



Identificação e caracterização funcional de genes em estudos comparativos dos genomas de *Mycosphaerella graminicola* e *Mycosphaerella fijiensis*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 237

**Identificação e caracterização
funcional de genes em estudos
comparativos dos genomas de
Mycosphaerella graminicola e
*Mycosphaerella fijiensis***

Natália Florêncio Martins

Roberto C. Togawa

Manoel Teixeira de Souza Jr.

Sandra Brammer

Ana Lidia Bonato

Antonio Nhani

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros:

Diva Maria de Alencar Dusi

Luiz Adriano Maia Cordeiro

José Roberto de Alencar Moreira

Regina Maria Dechechi G. Carneiro

Samuel Rezende Paiva

Suplentes:

João Batista Tavares da Silva

Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto: Montagem dos sintomas da Sigatoka Negra em cultura de banana cavendish (foto adaptada dos originais cedidos por H.D. Thurston).

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

-
- E 19 Identificação e caracterização funcional de genes em estudos comparativos dos genomas de *Mycosphaerella graminicola* e *Mycosphaerella fijiensis* / Natália Florêncio Martins... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 237).

1. Banana – doença fungica. 2. Fungo – *Mycosphaerella*. I. Martins, Natália Florêncio. II. Série.

634.772 – CDD 21

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	1
Introdução.....	1
Resultados	10

Identificação e caracterização funcional de genes em estudos comparativos dos genomas de *Mycosphaerella graminicola* e *Mycosphaerella fijiensis*

*Natália Florêncio Martins*¹

*Roberto C. Togawa*²

*Manoel Teixeira de Souza Jr.*³

*Sandra Brammer*⁴

*Ana Lidia Bonato*⁵

*Antonio Nhani*⁶

Resumo

A banana, segundo dados da FAO, a produção mundial de banana exportada alcançou a escala de 15,9 milhões de toneladas em 2004. A indústria de banana é uma importante fonte de renda e empregos em diversos países, destacando-se a América Latina, Caribe, Ásia e África. As bananeiras são afetadas, durante todo o seu ciclo vegetativo e produtivo, por um grande número de doenças, que podem ser causadas por fungos bactérias, vírus e nematóides. Entre as doenças fúngicas destacam-se o mal-do-Panamá, a Sigatoka-amarela e a Sigatoka-negra. Sigatoka Negra é uma doença muito mais agressiva e destrutiva que a Sigatoka Amarela, pois além de infectar as folhas novas ataca também as folhas velhas da planta. Como sintomas característicos, pode-se observar a descoloração em forma de pontos ou estrias na cor "café" entre e ao longo das nervuras secundárias da segunda à quarta folha, a partir da vela, observada somente na face inferior das folhas. Em muitos países produtores, inclusive o Brasil, a Sigatoka Negra é a praga mais importante na cultura da banana, principalmente se considerados os prejuízos econômicos e sociais provocados pela enfermidade nos locais onde ela foi registrada. O seqüenciamento dos genomas dos fungos *M. graminicola* e *M. fijiensis* contribui para o entendimento dos processos envolvidos na patogenicidade, na resistência e trará grandes contribuições para a comparação dos fungos patogênicos do gênero *Mycosphaerella*. Este trabalho relata os resultados obtidos com uma das participações brasileiras no consórcio sendo consolidada por meio da anotação e curadoria de parte do genoma de *Mycosphaerella graminicola* e da genômica comparativa, atualmente financiadas pelo CNPq. Destaca-se a descoberta de novos genes dentre as 8.974 sequências de *M. fijiensis* que foram comparadas ao conjunto de ESTs disponíveis no site do JGI de *M. graminicola*. O resultado do alinhamento revelou 4.139 sequências comuns entre os dois genomas e 1951 sequências exclusivas de *M.*

¹ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Ciência da computação, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Agrônomo, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Trigo

⁵ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Trigo

⁶ Biólogo, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Trigo

fijiensis. As sequencias mais representativas do conjunto de exclusivas foi anotado como sequencias associadas a transdução de sinal (Rho GDP), canais de água (aquaporinas), enzimas da síntese de açúcar (Endoglucanase) e enzimas da via de glioxalato. O conjunto de proteínas do genoma de *M. fijiensis* foi comparado ao genoma completo de *M. graminicola* usando o método Best reciprocal hits.

Abstract

According to FAO, The banana world production reached 15.9 million tonnes in 2004. The banana industry is a major source of income and support in several countries, especially Latin America, Caribbean, Asia and Africa. The bananas are affected by a large number of diseases that can be caused by fungal bacteria, viruses and nematodes. Among the fungal diseases are the Panama disease, yellow sigatoka and black sigatoka. Black Sigatoka disease is more aggressive and destructive than the Yellow Sigatoka, as it infects the new leaves and also attacks the whole plant. As symptoms, there is the discoloration and the formation of dots or streaks of color "coffee" between and along the secondary veins of the second to the fourth leaf from the candle, only observed on the underside of leaves. In many producing countries, including Brazil, the Black Sigatoka is the most important pest in the crop of banana, especially if considering the economic and social damage caused by the disease where it was recorded. The sequencing of the genomes of fungi *M. fijiensis* and *M. graminicola* contributes to the understanding of the processes involved in pathogenicity, resistance and bring great contributions to the comparison of the pathogenic fungi of the genus *Mycosphaerella*. This paper reports the results obtained in one of the Brazilian initiatives as participant of the GMGC consortium consolidated through the curation and annotation group of *Mycosphaerella graminicola* genome of and comparative genomics, currently funded by CNPq. The gene discovery is remarkable where the amount of 8,974 sequences from *M. fijiensis* have been compared to the number of ESTs available at the JGI from *M. graminicola*. The result of the alignment revealed 4,139 sequences in common between the two genomes and 1951 unique sequences of *M. fijiensis*. The sequence most representative of all the unique sequences were annotated as related to signal transduction (Rho GDP), water channels (aquaporin), enzymes in the synthesis of sugar (endoglucanase) and enzymes of the glioxalate synthesis pathway. The set of proteins of the *M. fijiensis* genome was compared to the complete genome of *M. graminicola* using the Best reciprocal hits.

Introdução

A banana, segundo dados da FAO, a produção mundial de banana exportada alcançou a escala de 15,9 milhões de toneladas em 2004. A indústria de banana é uma importante fonte de renda e empregos em diversos países, destacando-se a América Latina, Caribe, Ásia e África. Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), a Índia é o maior produtor mundial de banana, enquanto o Brasil ocupa o 2º lugar, com cerca de 9% do que é produzido mundialmente (Figura 1).

A bananicultura possui grande importância econômica e social no Brasil, sendo cultivada numa extensa região tropical, geralmente por pequenos agricultores. A cultura tem grande importância social, pois além da geração de empregos e ser uma das fruteiras mais plantadas no país.

A bananicultura ocorre em todos os estados brasileiros e é prática comum entre os agricultores familiares. Em 2005, o país produziu 6.703.400 t de banana, 1,8% a mais que em 2004.

Considerando sua importância nutricional, a banana é uma importante fonte de nutrientes, apresentando, em média, por 100g da fruta: 108,2 calorias; 1,2g de proteína; 0,2 g de gordura; 25,4 g de carboidratos; 9 mg de cálcio; 27 mg de fósforo; 0,6 mg de ferro; 50 mg de vitamina A; 11 mg de vitamina C; entre outros.

Além disso, 99% da fruta produzida é consumida no mercado interno, fazendo parte do hábito alimentar da população. Ainda, como complementação alimentar das populações de baixa renda, toda a produção brasileira destina-se ao consumo pelo mercado interno brasileiro.

São Paulo continua sendo o primeiro estado produtor do país, com 1.178.140 t (17,6% da produção nacional). A Bahia detém a segunda maior produção do Brasil (975.620 t, ou 14,6% do total) e teve um acréscimo significativo de produção entre 2004 e 2005 (11,8%), em razão de uma maior área colhida - a Bahia apresentou a maior área com bananicultura do Brasil em 2005 (70.896 ha). Santa Catarina é o terceiro estado em produção (668.003 t, ou 10,0% do total).

Atualmente, o mercado internacional de banana é dominado pelas bananas do subgrupo Cavendish. O Brasil produz a "Nanica" e "Nanicão" do subgrupo Cavendish, a segunda é igual àquelas da América Central.

