosaic Virus</i>
vs	<i>Versus</i>
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

RESUMO

A cultura do cafeeiro é muito afetada por patógenos, em especial pelo nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*. Esse patógeno tem se mostrado uma ameaça à cafeicultura nacional pois se tornou de difícil combate, mesmo quando se utilizam estratégias de controle químico. O estudo da expressão relativa de genes em interações planta-patógeno possibilita a análise de genes relacionados à resposta imunológica das plantas inoculadas com nematoides. O presente trabalho visou a análise de genes com expressão modulada em interações superprecoces através da análise do transcrito de raízes de cafeeiro resistentes e suscetíveis inoculados com *M. incognita*. Os genes que foram anotados como miraculinas e pertencentes à família *Kunitz* foram analisados e comparados para análises de expressão diferencial. A família gênica das miraculinas apresentou expressão alterada nos dois genótipos analisados, demonstrando a relação entre essa família gênica e as respostas imunológicas de cafeeiros a esse patógeno.

Palavras-chave: Nematoide das galhas; Interações planta-patógeno; Resposta imunológica; Transcritoma; Expressão diferencial; *qRT-PCR*.

ABSTRACT

Coffee crops are highly affected by pathogens, especially the root-knot nematode (RKN), *Meloidogyne incognita*. RKN has been threatening the national coffee production since it has become difficult to combat, even when chemical control strategies are used. The study of the relative expression of genes in plant-pathogen interactions allows the analysis of genes related to the immune response of plants inoculated with nematodes. This study aimed to analyze genes with modulated expression in early interactions through the analysis of the transcriptome of resistant and susceptible coffee roots inoculated with *M. incognita*. The genes annotated as miraculins and belonging to the *Kunitz* family were analyzed and compared for differential expression analysis. The gene family of miraculins had its expression altered in the two genotypes analyzed, demonstrating the relationship between this gene family and the immunological responses of coffee plants to this pathogen.

Key words: Root knot nematode; Plant-pathogen interaction; Immune response; transcriptome; Differential expression; qRT-PCR.

1 INTRODUÇÃO

2
3 O Brasil é o maior produtor de café (*Coffea spp.*) no mundo, com uma produção de 63,08
4 milhões de sacas (60kg) (CONAB, 2021). Os parques cafeícolas brasileiros são assolados diariamente
5 por uma série de patógenos e pragas. Um dos principais patógenos presentes nos cafezais brasileiros é o
6 nematoide das galhas (*Root-knot Nematode - RKN*), *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919)
7 Chitwood 1949 (CARNEIRO; ALMEIDA; CARNEIRO, 1995).

8 O nematoide das galhas é um patógeno muito agressivo e polífago, pois possui mais de três mil
9 espécies de hospedeiras, entre elas, grande parte das plantas no momento cultivadas. Visto que é um
10 patógeno que possui uma elevada virulência, esse patógeno é considerado um dos mais agressivos e
11 persistentes em solos tropicais (SASSER; CARTER, 1985).

12 A resistência genética é uma estratégia interessante para o controle do RKN, porém, por
13 vezes é considerada frágil quando se trata de *Coffea arabica* L., uma vez que tal planta é
14 alotetraploide, ou seja, apresenta dois subgenomas no mesmo núcleo, o genoma de *C.*
15 *canephora* Pierre ex A. Froehner e de *C. eugenioides* S. Moore (LASHERMES et al., 1999).
16 Essa característica é um fator que dificulta a elaboração de estratégias de controle genético,
17 pois, em plantas alotetraploides, a resistência genética é facilmente quebrada. O acesso UFV
18 408-28 de *C. arabica* é resistente a *M. incognita*, que apresenta reação de hipersensibilidade
19 (RH) em análises histológicas em momento precoce da infecção, aos 6 dias após a inoculação
20 (DAI) (ALBUQUERQUE et al., 2010).

21 A análise da expressão relativa de genes em interações planta-patógeno possibilita o estudo de
22 genes relacionados à resposta imunológica das plantas inoculadas com nematoides. Esse conhecimento se
23 torna importante para elaboração de diferentes estratégias e abordagens de controle do patógeno (LING
24 et al., 2017).

25 As famílias gênicas são grupos de genes homólogos que possuem grande similaridade entre si e
26 entre suas funções (DEMUTH et al., 2006). A família gênica das miraculinas se mostrou vinculada à
27 resposta imunológica de várias espécies de plantas, como por exemplo *Solanum lycopersicum* L.,
28 *Nicotiana tabacum* L., *Oriza sativa* L. e *C. arabica*, a várias espécies de patógenos e pragas, incluindo
29 cafeeiros (MONDEGO et al., 2005). Desse modo, se torna uma família gênica de interesse elevado para
30 análise de expressão, possibilitando um maior entendimento da resposta da planta ao patógeno, em
31 especial comparando essa expressão em genótipos resistentes e suscetíveis.

32 O estudo de genes pertencentes à família das miraculinas (*Miraculin-like Protein* - MLP), com
33 auxílio do transcriptoma gerado a partir das interações de *C. arabica* com *M. incognita* é uma estratégia
34 interessante para analisar a expressão diferencial desses genes relacionados à resposta imunológica do
35 café.

36

37 **1.1 Objetivos**

38

39 O Objetivo Geral do trabalho foi realizar a análise de membros da família das
40 miraculinas em genomas de *C. arabica*. Seu alcance deu-se através dos seguintes Objetivos
41 Específicos:

- 42 • Buscar os possíveis genes da família das miraculinas nos diferentes genótipos de
43 *C. arabica* em análise;
- 44 • Validar o transcriptoma gerado na interação cafeeiros e RKN;
- 45 • Analisar a expressão diferencial de genes tipo miraculina em genótipos
46 suscetíveis e resistentes de *C. arabica* em interações compatíveis e incompatíveis a *M.*
47 *incognita*;

48 2 REFERENCIAL TEÓRICO

49

50 2.1 O Café

51

52 Os primeiros cafezais brasileiros foram implantados nos estados do Maranhão e do
53 Grão-Pará, em 1727, de onde começou um processo lento de expansão pelo país, chegando à
54 Bahia em 1770 e, em 1774, ao Rio de Janeiro. Em 1825, o café atingiu o vale do Paraíba, dando
55 início aos parques cafeícolas dos estados de São Paulo e Minas Gerais (MATIELLO et al.,
56 2016).

57 O cafeeiro (*C. arabica*) pertence à família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae, tribo
58 *Coffeae* DC e ao gênero *Coffea* L. (DAVIS et al., 2007). O Gênero *Coffea* possui 124 espécies
59 divididas em dois subgêneros, *Coffea* e *Baracoffea*, que apresentam respectivamente 95 e 9
60 espécies (DAVIS et al., 2006, 2011, 2019). No subgênero *Coffea* estão classificadas as três
61 espécies cultivadas de café utilizadas para bebida: *C. arabica* e *C. canephora* e *C. liberica* Bull
62 ex Hiern (SAKIYAMA, 2015). Economicamente, as espécies mais importantes são *C. arabica*,
63 *C. canephora*.

64 *Coffea arabica* é um alotetraploide que apresenta 44 cromossomos, enquanto *C.*
65 *canephora* e as outras espécies do gênero apresentam 22 cromossomos (LASHERMES et al.,
66 2000). Isso ocorre, pois *C. arabica* possui como genitores *C. eugenioides* e *C. canephora*, em
67 decorrência de um evento de poliploidização ocorrido entre essas duas espécies, o que também
68 justifica o fato dessa espécie possuir uma baixa variabilidade entre o germoplansma selvagem
69 e o cultivado (SCALABRIN et al., 2020).

70 O cafeeiro pode apresentar até cinco raízes axiais, que podem crescer até 2 metros e
71 produzir várias raízes secundárias. Esse crescimento varia de acordo com a qualidade do solo.
72 Quando estão estabelecidas em solo de boas características físicas e químicas, essas raízes
73 podem atingir até 3 metros de comprimento. Quando não, terão o desenvolvimento bastante
74 limitado (MATIELLO et al., 2016).

