

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CARACTERIZAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DO GENE DE RESISTÊNCIA ANÁLOGO 2 de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* EM *Coffea* spp.

Laiane Silva Maciel¹, Alícia Dutra de Oliveira Moreira², Fernanda Pereira da Silva¹, Amanda Dutra de Vargas¹, Willian Bucker Moraes¹, Marcelo Antonio Tomaz¹, André da Silva Xavier¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, laianesm@gmail.com, fernanda_bio2010@hotmail.com, amandadvargas@hotmail.com, willian.fito@gmail.com, tomazamarcelo@yahoo.com.br, andre.s.xavier@ufes.br

² Universidade Federal de Viçosa, Av. P H Rolfs, s/n, Campus Universitário - 36570-900 - Viçosa-MG, Brasil, aliciamoreira15@gmail.com

Resumo

No estado do Espírito Santo, tem sido relatada a incidência de espécies de *Fusarium* em *Coffea canephora* causando a morte de plantas. Recentemente, o gene de resistência análogo 2 (MaRGA2) de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* foi associado a resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Diante disso, o objetivo da presente proposta foi identificar e caracterizar *in silico* os genes homólogos de MaRGA2 nos genomas de *Coffea arabica* e *C. canephora*. As análises filogenéticas revelaram três proteínas de *C. arabica* (CaRGA2.19, CaRGA2.26 e CaRGA2.36) e três proteínas de *C. canephora* (CcRGA2.7, CcRGA2.16 e CcRGA2.23) que derivam de um mesmo ancestral comum de MaRGA2. A análise *in silico* das regiões promotoras dos genes MaRGA2, CaRGA2.26 e CcRGA2.7 revelou um perfil contrastante de elementos *cis* regulatórios relacionados a defesa contra fitopatógenos. Interessantemente, foram detectados sítios de ligação para repressores apenas na região promotora do gene CcRGA2.7. Esses resultados indicam que a modulação transcricional de CcRGA2.7 pode ser uma alternativa para a resistência a *Fusarium* spp. em *C. canephora*.

Palavras-chave: Bioinformática. Interação planta-patógeno. Resistência à murcha de fusário.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônoma – Agronomia

Introdução

O café é umas das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo, sendo o Brasil o país de maior destaque na produção e beneficiamento desse grão. Dentro do gênero *Coffea*, as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são as principais representantes na cadeia produtiva da cafeicultura (CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento 2023). Fatores bióticos como o ataque de pragas e incidência de doenças são responsáveis por perdas significativas na qualidade e produtividade dos cafeeiros. O uso de agrotóxicos para contornar essa situação elevam os custos de produção e aumentam o risco de danos ambientais e contaminação dos solos (VELÁSQUEZ *et al.*, 2020).

Boa parte das perdas econômicas nas principais regiões produtoras de café no país se deve ao ataque de patógenos fúngicos. Atualmente, no estado do Espírito Santo tem sido mencionado a associação de *Fusarium* spp. com sintomas de murcha e morte de plantas de *C. canephora* (BELAN, *et al.*, 2018). A maioria das espécies fitopatogênicas de *Fusarium* spp. sobrevivem no solo e são recalcitrantes as moléculas químicas disponíveis. Assim, a proteção do cafeeiro através da resistência genética surge como uma alternativa futura.

Um dos mecanismos de ativação do sistema imune de plantas em resposta ao ataque de patógenos é a imunidade desencadeada por efetores (ETI). Ao longo dos processos evolutivos as plantas desenvolveram a capacidade de reconhecer as proteínas efetoras por meio das proteínas de resistência (R). As proteínas codificadas pelos genes R reconhecem um efetor específico que é codificado pelo gene de avirulência (*Avr*). Os genes nomeados como genes de resistência análogos (RGA), caracterizados como putativos genes R, são considerados como elemento importante para a

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ativação da ETI na resposta de defesa da planta durante a interação com o patógeno (SILVA e MICHELI, 2020).

Recentemente, o gene *RGA2* presente em *Musa acuminata* ssp. *malaccensis*, aqui referido como *MaRGA2*, foi descrito conferindo resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC). Interessantemente, plantas de banana de outros genótipos que naturalmente são suscetíveis e contém o referido locus em baixa expressão, tornaram-se resistentes após a modulação da expressão do *MaRGA2*-like cognato (DALE *et al.*, 2017). Com base nesses relatos, o objetivo da presente pesquisa foi identificar e caracterizar *in silico* os genes homólogos de *RGA2* de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* nos genomas *C. arabica* e *C. canephora* com o intuito de fornecer pistas para futuras abordagens visando a proteção dos cafezais.

Metodologia

A sequência de aminoácidos da proteína MaRGA2 foi contrastada no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a ferramenta BlastP. No total foram selecionadas 200 proteínas, sendo 100 de *C. arabica* e 100 de *C. canephora*. Os parâmetros utilizados para a seleção das sequências foram os maiores valores de identidade (%) e e-value mais próximo de 0. A reconstrução da árvore filogenética foi realizada no software Mega-X (www.megasoftware.net) usando o método de máxima verossimilhança. A predição dos domínios proteicos foi acessada no software Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). As análises *in silico* da região promotora (2000 pb *upstream* ao primeiro ATG) dos genes *MaRGA2*, *CaRGA 2.26* e *CcRGA 2.7* foram conduzidas no software PlantPAN 4.0 (<http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/plantpan4/index.html>).