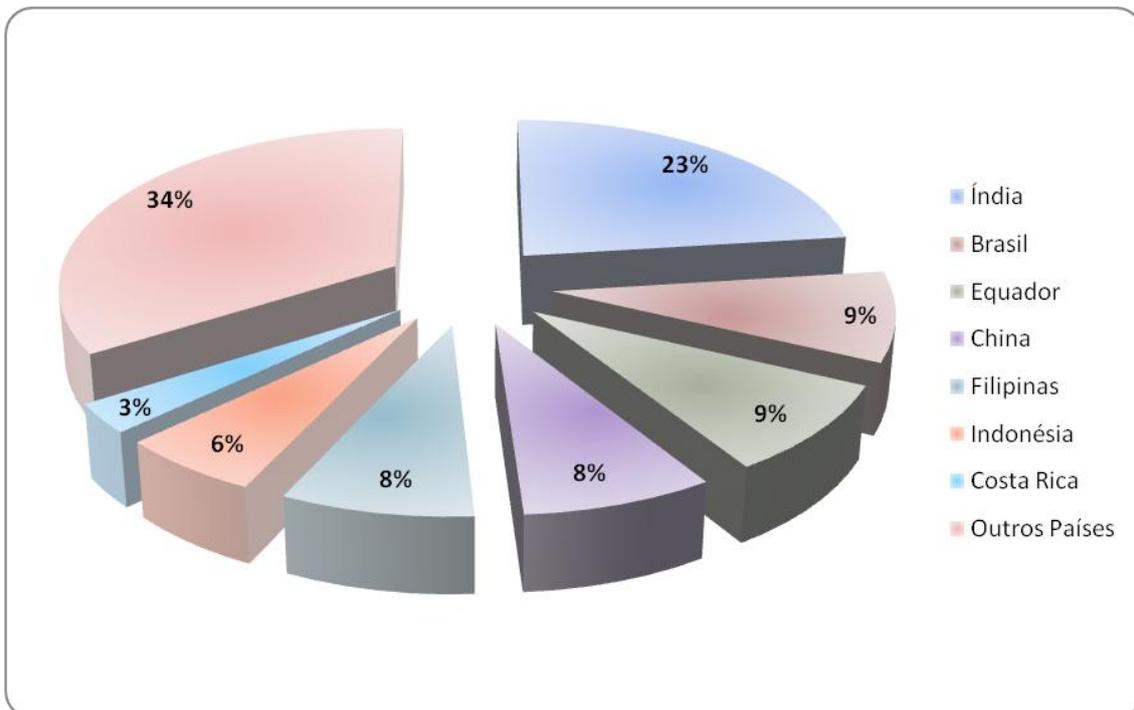


Figura 1: Distribuição média da produção Mundial de Banana por países no período de 2001 a 2005.

Ameaças a Bananicultura

As bananeiras são afetadas, durante todo o seu ciclo vegetativo e produtivo, por um grande número de doenças, que podem ser causadas por fungos bactérias, vírus e nematóides.

Entre as doenças fúngicas destacam-se o mal-do-Panamá, a Sigatoka-amarela e a Sigatoka-negra.

O Mal-do Panamá é causado pelo fungo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (E.F. Smith) Sn e Hansen, cujos sintomas se iniciam com o amarelecimento progressivo das folhas mais velhas seguindo para as mais novas. Seguindo-se pela murcha das folhas que secam e se quebram junto ao pseudocaule.

A sigatoka-amarela é causada por *Mycosphaerella musicola*, Leach (forma perfeita ou sexuada)/*Pseudocercospora musae* (Zimm) Deighton (forma imperfeita ou assexuada). Os principais sintomas aparecem como uma leve descoloração em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda à quarta folha, a partir da vela. Essa descoloração aumenta, formando uma estria de tonalidade amarela. Com o tempo as pequenas estrias amarelas passam para marrom e posteriormente para manchas pretas, necróticas, circundadas por um halo amarelo.

A Sigatoka-amarela é conhecida desde 1902 quando foram registrados os primeiros danos econômicos nas Ilhas Fiji no vale de Sigatoka e hoje está presente em todo o mundo. A

doença chegou ao Brasil em 1944 pela região Amazônica e na década seguinte já estava no Litoral Paulista e vale do Ribeira, em São Paulo.

A Sigatoka Negra é uma doença muito mais agressiva e destrutiva que a Sigatoka Amarela, pois além de infectar as folhas novas ataca também as folhas velhas da planta. Como sintomas característicos, pode-se observar a descoloração em forma de pontos ou estrias na cor "café" entre e ao longo das nervuras secundárias da segunda à quarta folha, a partir da vela, observada somente na face inferior das folhas. Estrias pretas, observadas somente na face superior da folha finalmente as lesões negras são visíveis na face superior da folha contrastando com cor verde folha (Figura 2). Em muitos países produtores, inclusive o Brasil, a Sigatoka Negra é a praga mais importante na cultura da banana, principalmente se considerados os prejuízos econômicos e sociais provocados pela enfermidade nos locais onde ela foi registrada.



Figura 2: Montagem dos sintomas da Sigatoka Negra em cultura de banana cavendish (foto adaptada dos originais cedidos por H.D. Thurston).

O Consórcio Internacional para o sequenciamento de fungos do genero *Mycosphaerella*

O sequenciamento dos genomas dos fungos foi objeto de discussão no Segundo Workshop em doenças causadas pela *Mycosphaerella* em folhas de bananeiras, ocorrido na Costa Rica em maio de 2002. Na ocasião foi sugerida a criação de um consórcio internacional para seqüenciamento do genoma de *Mycosphaerella fijiensis* cujo objetivo seria agregar grupos de trabalho em *M. fijiensis* e *M. Graminicola*. Um encontro preliminar ocorreu em Leuven em setembro de 2002, onde foi lançada a discussão para a organização do consórcio dentro da rede do PROMUSA (www.promusa.org). Em agosto de 2003, em Merida, México, os grupos de trabalho em *M. graminicola* e *M. fijiensis* interagiram pela primeira vez e concordaram em criar o Consórcio Internacional do Genoma da *Mycosphaerella* (CIGM).

A interação dos dois grupos de pesquisa, liderada pelos pesquisadores Gert Kema (PRI-Wageningen) e Stephen Goodwin (Universidade de Purdue – USA), apresenta uma série de

vantagens: filogeneticamente *M. fijiensis* e o *M. graminicola* representam dois modelos de espécies da ordem Dothideales que estão divididos suficientemente de modo a prover uma boa cobertura para o reino Fungi; o maior progresso nas pesquisas em *M. graminicola* beneficiaria o estudo em *M. fijiensis*; a coordenação conjunta do trabalho em genômica dos dois grupos permitiria a maior troca de informações e facilitando o progresso dos dois grupos; a agregação dos grupos permite a criação de uma massa crítica que facilitaria a captação de recursos para novos projetos. Os membros realizariam esforços para angariar recursos, fornecer ferramentas e conhecimentos e compartilhar com os outros membros do consórcio. As prioridades de pesquisa são (i) o seqüenciamento total dos genomas, (ii) a criação de projetos para a descoberta de genes e (iii) desenvolvimento de estratégias de comparação de dados. Até o momento dez organizações se uniram ao consórcio donde se estabeleceu um comitê de sete membros com a participação de três revisores externos nomeados pelo INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). No início do consórcio eram membros: CICY (México), CORPOICA (Colômbia), University of Queensland and the Boyce Thompson Institute (Australia), CORBANA (Costa Rica), CIRAD (França) e o Instituto de Pesquisas em Plantas da Universidade de Wageningen (Holanda). O Brasil foi incluído como membro fundador com a participação do pesquisador Manoel Teixeira Souza Jr, na época lotado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Em 2004 iniciou-se o seqüenciamento de *M. graminicola*, agregando novos membros ao consórcio. Dentre eles o JGI (DOE Joint Genome Institute) responsável pelo seqüenciamento e integração das ferramentas de análise dos genomas. Desta forma tornaram-se partícipes do projeto de seqüenciamento outras instituições, várias delas dos Estados Unidos como os laboratórios Lawrence Berkeley (LBNL), Lawrence Livermore (LLNL), Los Alamos (LANL), Oak Ridge (ORNL) e o centro de seqüenciamento do Laboratório de Genoma da Universidade de Stanford, o USDA-ARS, a Universidade de Purdue e a Universidade de Cornell. Da Europa somou-se ao grupo o Centro de Biodiversidade em Fungos (Utrecht, Holanda).

O seqüenciamento dos fungos *M. graminicola* e *M. fijiensis* irá contribuir para o entendimento dos processos envolvidos na patogenicidade, na resistência e trará grandes contribuições para a comparação dos fungos patogênicos do gênero *Mycosphaerella* (<http://www.promusa.org/research/mycosphaerella-genomics-report.pdf>), (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/CSP2006/mycosphaerella.html>); *M. graminicola*. O genoma da *M. graminicola* foi totalmente sequenciado pelo JGI, liderado pelos coordenadores do projeto G. Kema e S. Goodwin. Ao final da montagem de 491.294 reads foram colocados 129 "scaffolds" totalizando 41,2 MB com uma cobertura de 8.9X. O total de 11.395 modelos de genes preditos e anotados funcionalmente.