75 O Brasil é o maior produtor mundial de café, foram colhidos, em 2020, 63,08 milhões
76 de sacas (60kg) beneficiadas, sendo 48,77 milhões de sacas de *C. arabica*, e 14,31 milhões de
77 sacas de *C. canephora* (CONAB, 2021). A produção mundial foi de 175,647 milhões de sacas

78 sendo 105,325 milhões de sacas de *C. arabica*, e 70,323 milhões de sacas de *C. canephora*
79 (ICO, 2021).

80

81 **2.2 O Nematóide**

82

83 Os nematóides são animais invertebrados pertencentes ao filo Nematoda, onde são
84 estimadas um milhão de espécies. Destas, 25000 são parasitas de vertebrados, sendo a maioria
85 ainda não descritas (BLAXTER; KOUTSOVOULOS, 2015); e 4.500 são parasitas de plantas
86 (DE LEY; BLAXTER, 2002). Este filo é subdividido em duas classes: Enoplea e Chromadorea.
87 Na classe Chromadorea, está presente o grupo de nematóides economicamente mais importante,
88 os do gênero *Meloidogyne* (DE LEY; BLAXTER, 2002).

89 O gênero *Meloidogyne* está contido na classe Rhabditida, subordem Tylenchina,
90 infraordem Tylenchomorpha, família Tylenchoidea, família Meloidogynidae (MOENS;
91 PERRY; STARR, 2009).

92 As espécies desse gênero são extremamente polífagas, chegando a ter mais de três mil
93 espécies de plantas como hospedeiras, incluindo várias de grande importância econômica, como
94 por exemplo o amendoim, arroz, cacau, café, cana de açúcar, feijão, mamão, milho, soja, tabaco,
95 tomate entre outras (SASSER; CARTER, 1985). Esse gênero possui 18 espécies que infectam
96 cafeeiros em todo o mundo, seis destas espécies estão presentes nos cafezais brasileiros, *M.*
97 *exigua* Göldi, 1887, *M. incognita*, *M. paranaenses* Carneiro, Carneiro, Abrante & Almeida
98 1996, *M. coffeicola* Lordello & Smith, 1960, *M. hapla* Chitwood, 1949 e *M. izalcoensis*
99 Carneiro, Almeida, Gomez & Hernandez, 2005 (SALGADO; REZENDE, 2010;
100 STEFANELO, 2019).

101 O nematóide das galhas (*Root-knot nematode* – RKN), *Meloidoyne incognita*, é o
102 patógeno que causa os maiores prejuízos nos cafezais no mundo, estima-se que o RKN cause
103 perdas de 15% da produção mundial de café. No Brasil, esse problema é ainda mais agravado,
104 chegando a causar 20% nas perdas de produção (OLIVEIRA; ROSA, 2018), demonstrando a
105 necessidade de controle desse patógeno.

106 Por serem animais endoparasitas obrigatórios, os juvenis de segundo estágio (J2), fase
107 infectiva do ciclo de vida do nematóide, assim que eclodem dos ovos, buscam por raízes para
108 estabelecerem seu sítio de alimentação. Ao penetrar na raiz, o J2 induz a formação do sítio de

109 alimentação, composto por 5 a 7 células, induzidas por secreções produzidas nas glândulas
110 esofagianas, a realizarem mitoses sem citocinese, dando origem às chamadas células
111 “gigantes”, células grandes e multinucleadas (ABAD et al., 2003; DE ALMEIDA ENGLER et
112 al., 1999). Essas células multinucleadas apresentam um citoplasma denso e repleto de
113 mitocôndrias, plastídios, ribossomos, complexos de Golgi bem desenvolvidos e um amplo
114 retículo endoplasmático liso (ABAD et al., 2003).

115 Em cafeeiros, a infecção dá origem a um sintoma um pouco diferente da meloidoginose
116 comum. Em *C. arabica*, resulta-se em um engrossamento, necroses e rachaduras nas raízes das
117 plantas infectadas, diferentemente das galhas formadas tradicionalmente nas raízes de outras
118 plantas (CARNEIRO et al., 1996). Além dos sintomas radiculares, os principais sintomas da
119 meloidoginose são desfolha intensa, mortalidade, em alguns casos pode causar clorose, além
120 de dificultar a absorção de água e nutrientes. A distribuição do nematoide é notada pela
121 distribuição característica em forma de reboleira (OLIVEIRA; ROSA, 2018).

122

123 **2.3 Reações de Hipersensibilidade (RH)**

124

125 As reações de hipersensibilidade (RH) são um importante mecanismo de defesa das
126 plantas em resposta a nematoides, tanto nos momentos precoces, dificultando a penetração do
127 nematoide e sua migração (WILLIAMSON, 1999), quanto em momentos mais tardios da
128 infecção, impedindo a formação do sítio de alimentação (células gigantes) e ainda impedindo o
129 desenvolvimento e multiplicação do patógeno na raiz (PROITE et al., 2008).

130 Reações de hipersensibilidade são reações locais a infecções por patógenos geradas por
131 plantas resistentes (R) a determinado patógeno. Geralmente a forma mais comum de RH é a
132 necrose do sítio de alimentação do patógeno (Figura 1) (FLOR, 1971). A RH em questão
133 apresenta uma fluorescência amarela, quando analisado sob microscopia com utilização de
134 excitação por luz UV (ALBUQUERQUE et al., 2010).

135

136

137

138

139

140

141

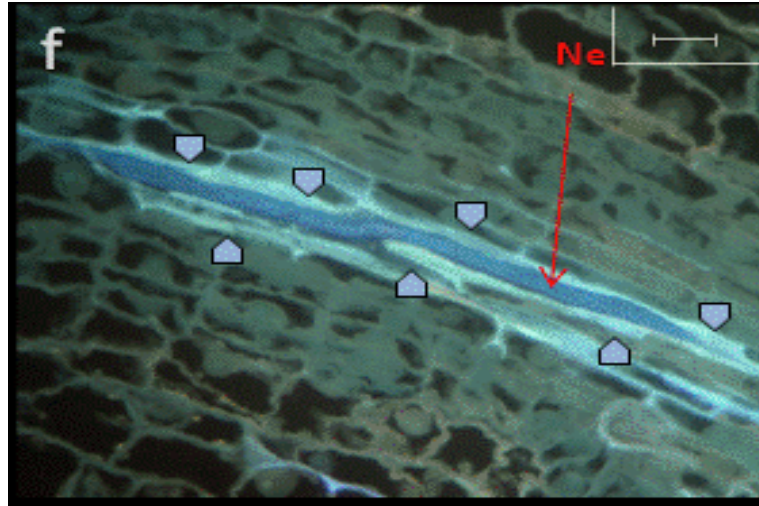
142

143

144

145

146



147

Figura 1 –Fluorescência (azul) correspondente aos sítios necróticos de RH. Seta vermelha indicando o nematoide entre células necróticas de RH.

148

Fonte: Albuquerque et al., 2010.

149

150

A especificidade patógeno-planta é um importante fator quando se estuda as RH, pois, significa dizer que determinada cultivar exerce resistência sobre um patógeno específico dependendo da relação de resistência (JONES; DANGL, 2006).

153

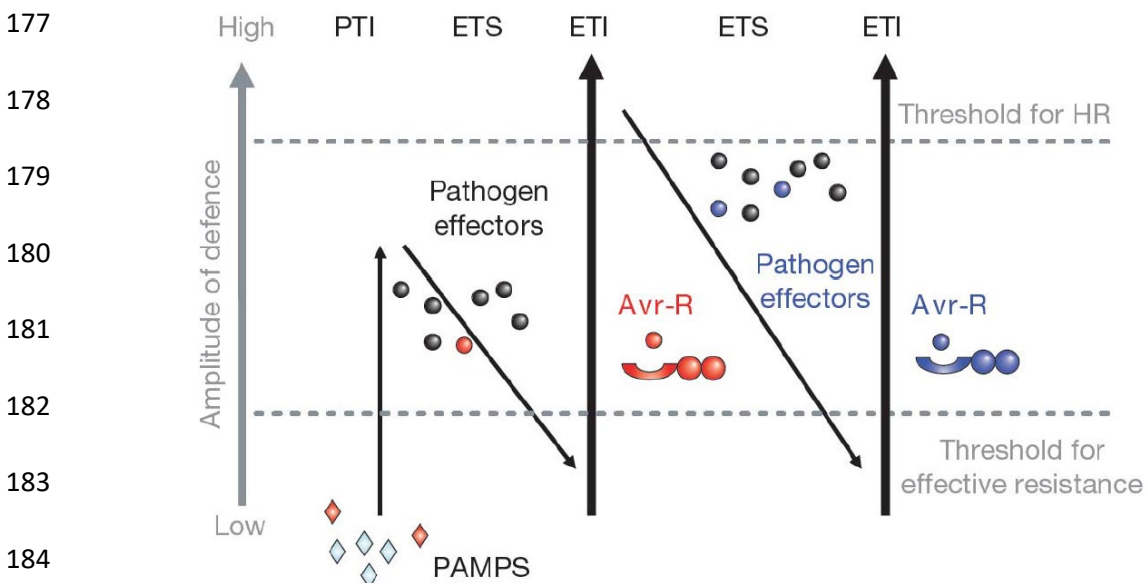
As RH são casos clássicos de resistência gene-a-gene, dependente da relação entre o gene de resistência da planta R e o gene de avirulência do patógeno (RICHTER; RONALD, 2000). As RH podem ser consideradas raça específica, pois podem atuar apenas sobre determinada raça de um patógeno específico, dado o grau de especificidade do mecanismo de resistência de uma determinada cultivar (HAMMOND-KOSACK; HARRISON; JONES, 1994; JOOSTEN; DE WIT, 1999).

159

Diferentemente dos mamíferos, as plantas não apresentam um “sistema imunológico” móvel, composto por diferentes células. As plantas dependem exclusivamente dos mecanismos de defesa presentes em cada célula. Um modelo de defesa das plantas é representado pelo modelo de “zigue-zague” (Figura 2), composto por quatro fases (JONES; DANGL, 2006). A fase 1 tem início com a detecção de moléculas conservadas associadas a microorganismos ou patógenos (MAMPs/PAMPs) por receptores extracelulares transmembrânicos (PRRs) dando início à imunidade provocada por PAMP (PTI), que já impede a colonização da maioria dos patógenos, ainda que seja uma resposta relativamente fraca. Na fase 2 os patógenos que

166

167 conseguiram evitar a ação da PTI liberam efetores que interferem nessa resposta gerando uma
 168 suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) mitigando a resposta imunológica da planta.
 169 Na fase 3, uma proteína NB-LRR reconhece um desses efetores, ativando a imunidade induzida
 170 por efetores (ETI), atuando como uma PTI amplificada, quando essa resposta atinge um nível
 171 alto suficiente tem-se a indução da RH. Por fim, na fase 4, são selecionados os isolados dos
 172 patógenos que perderam o efector vermelho (Figura 2), e que talvez tenham ganhado novos
 173 efetores por fluxo gênico horizontal (em azul) (Figura 2) – estes podem ajudar os patógenos a
 174 suprimir a ETI. O acesso UFV 408-48 de *C. arabica* apresenta resposta imunológica a *M.*
 175 *incognita* na forma de reações de hipersensibilidade no modelo zigue zague (ALBUQUERQUE
 176 et al., 2010).



185 Figura 2 – Representação em modelo “zigue-zague” da resposta imunológica das plantas. As
 186 PAMPs são detectadas, na fase 1, por PRRs, o que desencadeia a PTI. Após a PTI, na fase 2,
 187 os patógenos que sobreviveram liberam efetores que burlam a PTI através da ETS. Na fase 3,
 188 uma proteína NB-LRR detecta o efector (círculo vermelho) liberado pelo nematoide
 189 desencadeia a ETI, que é uma PTI com muito mais intensidade, de forma a induzir à RH. Na
 190 fase 4, os patógenos que perderam o efector (em vermelho) podem ter adquirido novos efetores
 191 (em azul) por fluxo gênico horizontal, gerando uma nova ETI (JONES; DANGL, 2006).

188 Fonte: Jones e Dangl, 2006.

189

190 As RH envolvem uma série de reações nas células envolvidas na resposta imune da
 191 planta, as quais causam uma redistribuição de organelas dentro das células envolvidas. A
 192 polarização da célula reorganiza o citoesqueleto de actina, movimenta as organelas, secreta e
 193 deposita calose no local de contato da planta com o patógeno são reações ocorridas nas células
 194 envolvidas nas RH (KWON; BEDNAREK; SCHULZE-LEFERT, 2008). As RH podem ser,

195 ainda, consideradas uma forma de morte celular programada (MCP) (WATANABE; LAM,
196 2004), pois é um mecanismo desenvolvido pelas plantas para interromper o desenvolvimento
197 da infecção causada pelo patógeno (GABRIEL; ROLFE, 1990).

198

199 **2.4 Miraculina**

200

201 Foram descritas propriedades “milagrosas” do fruto de *Synsepalum dulcificum*,
202 (Schumach. & Thonn.) William Freedman Danielferl um pequeno fruto vermelho, de tamanho
203 similar a uma azeitona e produzido por um arbusto nativo da região oeste da África (DANIELL,
204 1852). Esse fruto apresenta uma molécula capaz de transformar a percepção de sabores azedos
205 e ácidos em sabores doces. Essa capacidade tem permitido diferentes povos africanos a
206 consumirem e produzirem pães fermentados, vinho de palma e cerveja (KURIHARA;
207 BEIDLER, 1968). Ainda não se sabe com certeza o modo de ação dessa molécula sobre o
208 paladar humano, porém existem fortes evidências de que seja uma molécula que possui sua
209 atividade modulada pelo pH, tornando-se agonista ou antagonista nos receptores de sabor ácido
210 e doce (MISAKA, 2013).

211 A miraculina do fruto de *S. dulcificum* foi isolada e caracterizada como uma
212 glicoproteína com peso molecular aproximadamente 44000 u, insípida, termolábil e inativada
213 quando em contato com solventes orgânicos em alta concentração e quando em contato com
214 enzimas proteolíticas (KURIHARA; BEIDLER, 1968).

215 A miraculina é uma molécula que, além de ter a capacidade de transformar sabores, está
216 vinculada a resposta de plantas a estresses bióticos (TSUKUDA et al., 2006). As *Miraculin-like*
217 *Proteins* (MLPs) possuem atividade de inibição de tripsina, capazes de inibir a atividade
218 proteolítica de várias pragas e patógenos, pois interfere na capacidade de digestão de
219 proteínas por parte dos insetos-praga (CONANT; WOLFE, 2008; GAHLOTH et al., 2011;
220 RYAN, 1990; TSUKUDA et al., 2006). Por possuírem essa atividade proteolítica, pertencem à
221 superfamília dos inibidores de proteinase (IP) do tipo *Kunitz*, cuja característica é a presença
222 do domínio da família. A peculiaridade das MLPs é a presença de seis cisteínas conservadas na
223 porção N-terminal, que permitem a formação de três pontes de bissulfeto (SELVAKUMAR et
224 al., 2011).

225 Em tomateiros suscetíveis, *Solanum lycopersicum*, foi descrita uma molécula com 54%
226 de identidade com a miraculina nativa, induzida por *Meloidogyne javanica* (Treub,1885)
227 Chitwood,1949. Essa molécula foi nomeada de *LeMir*, uma MLP presente no tomateiro
228 (BRENNER et al., 1998).

229 Em plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN, foi identificada uma MLP
230 68% idêntica à miraculina em uma resposta de hipersensibilidade a TMV (*Tomato Mosaic*
231 *Virus*) (KARRER; BEACHY; HOLT, 1998).

232 Plantas de arroz, *Oriza sativa*, foram transformadas com gene de inibidor de proteinase
233 do tipo *Kunitz* (SKTI), que pertence à superfamília *Kunitz*, visando gerar resistência à cigarrinha
234 marrom do arroz, *Nilaparvata lugens* Stsl, 1854, causando a morte de ninfas que se alimentaram
235 das plantas transformadas (IN LEE et al., 1999).

236 Em *Murraya koenigii* (L.) Sprengel, foi descrita uma MLP com 39% de identidade com
237 a miraculina nativa, com efeito inseticida e como impeditivo do desenvolvimento de larvas,
238 pupas e adultos de *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 e *Spodoptera litura* Fabricius,
239 1775(GAHLOTH et al., 2011).