Para o *M. fijiensis* foram sequenciados, pelo JGI, o total de 602.555 reads e montados em 395 "scaffolds" totalizando 73,4 MB, sendo calculada uma cobertura de 7.11X do total do genoma do fungo. Ao todo, após processamento por bioinformática, foram preditos 10.327 modelos de genes.

Com a participação brasileira no consórcio sendo consolidada por meio da anotação e curadoria do genoma de *Mycosphaerella graminicola*, em junho de 2006, surgiram ramificações na área da bioinformática e da genômica comparativa, atualmente financiadas pelo CNPq até 2009.

A Sigatoka Negra no Mundo

O fungo foi descrito pela primeira vez em 1963 nas Ilhas Fiji, distrito de Sigatoka, com a denominação de estria negra da bananeira, sendo conhecido por *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Morelet) cuja forma perfeita é *Paracercospora fijiensis*.

Em seguida, a Sigatoka Negra se alastrou por outros países, sendo identificada por Mulder e Stover, em Honduras (1972), em seguida disseminou-se para Belice (1975), Guatemala (1977), Nicarágua (1979), México (1980), Costa do Pacífico (1981), Panamá - zona do Atlântico e Pacífico (1981), Colômbia (1986), Equador (1987) e Peru (1995). Nesses países a infecção encontra-se em estado avançado e atinge a quase totalidade das plantações. Estima-se que o prejuízo mundial alcance a escala de mais 2.5 bilhões de dólares por ano.

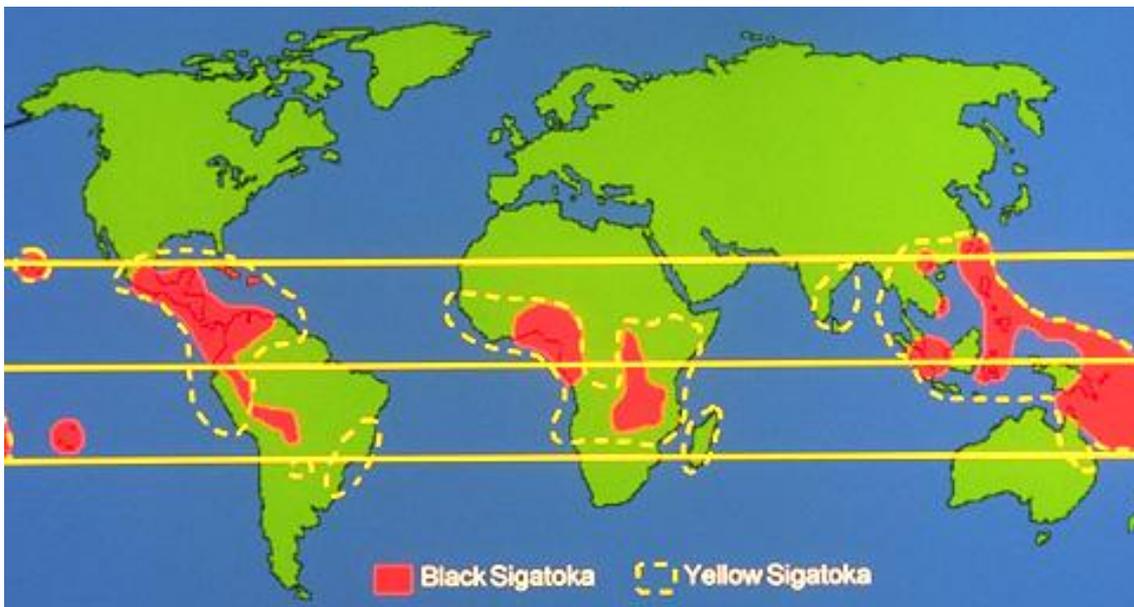


Figura 3: Mapa mundial das áreas atingidas por Sigatoka amarela e por Sigatoka negra.

A Sigatoka Negra no Brasil

A Sigatoka Negra se alastra nas folhas da bananeira, causando uma rápida decomposição foliar, reduzindo a capacidade fotossintética da planta, podendo causar-lhe a morte, antes mesmo da formação do cacho de frutos, e a conseqüente redução da produção da bananicultura.

Esta doença foi registrada no Brasil no início de 1998, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant, região do Alto Solimões, fronteira do Estado do Amazonas com Colômbia e Peru (referencia). Atualmente, encontra-se disseminada por quase todas as regiões do Brasil. Os estados do Amazonas, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima, Pará e Mato Grosso foram os primeiros a sofrerem com a doença que provocou o declínio do cultivo de bananas. Existem, contudo, alguns estados em que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu barreiras fitossanitárias que contém o alastramento da doença para outros estados.

Em muitos municípios brasileiros, cuja economia está centrada na produção de bananas, as perdas chegam a 100%. A transmissão via aérea dificulta a sua contenção e submete as culturas ao controle químico exclusivo. Além disso, como a cultura tem grande importância econômica e social, o resultado final pode ser desastroso, uma vez que o tamanho da fruta e seu vigor determinam a aceitação nos mercados.

O controle químico atual, implica num aumento do uso de fungicidas, aumentando o custo de produção. Não existem dados disponíveis sobre o consumo e aplicação de fungicidas no território brasileiro, mas dados da FAO relatam que em regiões da América Central chega a exigir entre 50 e 60 aplicações anuais de fungicida.

Fungos do gênero *Mycosphaerella*

O gênero *Mycosphaerella* é um dos maiores fungos patogênicos em plantas, possuindo mais de mil espécies, muitas das quais causando doenças de grande importância econômica em cultivares tropicais. Os fungos deste gênero causam grandes prejuízos econômicos nas culturas de banana, trigo, tomates, morangos, soja e outras. Dentre as espécies mais importantes estão a *Mycosphaerella graminicola* e a *Mycosphaerella fijiensis*. *M. graminicola* (estágio assexuado: *Septoria tritici*), é o agente causador da Septoriose, uma das doenças mais comuns e importantes para a cultura de trigo no mundo; e a *M. fijiensis*, causa a sigatoka negra, a doença mais economicamente significativa na cultura da banana.

O estudo dos fungos do gênero *Mycosphaerella* é de urgente necessidade, uma vez que o cultivo de trigo e banana passam a ser submetidos a enormes cargas de fungicidas trazendo um alto risco ao meio ambiente e a saúde humana.

a. *Mycosphaerella graminicola*

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) J. Schröt. in Cohn (anamorfo: *Septoria tritici* Roberge in Desmaz.) (teleomorfo: *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. In Cohn), causa a septoriose, uma doença responsável por perdas importantes na cultura de trigo no mundo. A incidência e o significativo crescimento da septoriose se deu a partir de 1960, quando os cultivares mais resistentes foram substituídos por cultivares locais, com características desejadas como: porte semi-não, maturação precoce, alta produtividade, os quais são considerados susceptíveis a *Mycosphaerella graminicola*. As perdas na produção podem alcançar 10-20%, devido ao menor peso dos grãos causado tamanho das sementes e o pouco enchimento dos grãos.

O fungo *Mycosphaerella graminicola* persiste nos resíduos culturais durante o verão e o outono. No período chuvoso o vento carrega os esporos para cultura causando a infecção em plantas em crescimento. Contudo a doença é geralmente dispersa pelas chuvas e pelo superfície do solo entre as plantas infectadas vizinhas.

Nas folhas, particularmente nos estômatos, os esporos germinam e penetram. O fungo se alimenta dos açúcares presente nas células, causando a morte celular e necrose na superfície foliar. Os sintomas da infecção se caracterizam por manchas de coloração marrom com pequenos pontos pretos, que são os corpos de frutificação do fungo. Os esporos são liberados no momento da frutificação para infectar as plantas vizinhas, que morrem prematuramente. O ciclo de vida do *M. graminicola* se assemelha muito ao ciclo de vida do *M. fijiensis*.

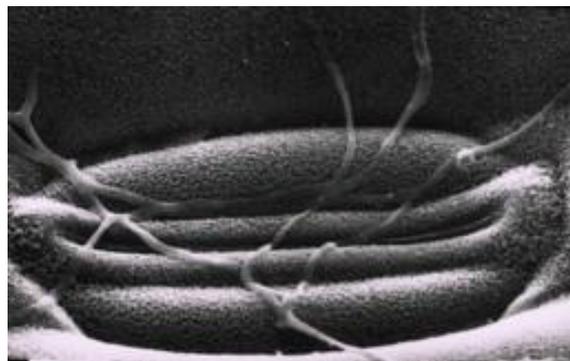


Figura 4: Micrografia de varredura da infecção de ascósporos de *M. graminicola* em estômato de folha de trigo.
Foto: Kema (2000), Wageningen University and Research Centre, Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands.

b. *Mycosphaerella fijiensis*

Pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares que levam a infecção e a forte virulência da Sigatoka Negra. Apesar de se saber que a doença afeta as principais variedades de bananeiras cultivadas atualmente como a prata, a nanica ou caturra e a maçã. Devido à destruição do limbo foliar pelo ataque do patógeno, ocorre conseqüentemente a redução da área fotossintética repercutindo na morte precoce das folhas e enfraquecimento da planta, diminuição do número de pencas e tamanho dos frutos, maturação precoce dos frutos, enfraquecimento do rizoma e perfilhamento lento.