240 Uma proteína com 41% de similaridade com a proteína modificadora de sabor presente
241 em *S. dulcificum* foi descrita vinculada à resposta de *C. arabica* a estresse por bicho mineiro do
242 cafeeiro, *Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville,1842. Com base na miraculina presente em
243 tomateiro, essa molécula foi nomeada de *CoMir* (MONDEGO et al., 2011).

244 A superexpressão de MLPs foi relatada em RH incompatíveis entre cafeeiros resistentes,
245 *C. arabica*, acesso UFV408-28, e *M. incognita*, ainda nos momentos de infecção muito
246 precoces (6 DAI) (ALBUQUERQUE et al., 2017).

247 A infecção por ferrugem do cafeeiro, *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, causou a
248 modulação de expressão de genes de Miraculina em *C. arabica* em infecções compatíveis
249 (Informação verbal)¹.

250 Esses exemplos demonstram que, ainda que não se tenha certeza do modo, a miraculina
251 está atrelada à resposta de várias plantas a estresses bióticos.

¹ Informação fornecida pela Dra. Diana Isolda Clotilde Fernandez, do *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França) em encontro presencial no dia 20 de fevereiro de 2019, ocorrido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

252

253

254 **2.5 *qRT-PCR***

255

256 A reação em cadeia da polimerase (*PCR*) consiste na amplificação de uma determinada
257 região do DNA pela enzima DNA polimerase na presença de oligonucleotídeos iniciadores e
258 um molde de DNA, de forma exponencial. Os oligonucleotídeos iniciadores, também chamados
259 de *primers*, são sintetizados de forma complementar ao segmento de DNA a ser amplificado,
260 definindo a posição de início e fim do fragmento amplificado (MULLIS et al., 1986).

261

262 A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*qRT-PCR*) é uma forma
263 aprimorada da *PCR* convencional, que utiliza uma sonda com sinal fluorescente, captado pelo
264 aparelho em que se desempenha a reação. Este processo permite o monitoramento da
265 quantidade de DNA amplificado ciclo a ciclo, uma vez que o fluoróforo aumenta a intensidade
266 da fluorescência a cada ciclo, pois a sonda se liga à molécula de DNA replicada (NELSON;
COX, 2014).

267

268 Dentre os genes expressos por determinado organismo, a *qRT-PCR* permite verificar a
269 presença de um gene específico. Tal técnica utiliza cDNA, ou seja, a fita antisense, simples e
270 reversa complementar à fita de mRNA, como molde para a amplificação pela DNA-polimerase.
271 Pode-se utilizar a *qRT-PCR* para verificar se um determinado gene estava ou não expresso
272 quando o RNA foi extraído. A utilização do cDNA se justifica, pois, ao realizar o processo de
273 transcrição reversa, ou seja, a “conversão” do mRNA em cDNA, eliminam-se os fragmentos da
274 sequência que não são fragmentos codantes, ou seja, sem os íntrons, regiões não codantes de
proteínas (LOURENÇO, 2014).

275 3 MATERIAL E MÉTODOS

276

277 3.1 Material biológico

278

279 Em trabalhos anteriores já publicados, foram realizados experimentos utilizando plantas
280 de *C. arabica* cv Catuaí Vermelho IAC15, genótipo suscetível (S) a RKN, e plantas do acesso
281 UFV408-28, genótipo resistente (R) a RKN (ALBUQUERQUE et al., 2010). Ambos os
282 genótipos, com 4 a 5 meses de idade, foram inoculados (I) com 5000 J2 de RKN, *M. incognita*
283 raça 1, população obtida em raízes de cafeeiros suscetíveis de Avilândia, São Paulo, por planta,
284 acompanhados de seus respectivos controles negativos, plantas não inoculadas (NI), mantidos
285 em casa de vegetação a 70% de umidade relativa e 25 °C, com um fotoperíodo de 16h
286 (ALBUQUERQUE et al., 2017).

287 Foram realizadas extrações de RNA da raiz das plantas aos 6 DAI para obtenção do
288 transcrito de *C. arabica* na interação precoce planta-patógeno.

289 A partir da análise dos resultados do transcrito foi observado um aumento na
290 presença de transcritos de miraculina aos 6 DAI por RKN.

291

292 3.2 Busca por sequências candidatas

293

294 A partir dos *contigs* de *C. canephora*, foi realizada a busca das sequências proteicas de
295 cada *contig* no *Coffee Genome Hub* (<http://coffee-genome.org/advanced>), onde foram obtidas
296 as sequências de referência no genoma de *C. canephora*.

297

298 3.3 BLAST

299

300 Com as sequências proteicas, foram realizados *tBLASTn* das sequências de *C.*
301 *canephora* contra genomas de *C. arabica*, em um banco de dados restrito ao grupo de pesquisa
302 do Laboratório de Bioquímica e Biofísica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,

303 obtendo como resultado os acessos R e S a RKN. Para cada acesso, foi obtida a respectiva
304 sequência nucleotídica e proteica.

305

306

307

308 **3.4 Alinhamento**

309

310 As sequências proteicas de *C. arabica* R e S foram alinhadas com genes de referência
311 da família *Kunitz* (SELVAKUMAR et al., 2011), utilizando o *software Geneious 8*®, afim de
312 verificar a presença do domínio característico da família *Kunitz*, [L/I/V/M]-x-D-x-
313 [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] e as cisteínas
314 conservadas, na porção N-terminal das sequências (LASKOWSKI; KATO, 1980). A partir do
315 alinhamento foi obtida a árvore filogenética das sequências em estudo, utilizando o mesmo
316 *software*.

317

318 **3.5 qRT-PCR**

319

320 As sequências que foram selecionadas, ou seja, que apresentavam o domínio da família,
321 e as cisteínas conservadas em sua porção N-terminal foram utilizadas para desenho de *primers*
322 utilizando o *Primer3Plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), com
323 temperatura de anelamento de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, com comprimento dos *primers* de 18 a 27 pb, e
324 produto com comprimento de 100-1000 pb, com um teor de GC de $50\% \pm 30\%$. Os *primers*
325 foram sintetizados pela *Invitrogen*® e utilizados a uma concentração final de 200 nM,
326 conforme apresentado na tabela do Apêndice I (ALBUQUERQUE et al., 2017). Além das
327 sequências selecionadas, foram desenhados *primers* para genes de referência para o cálculo de
328 expressão diferencial utilizando-se o gene Ubiquitina (MARRACCINI, 2021).

329

330 A eficiência dos *primers* foi testada em *pools* de cDNA de amostras de raízes de
331 café, de forma a verificar a eficiência para utilização, tendo sido obtidas eficiências entre
331 1,8 e 2,0.

332 As reações de *qRT-PCR* foram desempenhadas em uma máquina 7500 – *Fast Real-time*
333 *PCR system* – *Applied BioSystems*®, os *primers* foram utilizados em conjunto com o kit
334 *GoTaq*® *qPCR Master Mix* (*Promega*®), tendo a primeira etapa, como uma fase de ativação
335 da enzima, 2 minutos a 95°C. Seguida pela fase de anelamento, com 40 ciclos de 15 segundos
336 a 95°C e 1 minuto a 58°C, por fim, a curva de desnaturação.

337 A especificidade dos *primers* foi verificada através da análise das curvas de dissociação
338 apresentadas nas reações, apresentando um único pico associado à sequência amplificada.

339

340 **3.6 Expressão diferencial**

341

342 A normalização dos dados das reações de *qRT-PCR* foi feita no *LinRegPCR*
343 (*RAMAKERS et al., 2003*), que utiliza um algoritmo iterativo para calcular a eficiência da
344 reação de *qRT-PCR*, poço a poço da placa, realizando uma regressão linear a partir dos dados
345 de fluorescência da fase de amplificação dos fragmentos de cDNA, do ângulo da curva de
346 regressão, a fim de normalizar os dados, evitando possíveis vícios para cálculo das expressões
347 diferenciais (*ČIKOŠ; BUKOVSKÁ; KOPPEL, 2007; RUTLEDGE; STEWART, 2008*). A
348 expressão diferencial foi calculada com base no método de cálculo de $-\Delta\Delta Ct$ (*LIVAK;*
349 *SCHMITTGEN, 2001*), onde, pra cada genótipo, foi comparado o tratamento com o inoculado,
350 utilizando como gene de referência a Ubiquitina (Ubi9), por ser um gene constitutivo e que não
351 tem sua expressão modulada (*MUELLER et al., 2005*).