A fase sexuada é caracterizada pela produção de grande número de ascósporos (esporos sexuais). Sendo considerada a fase mais importante no aumento da doença. As lesões causadas pela doença passa por vários estádios de desenvolvimento iniciando-se na fase de ponto ou risca e estria, progredindo até a fase final de manchas necróticas de coloração negra. O ciclo de vida se reinicia a partir da infecção dos ascósporos em estômatos, a partir da infecção ocorre a formação de espermogônias que por sua vez liberam os ascósporos que se dispersam pelo vento e chuva, atingindo outras partes da planta, como as folhas jovens.

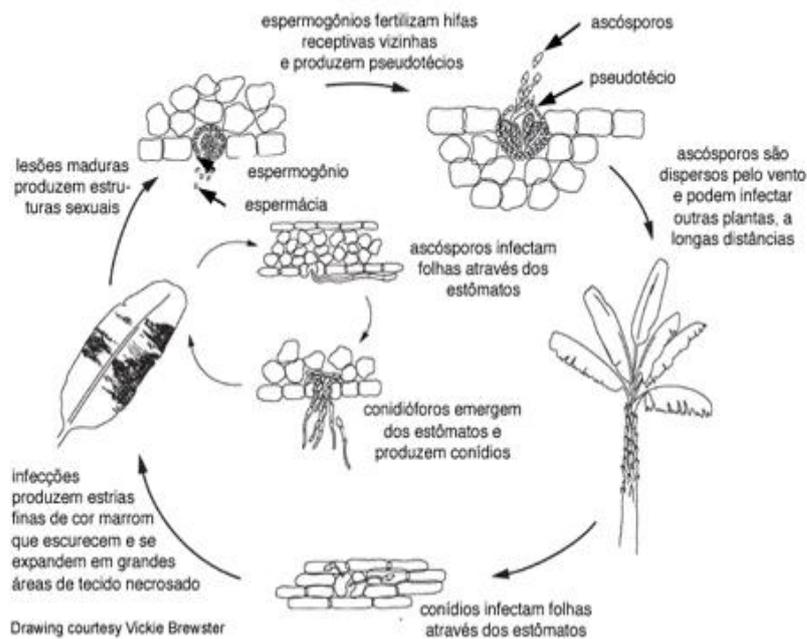


Figura 5 : Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* em bananeira.

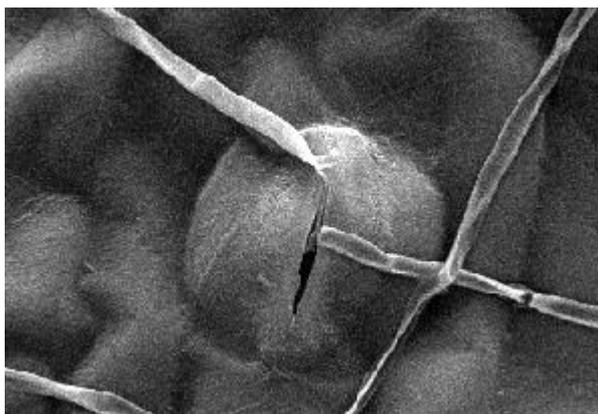


Figura 6: Mycografia eletrônica de varredura da infecção de *Mycosphaerella fijiensis* em folhas de bananeira. Foto cortesia de Kema (2000) . Wageningen University and Research Centre, Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands.

Objetivos do Projeto Mygene

A participação brasileira no consórcio internacional para o seqüenciamento do *Mycosphaerella* se consolidará com a execução do presente projeto. A realização do MyGene – Estudos comparativos dos genomas de *M. graminicola* e *M. fijiensis* possibilitará a geração de novas ferramentas para controle genético das doenças causadas por estes fungos. A comparação dos genomas de fungos do mesmo gênero permitirá a identificação de genes associados a patogenicidade, bem como fornecerá dados para o conhecimento da biologia dos fungos. Desta forma o conjunto de genes irá compor o primeiro banco de dados comparativo do gênero *Mycoesphaerella*, cuja utilização permitirá a identificação e caracterização funcional de processos metabólicos importantes para o controle destes fungos.

O projeto tem como principais objetivos:

- Identificar e caracterizar *in silico* genes relacionados à percepção e resposta a estímulos em *M. graminicola* e *M. fijiensis*; e
- Estabelecer base de dados genômicos destes patógenos afim de gerar, em futuros projetos de pesquisa e desenvolvimento, conhecimento e ferramentas que irão permitir ampliar as possibilidades de controle das doenças causadas por ambos os fungos: Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) na banana, e Septoriose (*Mycosphaerella graminicola*); e
- Criar um banco de dados de genes anotados relacionados a patogenicidade do fungo agente da Sigatoka negra;

As atividades sob a responsabilidade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia serão realizadas no Laboratório de Bioinformática (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/pt/>). As atividades de curadoria e mineração de genes de interesse biotecnológico (genes

relacionados à percepção e resposta a estímulos (Mecanismos de comunicação celular, transdução de sinal; defesa celular, patogenicidade e virulência) estão distribuídas pelos participantes das unidades: Embrapa –Trigo, Embrapa - Acre, Embrapa – Mandioca e Fruticultura e Embrapa – Labex Europa.

Resultados

c. Anotação de genes

Para a anotação dos 11.000 genes de *M. graminicola* e 10.327 genes de *M. fijiensis* foram usadas as ferramentas de anotação automática do JGI. Em seguida o grupo de curadores se dividiu em categorias, conforme as categorias do Gene Ontology e KOG. As análises do componente de ESTs de *Mycosphaerella* foram realizada por meio do sistema integrado de programas de análise e visualização de seqüências nucleotídicas e cromatogramas originais e sequencias. Após a análise de qualidade dos cromatogramas (PHRED) e eliminação de seqüências de vetores a serem selecionados, a qualidade da seqüência e o banco de dados para a busca. O pipeline de análise do sistema consistirá em realizar uma filtragem pela qualidade e extensão da seqüência nucleotídica pelos programas PHRED (referencia), seguido da limpeza dos segmentos com vetores e adaptadores pelo programa CROSSMATCH. Após a análise de qualidade dos cromatogramas (PHRED) e eliminação de seqüências de vetores a serem selecionados, as seqüências serão armazenadas no banco de dados através da hierarquia de projeto-biblioteca-placa-clone. Após armazenadas as seqüências são submetidas à fase de montagem através do programa TGICL, que gera os agrupamentos por similaridade e por qualidade. O resultado desta fase é a construção dos grupos de contigs e singletos.

O conjunto total de seqüências agrupadas foi confrontado a diferentes bancos de dados disponíveis através do programa de alinhamento BLAST e BLASTx. Os bancos disponíveis são espelhos dos bancos mantidos no GenBank e são atualizados uma vez por mês para os servidores do Laboratório de Bioinformática da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. O resultado das buscas foi analisado quanto a similaridade através do índice estatístico e-value menor/iguais a e-10, pela redundância da biblioteca, para o número de contigs e singletons; além de característica funcionais das proteínas (categorização) identificadas com grupos órtogos (GO). Outras ferramentas foram associadas à anotação como a possibilidade de identificação de microssatélites (Troll), oper reads frames (ORF Finder) e de mapas metabólicos (KEGG).

d. Mineração de dados e publicação

Uma vez anotados os genes serão divididos em dois grupos principais que são: os genes com anotação positiva e os genes inéditos. Para o conjunto de genes anotados positivamente ocorrerá a seleção através da submissão à metodologia de “virtual screening”, para identificação funcional e caracterização dos processos metabólicos e dos genes de interesse. O resultado de cada um dos “virtual screening” produziu informação necessária para identificação de genes estratégicos relacionados ao fenômeno de patogenicidade do fungo. Os dados gerados farão parte de um banco de dados de genes patogênicos disponibilizado e publicado de acordo com as regras de propriedade intelectual do consórcio.