352

353 **3.7 Sequenciamento**

354

355 Os produtos de *qRT-PCR* foram sequenciados pelo método *Sanger* (*Genewiz* sediada na
356 Lúpsia, Alemanha).

357 As sequências *in silico* (produtos de *qRT-PCR*) foram validadas utilizando o
358 alinhamento das sequências obtidas a partir do sequenciamento, com os *contigs* de *C. arabica*
359 utilizadas para desenhar os *primers*. O alinhamento foi realizado por *Clustal Omega*
360 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

361 **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

362

363 A partir da análise do transcrito, foram selecionados 32 genes codantes de IP em
 364 genótipos de *C. canephora* que foram comparados com genomas de *C. arabica* para buscar os
 365 ortólogos, gerando, assim, 32 genes R e 32 genes S codantes de IP em genótipos de *C. arabica*
 366 (Apêndice I).

367 As sequências proteicas referentes aos 64 genes de *C. arabica* selecionados foram
 368 alinhadas com proteínas de referências descritas como miraculinas e *Kunitz*, buscando o
 369 domínio da família *Kunitz* e as cisteínas características das MLPs. O estudo das sequências
 370 analisadas, deixou clara a distinção entre as proteínas integrantes do grupo das miraculinas e as
 371 tipo *Kunitz*. As MLPs são um grupo específico dentro da família gênica das *Kunitz*. As proteínas
 372 tipo *Kunitz* apresentam duas cisteínas a menos que as MLPs na porção N-terminal da sequência.
 373 O fato de as *Kunitz* apresentarem apenas quatro cisteínas possibilita a formação de apenas duas
 374 pontes dissulfeto. Já as MLPs, apresentam seis cisteínas na porção N-terminal, permitindo a
 375 formação de três pontes dissulfeto, caracterizando, assim, um grupo particular dentro desta
 376 família de inibidores de proteinase (SELVAKUMAR et al., 2011).

377 A análise de homologia feita a partir do alinhamento levou à eliminação das sequências
 378 que não apresentavam o domínio da família *Kunitz* e que não apresentavam as cisteínas
 379 características das MLPs, restando 8 sequências em cada genótipo. O alinhamento dos genes
 380 selecionados com genes de referência (Figura 3) mostrou ainda, que são genes diferentes, mas
 381 ainda são MLPs.

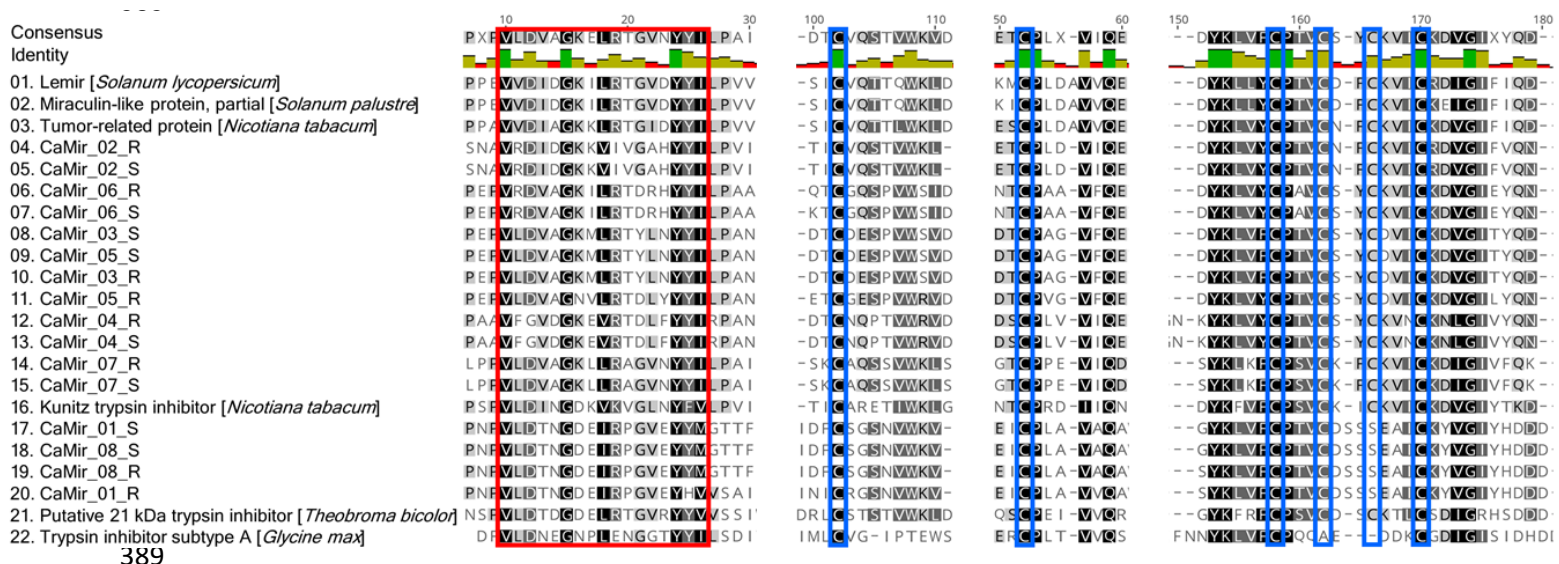


Figura 3 - Alinhamento das sequências dos genes selecionados com genes de referências. Em vermelho o domínio característico da família *Kunitz* e em azul as cisteínas conservadas que junto com o domínio, são características da família gênica das miraculinas. Os genes selecionados foram nomeados de CaMir, tendo como sufixo final as letras R ou S, referentes ao respectivo genótipo.

390 Os genótipos R e S apresentaram diferenças sutis no alinhamento, mas que mostram a
391 diferença de cada genótipo.

392 O alinhamento permitiu, ainda, a obtenção da árvore filogenética (Figura 4) que
393 demonstrou a distância entre os genes (representada pelos pequenos números nos nós da árvore)
394 em estudo com os genes de referência. Evidenciando o fato de que são genes diferentes, mas
395 ainda dentro da família das miraculinas (SELVAKUMAR et al., 2011).