As 8.974 sequências de *M. fijiensis* foram comparadas ao conjunto de ESTs disponíveis no site do JGI de *M. graminicola*. O resultado do alinhamento revelou 4.139 sequências comuns entre os dois genomas e 1951 sequências exclusivas de *M. fijiensis*. As sequências mais representativas do conjunto de sequências exclusivas foi anotado como sequências associadas a transdução de sinal (Rho GDP), canais de água (aquaporinas), enzimas da síntese de açúcar (Endoglucanase) e enzimas da via de glicoxalato. O conjunto de proteínas do genoma de *M. fijiensis* foram comparadas ao genoma completo de *M. graminicola* usando o método Best reciprocal hits

As sequências mais representativas do alinhamento das ESTs das duas espécies estão sumarizadas na tabela abaixo.

Tabela das sequências exclusivas da comparação entre *M. graminicola* e *M. fijiensis*

query fijiensis	Query access number	Organism	annotation	evalue
4410891:1	P48558	yeast	Uncharacterized vacuolar membrane protein YNL305C	5.00E-27
4411430:1	Q12434	GDIR_YEAST	Rho GDP-dissociation inhibitor (Rho GDI)	4.00E-39
4411947:1	P40037	HMF1_YEAST	Protein HMF1 (High dosage growth inhibitor)	2.00E-30
4410640:1	Q4WN99	DPH2_ASPFU	Diphthamide biosynthesis protein 2	5.00E-27
4410642:1	Q0UK85	NACA_PHANO	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (NAC-alpha)	9.00E-53
4410639:1	P87049	CGP1_SCHPO	G1/S-specific cyclin pas1	4.00E-19
4410643:1	Q96U60	NDC80_NEUCR	kinetochore protein ndc-80	2.00E-44
4410644:1	Q43061	MU136_SCHPO	Meiotically up-regulated gene 136 protein	2.00E-17
4410646:1	P32599	FIMB_YEAST	Fimbrin (ABP67)	e-125
4410647:1	P07685	HIS2_NEUCR	Histidine biosynthesis trifunctional protein	6.00E-95
4410650:1	P22152	CRNA_EMENI	Nitrate transporter (Nitrate permease)	e-111
4410652:1	P44016	Y561_HAEIN	oligopeptide transporter HI0561	1.00E-07
4411112:1	P29716	GUB_CLOTM	Beta-glucanase precursor (Endo-beta-1,3-1,4 glucanase)	1.00E-07
4411378:1	P22669	GUN_ASPAC	Endoglucanase-1 precursor (Endoglucanase I)	3.00E-18
4412974:1	AQP3_MOUSE	Q8R2N1	Aquaporin-3	5.00E-52
4415288:1			Aquaporin-3	
4418932:1			Aquaporin-3	
4415300:1	P12311	ADH1_BACST	Alcohol dehydrogenase	4.00E-26
4415463:1	P12398	HSP77_YEAST	mtHSP70	e-142
4415463:2			mtHSP70	
4415499:1	P40292	HSP90_ASPFU	Heat shock protein 90	0
4410776:1	P40920	HSP30_EMENI	30 kDa heat shock protein	5.00E-40
		HSP88_NEUCR	Heat shock protein Hsp88	
4411114:1	P43567	AGX1_YEAST	Alanine--glyoxylate aminotransferase 1 (serine also)	4.00E-76
4411910:1	P41943	GPR1_YARLI	Glyoxylate pathway regulator	1.00E-24
4411263:2	P11178	ODBA_BOVIN	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial precu	e-107
4410859:1	P47032	PRY1_YEAST	PRY1 precursor (Pathogen related in Sc 1)	3.00E-14
4412304:1	P35795	SC14_SCHCO	Fruiting body protein SC14 precursor	3.00E-16
4418827:1	P47032	PRY1_YEAST	Protein PRY1 precursor	5.00E-17
4413625:1	P28844	G3P_CURLU	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	e-164
4418954:1	Q96UL8	PPCK_EMENI	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	4.00E-35
4413237:2	Q96UL8	PPCK_EMENI	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	2.00E-43
4413237:3	Q96UL8	PPCK_EMENI	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	
4413237:4	Q96UL8	PPCK_EMENI	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	
4413237:5	Q96UL8	PPCK_EMENI	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	3.00E-33

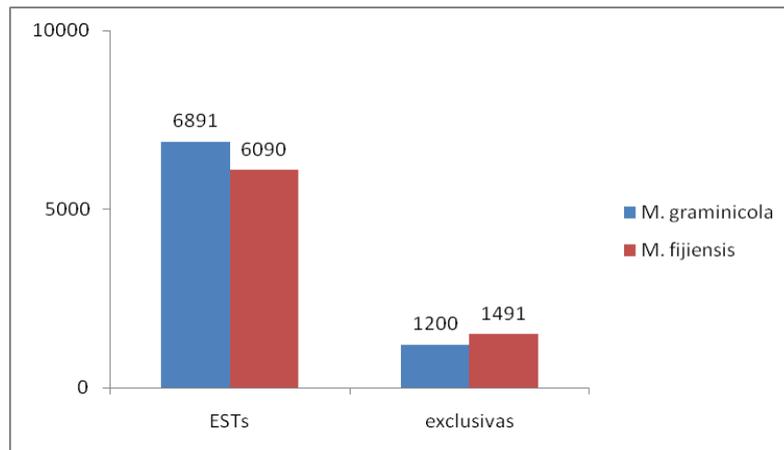


Figura 7: Resultado da comparação de todas as ESTs de *M. graminicola* e *M. fijiensis*.
Atividade 23.2. Exatidão biológica e visualização dos alinhamentos entre os genomas dos gêneros

Foram identificados três genes candidatos que são expressos exclusivamente em *M. fijiensis* e identificados como proteínas conhecidas. O restante dos genes exclusivos em *M. fijiensis* consiste proteínas não identificadas.

EST identif.	Proteína	GenBank	e-value	% ID
4415842:2	Thermostable beta-glucosidase (Gentiobiase)	B P14002	3E-6	32
4418064:1	N-acetyltransferase 9-like protein	Q9V9V9	3E-22	33
4411549:1	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	Q58EB4	4E-13	34

Até o momento foi possível eleger uma lista de candidatos e identificar alguns dos genes associados a interação planta patógeno. No momento temos uma lista de candidatos selecionados por meio de revisão bibliográfica como as proteínas sintetase de trna de histidina, receptores acoplados a proteínas G, as proteínas G subunidades alfa e beta, a peroxidase dependente de magnésio, as hidrolases de glicosídeos entre outros. A análise detalhada desses candidatos por meio de alinhamentos permite identificar características interessantes da estrutura-função das proteínas.

Este tema foi desenvolvido e entre os genes candidatos a proteína TAP42 destaca-se. A proteína TAP42 participa da via de sinalização TOR. A via de sinalização TOR (da sigla em inglês, Target of Rapamycin) pode ser ativada por fontes de nitrogênio e de carbono. Em *S. cerevisiae* uma alteração na fonte de carbono no meio de cultura aciona um grupo de genes de repressão catabólica. As proteínas TOR1 e TOR2 agem como sensores de carbono, ou sensores da qualidade de fontes de nitrogênio. A proteína TAP42 é uma

proteína chave na transdução do sinal recebido pelos sensores TOR1 e TOR2. A figura abaixo apresenta o modelo da via de sinalização TOR prevista para o fungo *M. fijiensis*.

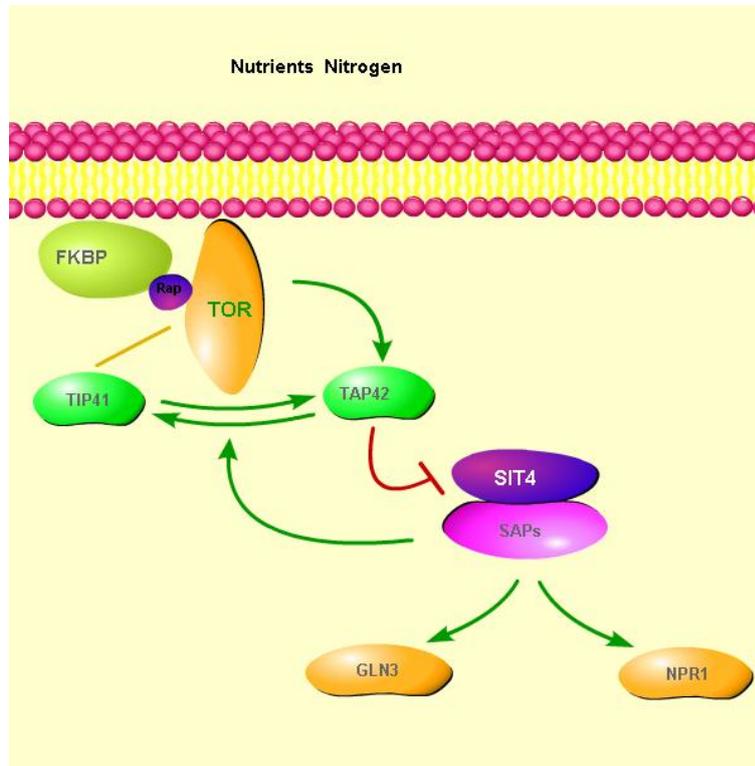
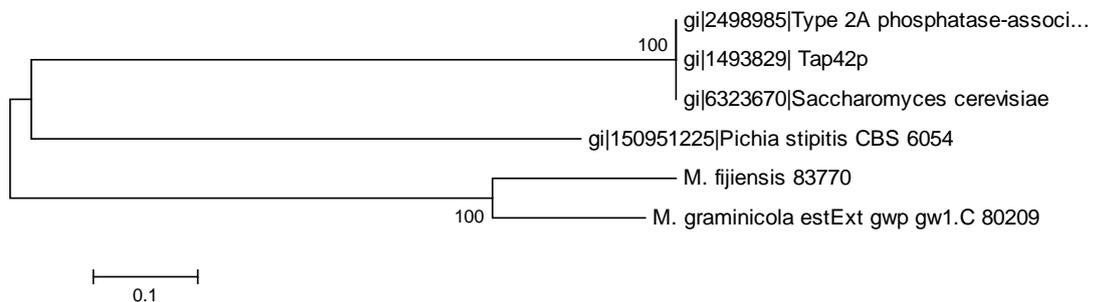