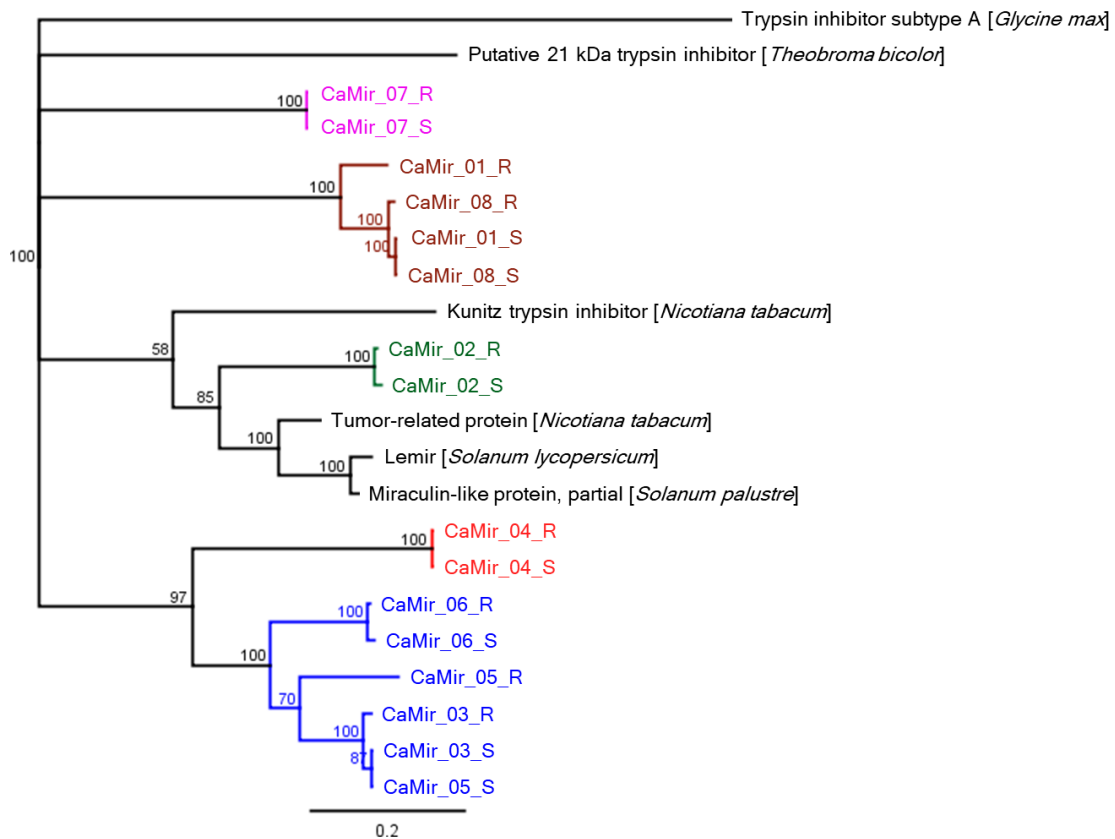


Figura 4 - Árvore filogenética dos genes selecionados e genes de referência.

396

397 Os *primers* desenhados para verificar a presença de cada gene em seu respectivo
398 genótipo (Apêndice I) e, ainda, certificar a modulação e expressão diferencial de cada gene,
399 para, também, discriminar os genótipos R e S, foram eficientes em discriminar os genes nos
400 diferentes genótipos.

401 O teste de eficiência de cada *primer* foi realizado a partir de um *Pool* de amostras dentro
402 do mesmo genótipo. Tendo sido demonstrada a eficiência de cada *primer*, foram utilizados os
403 que apresentaram eficiência entre 0,8 e 1,0. A amplificação foi eficiente, apresentando curvas
404 de amplificação muito consistentes, com mesmo comportamento em todas as triplicatas
405 técnicas e de boa qualidade de amplificação (Figura 5).

406

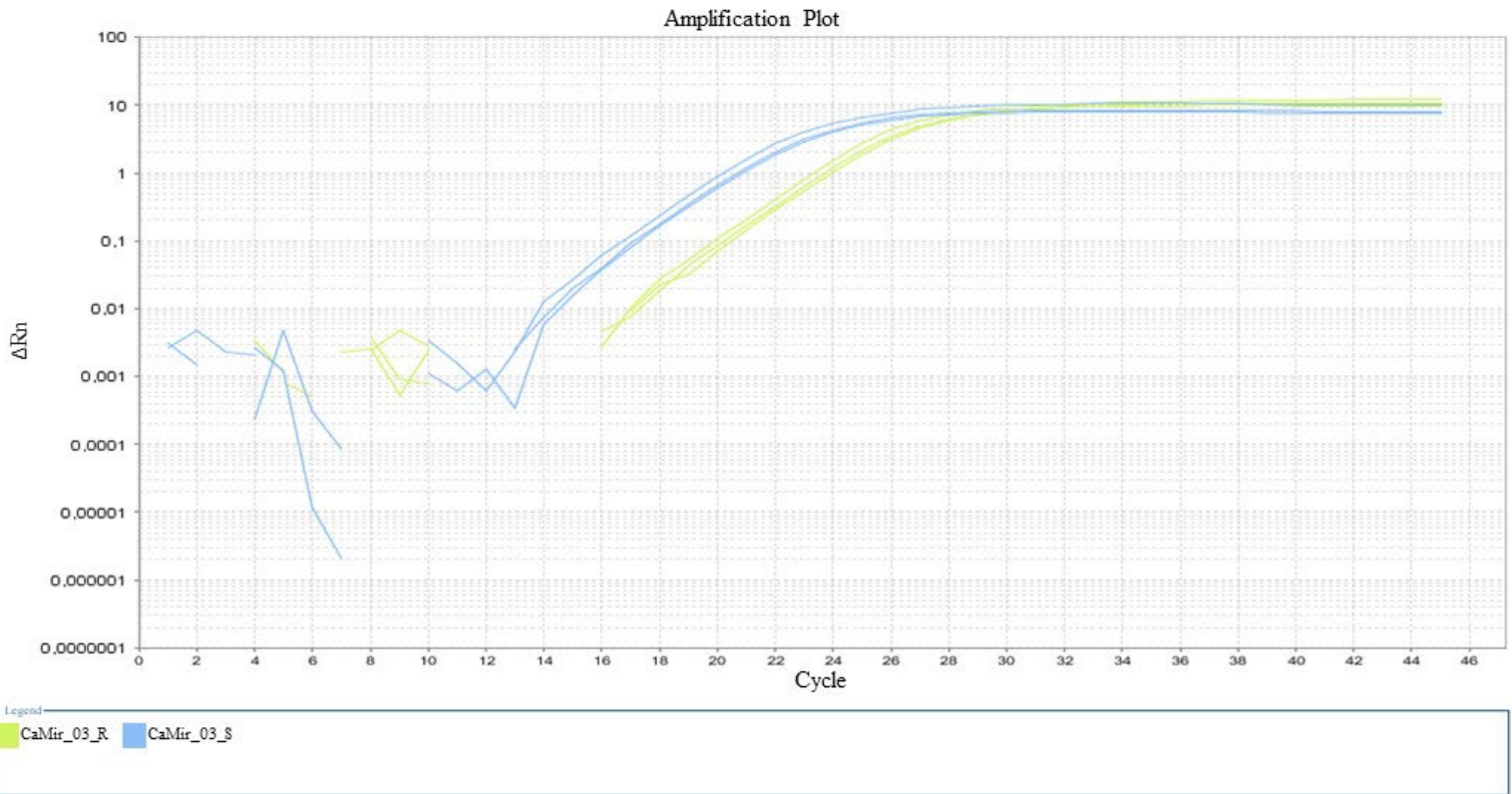


Figura 5 - Curva de amplificação de qRT-PCR utilizando os primers CaMir_03_R e CaMir_03_S, em triplicatas técnicas na mesma placa de qRT-PCR. No eixo horizontal está o ciclo da reação, no eixo vertical está representada à amplificação do material do poço selecionado.

407

408 Os *primers* utilizados foram eficientes na discriminação dos genótipos R e S, como
 409 demonstrado na Figura 6, onde estão destacados os picos de dissociação dos produtos de *qRT-*
 410 *PCR* dos genótipos R, em verde, e S, em azul (BESTER et al., 2012). A diferença de
 411 temperatura demonstrada pela distância entre as coordenadas de cada pico no eixo horizontal
 412 do gráfico é interpretada como dois produtos de tamanhos (pares de bases) e concentrações de
 413 adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), em especial conteúdo de G e C, diferentes.