Figura 8: Modelo da via de transdução de sinal TOR em *M. fijiensis*.

A seqüência da proteína TAP42 foi alinhada usando o programa Clustal, com seus ortólogos. O alinhamento revela as regiões conservadas entre as proteínas, demonstrando as particularidades da seqüência de *M. fijiensis*.

Estudos filogenéticos entre os ortólogos mostram a formação dos cladros de TAP42 conforme mostra a figura abaixo.



As seqüências selecionadas foram submetidas a uma selecção aparando a oferecer total de genes. Clustering etapa foi realizada usando o servidor BAG (KIM e LEE, 2006). Seguido pela classificação de seqüências seleccionadas para identificar proteínas famílias. Algumas metas foram submetidos ao utilizando proteínas modelagem de homologia modelagem abordagem comparativa.

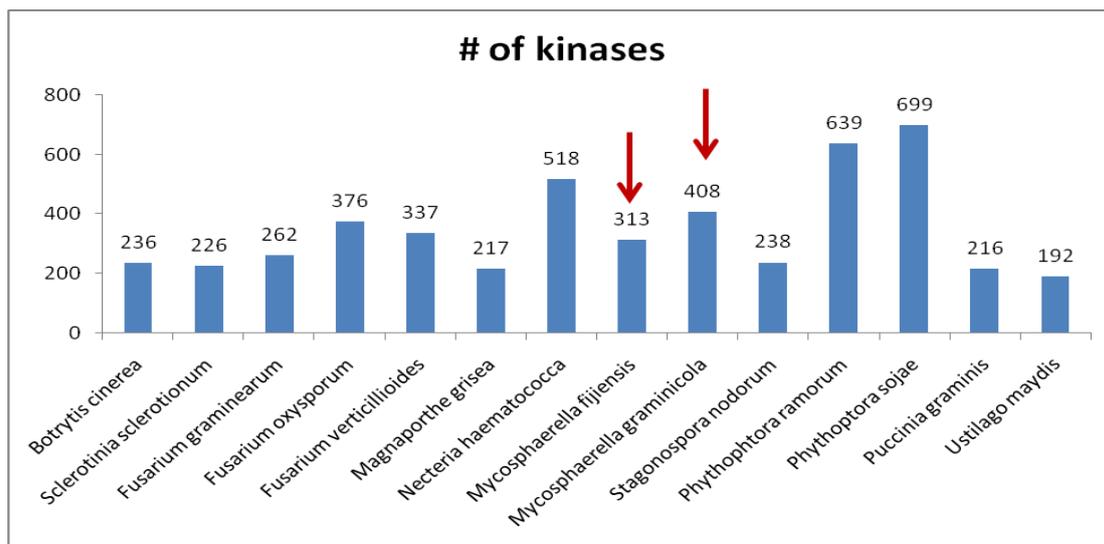


Figura 9: Numero de proteínas quinases em fungos ascomicetos e basidiomicetos.

As principais proteínas quinases foram alinhadas e a figura abaixo apresenta o alinhamento de uma delas.

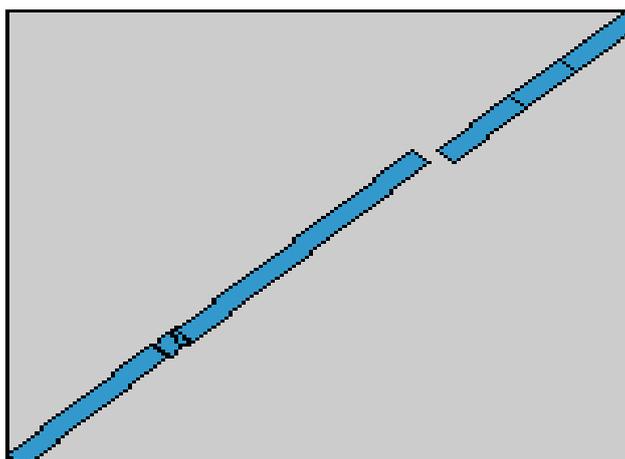
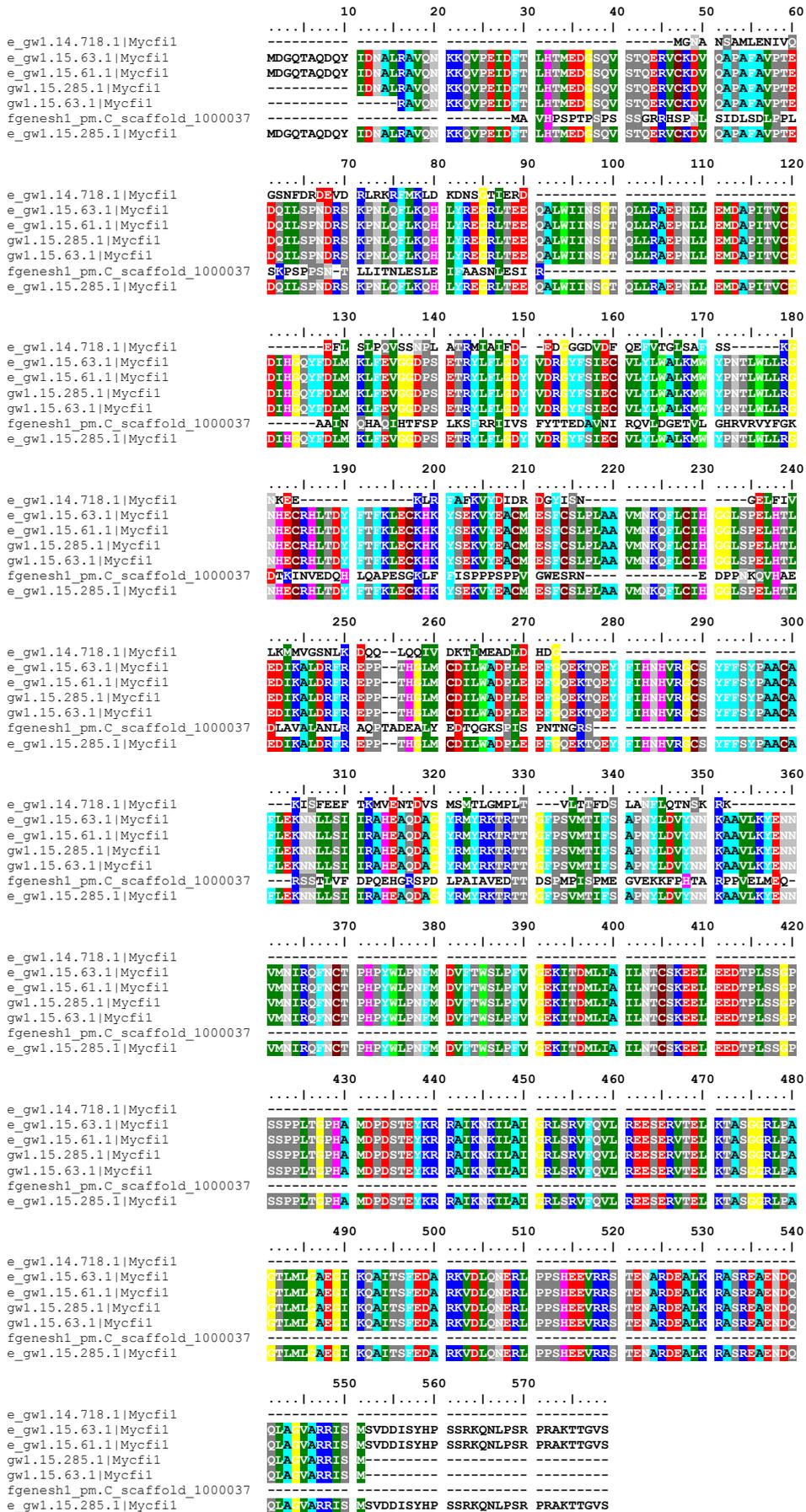
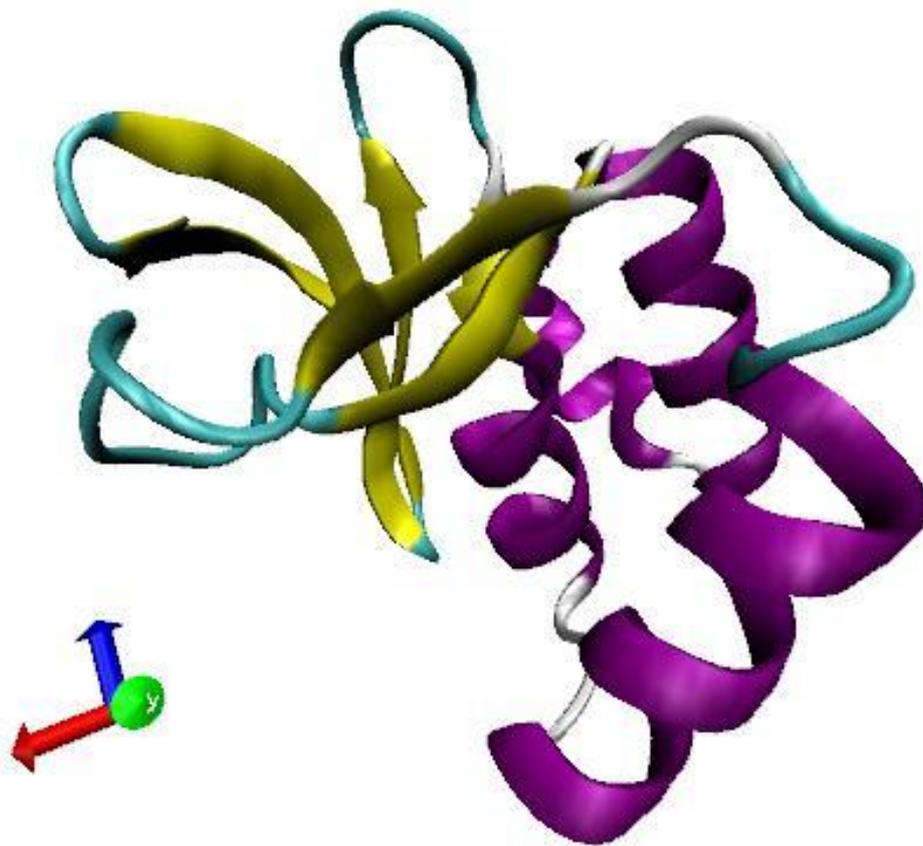


Figura :Alinhamento par-a-par de candidatas de *M. graminicola* and *M. fijiensis*.

Sequenciamento múltiplo de quinases do genoma de *M. fijiensis*.





Structure superposition

<u>Alpha Carbons</u>	<u>Back Bone</u>	<u>Heavy</u>	<u>All</u>
<u>RMSD</u>	0.02	0.03	0.18
<u>Atoms</u>	99	396	791
<u>Structure</u>	<u>Residues</u>		
PDBA	9-107		
PDBB	13-111		

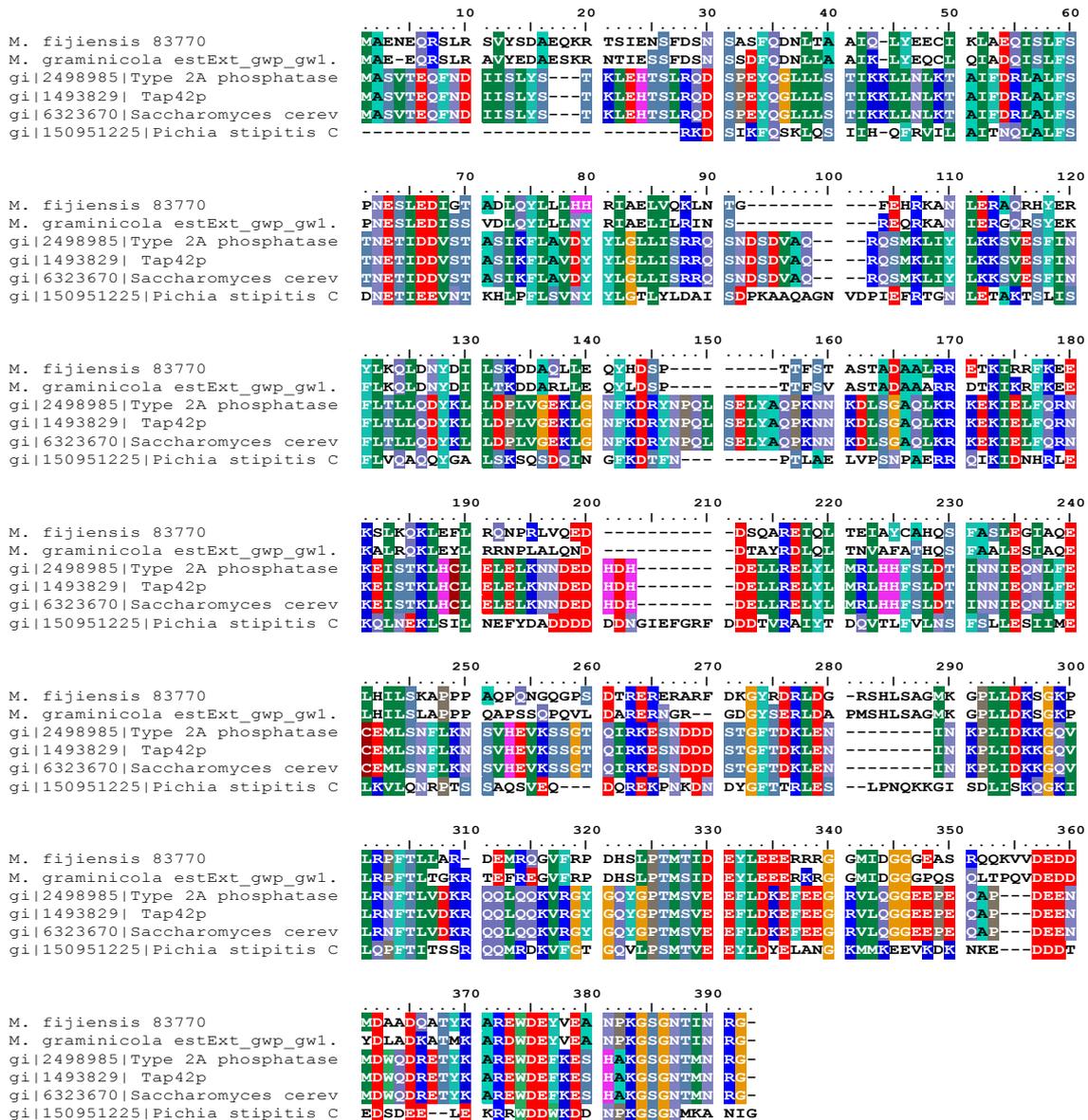


Figura 10: Alinhamento múltiplo de TAP42.

Seguindo-se os estudos comparativos para a sequencia da proteína TAP42, foi realizada a modelagem molecular da proteína e o modelo esta demonstrado na figura abaixo.

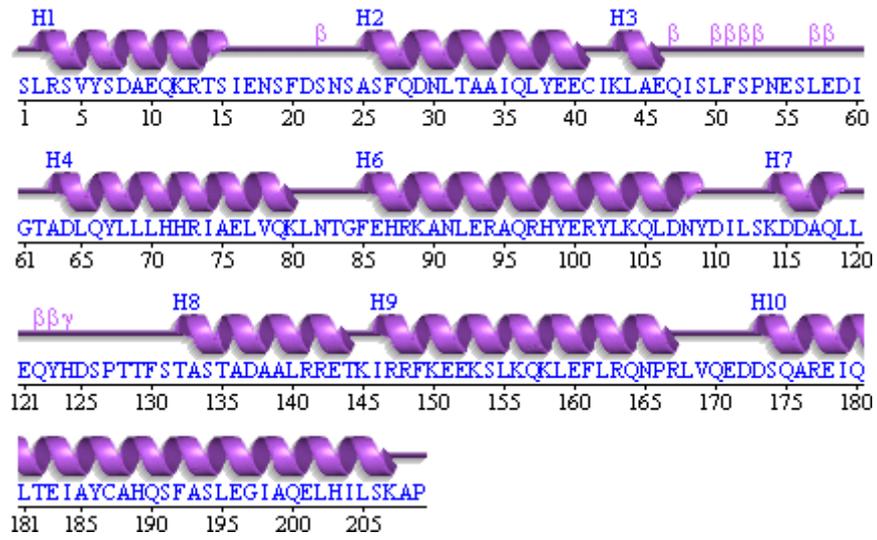


Figura 11: Predição da estrutura secundária do alvo TAP42.