414

415

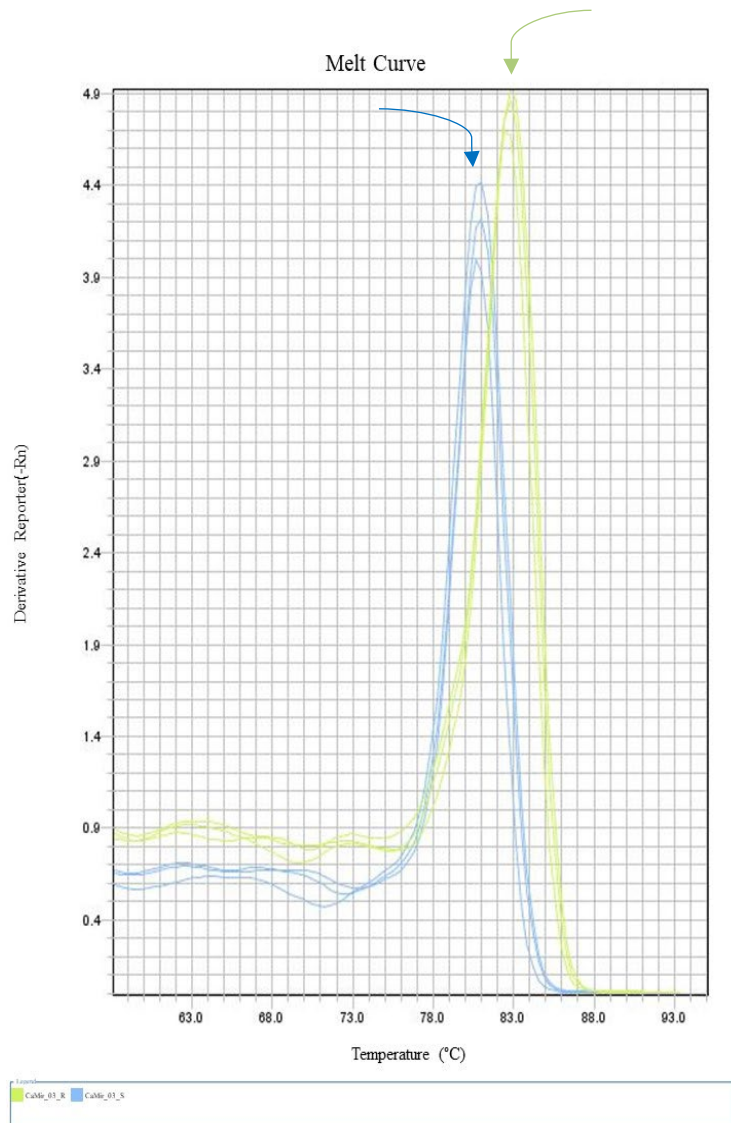


Figura 6 – Curva de dissociação dos produtos de *qRT-PCR*. Indicados pela seta verde estão os produtos de reações utilizando o genótipo R, em azul os produtos de genótipos S, em triplicatas técnicas. O eixo horizontal apresenta a temperatura em °C, o eixo vertical apresenta os valores de ΔR .

416

417 A partir dos resultados numéricos das reações de *qRT-PCR*, foram realizados os cálculos
 418 para comparar a expressão dos genes em plantas inoculadas contra plantas não inoculadas, tanto
 419 no genótipo R quanto no genótipo S, onde foi demonstrado que a presença de RKN modula a
 420 expressão de genes do tipo miraculina. Em algumas plantas, essa modulação ocorreu de forma
 421 bastante clara, pois, quando comparados os dois genótipos, o genótipo S teve uma repressão
 422 intensa do gene 05S, enquanto, no genótipo R, o gene 05R apresentou uma superexpressão
 423 (Figura 7).

424 Os resultados das análises de expressão apontam para uma modulação de proteínas do
 425 tipo miraculinas em cafeeiros R e S, em alguns casos essa modulação pode se mostrar oposta
 426 nos dois genótipos, demonstrando a relação entre e expressão dessa família com a interação
 427 planta-patógeno (VIEIRA et al., 2012).

428

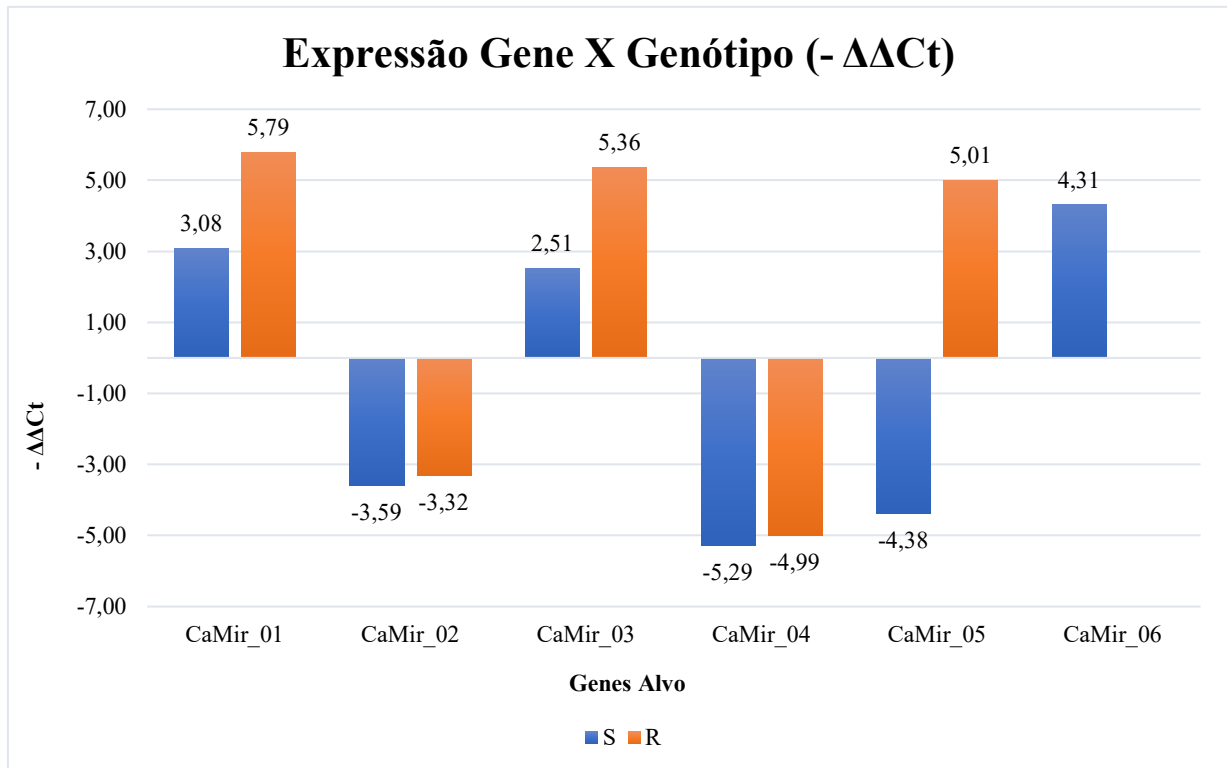


Figura 7 – Gráficos demonstrando a expressão gênica em um dos experimentos biológicos comparando a expressão dos genes nos dois genótipos. Em azul a expressão dos genes nas amostras de raízes de plantas S aos 6 DAI, em laranja a expressão dos genes nas plantas R aos 6 DAI. Os genes foram comparados com um gene constitutivo, em seguida comparado as amostras NI vs. I. Todos os experimentos seguiram a mesma linha de modulação na expressão gênica.

429

430 O sequenciamento dos produtos de qRT-PCR foi eficiente em obter algumas sequências
 431 dos produtos enviados para sequenciamento, porém alguns falharam ao serem sequenciados.
 432 Os que foram bem-sucedidos permitiram a confirmação das sequências esperadas quando
 433 comparadas as sequências *in silico* com os produtos de qRT-PCR.

434 5 CONCLUSÕES

435

436 O transcrito gerado a partir das raízes de cafeeiros recém inoculados com RKN foi
437 validado com sucesso, uma vez que permitiu o estudo da presença de um grupo de proteínas
438 vinculadas ao sistema imunológico dos cafeeiros, o qual apresentou modulação na expressão
439 quando as plantas foram desafiadas com inóculos de RKN.

440 A interação planta-patógeno entre *C. arabica* e *M. incognita* provoca modulações em
441 genes diferentes do grupo das miraculinas, tornando-se uma possível estratégia de estudo para
442 controle desse patógeno.

443 O desenho de *primers* foi eficiente em amplificar os fragmentos de cDNA desejados,
444 possibilitando o estudo da modulação de expressão provocado pela interação planta-patógeno
445 entre *C. arabica* e *M. incognita*. A discriminação dos diferentes genes-alvo, membros da família
446 das miraculinas, tanto nos genótipos R quanto nos genótipos S, foi bem realizada pelos *primers*
447 utilizados, permitindo ainda o sequenciamento dos produtos de qRT-PCR gerados, o que
448 possibilitou a análise da expressão modulada pela interação.

449 Não foi possível, a confirmação dos resultados demonstrados neste estudo em plantas
450 modelo, por tratar-se de uma família numerosa de genes. Porém fica demonstrado o
451 envolvimento de genes de miraculinas na resposta de cafeeiro ao RKN, conforme observado
452 em outras interações desta planta com outras pragas e doenças, i.e., em interações com a
453 ferrugem do cafeeiro, *Hemileia vastatrix* (Informação verbal)², e o bicho mineiro do cafeeiro,
454 *L. coffeella* (MONDEGO et al., 2011).