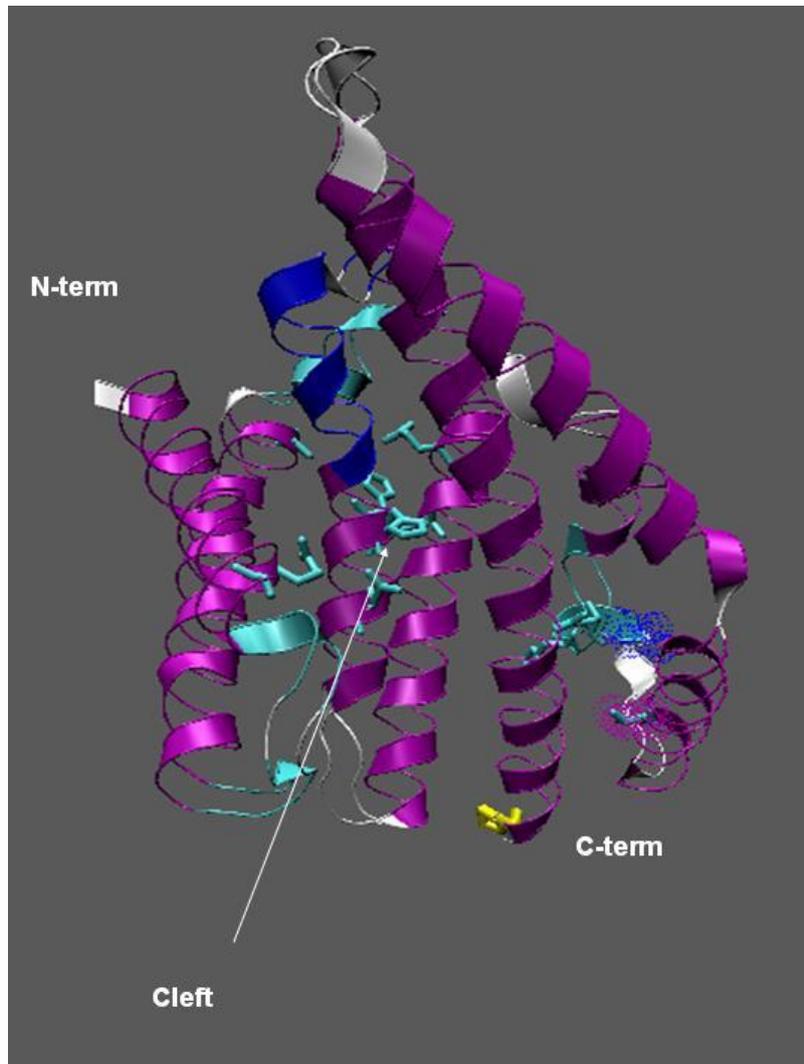


Figura 12: Modelo tridimensional da proteína TAP42 de *M. fijiensis*.

Decifrar os mecanismos moleculares envolvidos na infecção é importante para o controle de doenças devastadoras das culturas. Além disso, a comparação dos genes relacionados com a patogenicidade de diferentes fungos fornece insights sobre a evolução da interação patógeno-hospedeiro, assim, avançar a nossa compreensão da resposta específica entre o hospedeiro e a virulência, e da emergência de novas doenças. As modernas tecnologias de Sequenciamento levaram a um aumento notável nos dados genômicos disponíveis para identificar genes buscas por similaridade. Os principais genes envolvidos na patogenicidade em vários fungos foram compilados em PHI a base de dados. Com base nas proteínas experimentalmente comprovadas como envolvidas no conjunto de reações relacionadas à patogenicidade foram selecionadas 10 proteínas para o estudo em *M. fijiensis*.

Perspectivas

O avanço rápido da área de genômica comparativa traz uma grande perspectiva de descoberta de genes e seus mecanismos regulatórios. Por exemplo, em março 2000, foi reportada a comparação dos genomas da mosca de fruta contra o genoma humano. Neste estudo se descobriu que aproximadamente 60 por cento dos genes estão conservados entre as duas espécies. Isto quer dizer que os dois organismos parecem compartilhar de um núcleo dos genes que, entre estes, terços dos genes humanos envolvidos em algum tipo de câncer têm contrapartes similares na mosca de fruta. Mais recentemente, uma análise genômica comparativas de seis espécies levaram a comunidade científica a revisar significativamente a anotação dos genes de fungos e ainda predizer um conjunto novo de elementos funcionais que havia sido identificado sem função.

Apoiados em questões biológicas importantes como a patogenicidade de um agente infeccioso, a resposta a estresse e a resistência a doenças, a mineração dos genomas fornece um conjunto de dados que contribuem para o direcionamento de experimentos levando, conseqüentemente, ao desenvolvimento de produtos de controle de doenças e diagnóstico. A integração entre as informações geradas com aquelas publicamente disponíveis, para facilitar a utilização dos bancos de dados, é fundamental para essa abordagem.

A identificação de genes e vias metabólicas apresenta um desafio importante para a pós-genômica. Assim, uma busca dirigida e inteligente, por meio da abordagem comparativa, traz as vantagens da anotação automática, compreendendo as informações geradas pelas buscas em bancos de dados e integra a interferência humana, que dirige o estudo para um caminho lógico considerando dados experimentais e conhecimento da literatura. Uma varredura virtual dirigida é, portanto, uma alternativa estratégica para os grandes bancos de dados genômicos que apresenta melhor razão custo/ benefício.

A aplicação da abordagem comparativa para fungos fitopatogênicos está bem distante de outras realidades, como a dos genomas de mamíferos e insetos. Considerando que poucos fungos fitopatogênicos tem seu genoma completo até o momento, a saída foi restringir a estudos de vias e fenômenos pontuais. Contudo, o recente sequenciamento do genoma de *M. graminicola* provê um exemplo claro do que pode ser alcançado. Apesar de estar em fase de curadoria, o genoma está publicamente disponível, promovendo a oportunidade de descobertas de mecanismos celulares que possam levar ao controle da septoriose e da sigatoka negra.

Referências Bibliográficas

BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL, v. 195, p. 9-15, 2001.

BENNETT, R. S.; ARNESON, P. A. Sigatoka negra. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2006. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/Education/lessonsPlantPath/BlackSigatokaPortuguese/symptom.htm>>. Acesso em: 31 de out. de 2007.

CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana: fitossanidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 121p. (Frutas do Brasil, 8).

FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. de C. **Sigatoka Negra: como identificar e combater a Sigatoka Negra da bananeira**. São Paulo: Instituto Biológico. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=16>. Acesso em: 31 de out. de 2007.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, US, v. 91, p. 648-658, 2001.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, F. C. R. Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 4, p. 408-411, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582002000400013>. Acesso em: 31 de out. de 2007.

KEMA, G. H.; VERSTAPPEN, E. C.; WAALWIJK, C. Avirulence in the wheat septoria tritici leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* is controlled by a single locus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, US, v. 13, p. 1375-1379, 2000.

KEON, J.; ANTONIW, J.; RUDD, J.; SKINNER, W.; HARGREAVES, J.; HAMMOND-KOSACK, K. Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph Septoria Tritici). **Fungal Genetics and Biology**, Orland, US, v. 42, p. 376-389, 2005.

KIM, S.; LEE, J. BAG: a graph theoretic sequence clustering algorithm. **International Journal of Data Mining and Bioinformatics**, Geneve, v. 1, n. 2, p. 178-200, 2006.

RIVAS, G. G.; ZAPATER, M. F.; ABADIE, C.; CARLIER, J. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Oxford, GB, v. 13, p. 471-482, 2004.

ROHEL, E. A.; CAVELIER, N.; HOLLOMON, D. W. Microscopic analysis of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* infection using green fluorescent protein (GFP)-expressing transformants. **Pest Management Science**, Sussex, GB, v. 57, p. 1017-1022, 2001.

ROUX, N.; KEMA, G.; CARLIER, J.; GOODWIN, S.; CROUS, P.; LEBRUN, M. The international *mycosphaerella* genomics consortium. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SEPTORIA/STAGONOSPORA DISEASES OF CEREALS, 2003, Tunis, Tunisia. **Global insights into the septoria and stagonospora diseases of cereals**. 2003. p. 147. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=157956&pf=1>. Acesso em: 31 de out. de 2007.