² Informação fornecida pela Dra. Diana Isolda Clotilde Fernandez, do *Institut de Recherche pour le Développement* (IRD, Montpellier, França) em encontro presencial no dia 20 de fevereiro de 2019, ocorrido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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.
- 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.
- BESTER, R. et al. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 219, 27 set. 2012.
- BLAXTER, M.; KOUTSOVOULOS, G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology**, v. 142, n. S1, p. S26–S39, fev. 2015.
- 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. 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.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. G. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. p. 6, 18 out. 1995.
- ČIKOŠ, Š.; BUKOVSKÁ, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 113, 20 dez. 2007.
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café. v. 8, n. 1, p. 72, jan. 2021.
- 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.
- DANIELL, W. F. **Pharm. J.**, v. 11, 1852.
- DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, dez. 2006.
- DAVIS, A. P. et al. Searching for the relatives of *Coffea* (Rubiaceae, Ixoroideae): the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 3, p. 313–329, mar. 2007.

DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, n. 4, p. 357–377, 1 dez. 2011.

DAVIS, A. P. et al. High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. **Science Advances**, v. 5, n. 1, p. eaav3473, 2019.

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. L. Systematic position and phylogeny. In: **The biology of nematodes**. [s.l.] Taylor & Francis, 2002. p. 1–30.

DEMUTH, J. P. et al. The Evolution of Mammalian Gene Families. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, p. e85, 20 dez. 2006.

FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971.

GABRIEL, D. W.; ROLFE, B. G. Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 365–391, 1990.

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.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; HARRISON, K.; JONES, J. D. Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease-resistance gene *Cf-9*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10445–10449, 25 out. 1994.

ICO, I. C. O. **Coffee Market Report**. Londres - Inglaterra: International Coffee Organization, jan. 2021. Disponível em: <<http://www.ico.org/Market-Report-20-21-e.asp>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

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.

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

JOOSTEN, M.; DE WIT, P. THE TOMATO–CLADOSPORIUM FULVUM INTERACTION: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 32, 1999.

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.

- 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.
- KWON, C.; BEDNAREK, P.; SCHULZE-LEFERT, P. Secretory Pathways in Plant Immune Responses. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 1575–1583, 1 ago. 2008.
- 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.
- LASHERMES, P. et al. Single-locus inheritance in the allotetraploid *Coffea arabica* L. and interspecific hybrid *C. arabica* x *C. canephora*. **The Journal of Heredity**, v. 91, n. 1, p. 81–85, fev. 2000.
- LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein Inhibitors of Proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 593–626, 1 jun. 1980.
- 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.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- LOURENÇO, I. **Validação funcional de genes envolvidos com estresse de *Meloidogyne incognita* via RNA interferente in planta**. Brasília - DF: Universidade de Brasília, fev. 2014.
- MARRACCINI, P. Gene Expression in Coffee. In: CÁNOVAS, F. M. et al. (Eds.). **Progress in Botany Vol. 82**. Progress in Botany. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 43–111.
- MATIELLO, J. B. et al. **Cultura de Café no Brasil: Manual de Recomendações**. 1. ed. Varginha - MG: 2016.
- MISAKA, T. Molecular mechanisms of the action of miraculin, a taste-modifying protein. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 222–225, mar. 2013.
- MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: **Root-knot Nematodes**. Cambridge: CABI, 2009. p. 17.
- MONDEGO, J. M. C. et al. Isolation and characterization of *Coffea* genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. **Plant Science**, v. 169, n. 2, p. 351–360, ago. 2005.
- 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.
- MUELLER, L. A. et al. The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. **Plant Physiology**, v. 138, n. 3, p. 1310–1317, 1 jul. 2005.

- MULLIS, K. et al. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263–273, 1 jan. 1986.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre - RS: Artmed, 2014.
- OLIVEIRA, C. M. G. DE; ROSA, J. M. O. **Boletim Técnico Nematoides Parasitos do Cafeeiro**. São Paulo: Instituto Biológico, 2018. Disponível em: <http://www.biológico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/pdf/Boletins/cafe/nematoides_parasitos_cafeeiro.pdf>. Acesso em: 10 set. 2021.
- PROITE, K. et al. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. **Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 974–980, 2008.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 13 mar. 2003.
- RICHTER, T. E.; RONALD, P. C. The evolution of disease resistance genes. In: DOYLE, J. J.; GAUT, B. S. (Eds.). **Plant Molecular Evolution**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 195–204.
- RUTLEDGE, R. G.; STEWART, D. Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 96, 30 out. 2008.
- 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.
- SAKIYAMA, N. S. O Café Arábica. In: **Café Arábica do plantio à colheita**. Viçosa, MG: UFV, 2015. p. 316.
- SALGADO, S. M. DE L.; REZENDE, J. C. DE. Capítulo 12 - Manejo de Fitonematóides em Cafeeiro. In: **Café Arábica do plantio à colheita**. [s.l.] Embrapa, 2010. v. 1p. 895.
- SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume I: Biology and Control**. Raleigh, North Carolina: v. I. 1985.
- SCALABRIN, S. et al. A single polyploidization event at the origin of the tetraploid genome of *Coffea arabica* is responsible for the extremely low genetic variation in wild and cultivated germplasm. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4642, 13 mar. 2020.
- 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. Primeiro relato de *Meloidogyne izalcoensis* no Brasil e avaliação da resistência a essa espécie e a *M. exigua* em genótipos de *Coffea* spp. 11 jul. 2019.
- 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.

VIEIRA, A. et al. Expression profiling of genes involved in the biotrophic colonisation of *Coffea arabica* leaves by *Hemileia vastatrix*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 261–277, 1 maio 2012.

WATANABE, N.; LAM, E. Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 65–70, 2004.

WILLIAMSON, V. M. Plant nematode resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, n. 4, p. 327–331, 1 ago. 1999.

APÊNDICE I

Tabela dos primers utilizados nas reações de qRT-PCR:

Gene	<i>Forward Primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
CaMir_01_R	GCGAGTCGCCTGGTTCCATCG	CGTACACACCTTGCCGCTCACA
CaMir_01_S	TGGCCGTGGTTTCACATCCCG	CAGTGGCTCAGGCGTGGCTC
CaMir_02_R	GGCCTCCCGTTAACGTTTAC	TATGGTTTCACGGCCTGGAT
CaMir_02_S	GCAAGACGTCTCCTCCCATTCTGC	AGCCGCTCGACCAGCCAGTA
CaMir_03_R	CCAGCCAATGTCTTCCGGGGC	ACGAACCACACCTTTCTTCGGGT
CaMir_03_S	TGCCCGCTGGAATACGACCCT	CGGAGCTGTTGGAAACCCTGGT
CaMir_04_R	GCCTAGAGTCTCAGGCCCCCGG	GCTCAGAGATGGCCTGCCGC
CaMir_04_S	CCGGATTTCCAATCACCCCA	TCGGCAATCCCTTTTTCCA
CaMir_05_R	CTGGAGATTCGCCACAGGTT	CAATTCAGGCAGCCCACAC
CaMir_05_S	ACCAGGGTTTCCAACAGCTCCG	CGGCATCGGCAATGACACTTGC
CaMir_06_R	ACTGGCTCGGGTGCTTCAGC	TGATGCAAACGCACTCCACATGT
CaMir_06_S	TGGCATCCCCTTGGCATTTTTGC	AACGCCACCGATGTTGACAAAGC
CaMir_07_R	TCGGCCGAGTCACACCGAGT	GAGGTCGAGGCCCGGACCAT
CaMir_07_S	CAGCCGTCGATGCAGATTTG	AAGAGACGTTTGGCCCTGAG
CaMir_08_R	AAGTGTTGTTTCGAGTGCCTCGTTG	AAGGGCCCAGGCAATGAAATTTGC
CaMir_08_S	ACCACCGGGTAAGGCTGACCA	TGAAGCCGTCGGTGTTC AAGGTTAC
Ubiquitina	AATCCGTCCCCGCATGTT	CCAGTGCATCCTGTTGTCTCA