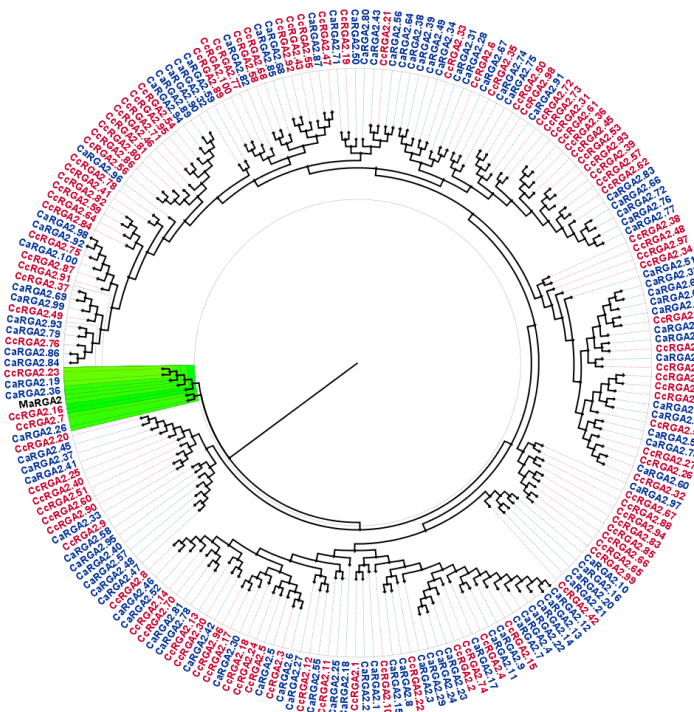
Resultados

As análises filogenéticas revelaram que a proteína MaRGA2 forma um agrupamento com seis proteínas, sendo três de *C. arabica* (*CaRGA2*) e três de *C. canephora* (*CcRGA2*). Esse resultado indica que possivelmente as proteínas desse agrupamento derivam de um mesmo ancestral comum (Figura 1). A arquitetura dos domínios proteicos presente no clado representado por MaRGA2 é caracterizado pela presença do domínio NB-ARC (Adaptador de ligação a nucleotídeos compartilhado por APAF-1, proteínas R e CED-4) que atua como um interruptor molecular que regula a ativação das respostas de defesa das plantas contra patógenos. Além disso, algumas proteínas apresentam o domínio LRR (Repetições ricas em leucina) ou RPT1 (Repetição interna 1), sendo que ambos já foram relatados por estarem envolvidos em ativação de respostas de defesa em plantas (Figura 2). Juntos esses resultados indicam que genes candidatos *CaRGA2* e *CcRGA2* são alvos potenciais para estudos sobre envolvimento desses genes na supressão dos efeitos deletérios da infecção por *Fusarium* spp.

As regiões promotoras dos genes *RGA2* em *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, *C. arabica* e *C. canephora* foram investigadas para compreender melhor os mecanismos regulatórios envolvidos no controle transcricional desses genes. Os genes *CaRGA2.26* e *CcRGA 2.7* foram selecionados por codificar proteínas que apresentam a arquitetura de domínios similares à MaRGA2. A análise *in silico* das regiões promotoras revelou um perfil de elementos *cis* regulatórios relacionados à mecanismos de defesa em resposta a fatores bióticos similar para os três genes. Dentre os elementos *cis* regulatórios podemos destacar a presença dos sítios de ligação para os fatores de transcrição AP2, bHLH, bZip, Dof, ERF, MYB, NAC e WRKY. Um ponto interessante é que foram detectados cinco sítios de ligação para o domínio de ligação LOB apenas na região promotora do gene *CcRGA2.7* (Figura 3).

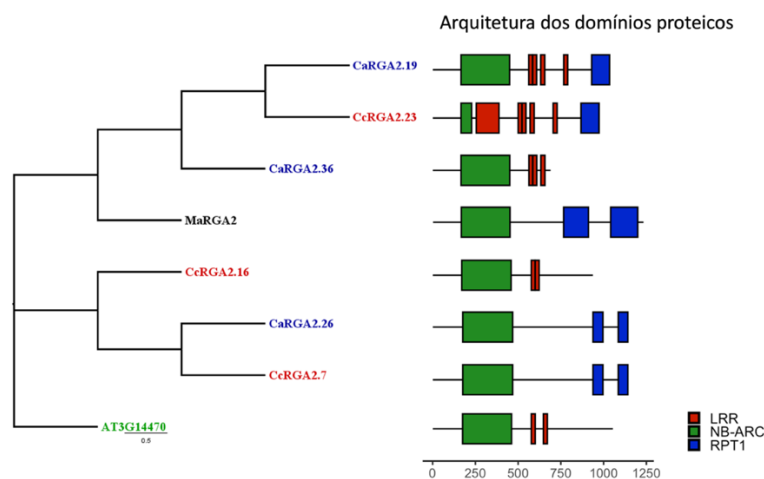
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 1 - Análise filogenética das proteínas RGA2 em *M. acuminata* ssp. *malaccensis*, *C. arabica* e *C. canephora*. A proteína MaRGA2 está representado em letra preta. As proteínas CaRGA2 em azul e as proteínas CcRGA2 em vermelho. O agrupamento formado pelas proteínas homólogas a MaRGA2 está representado por um sombreamento verde.



Fonte: o autor (2023)

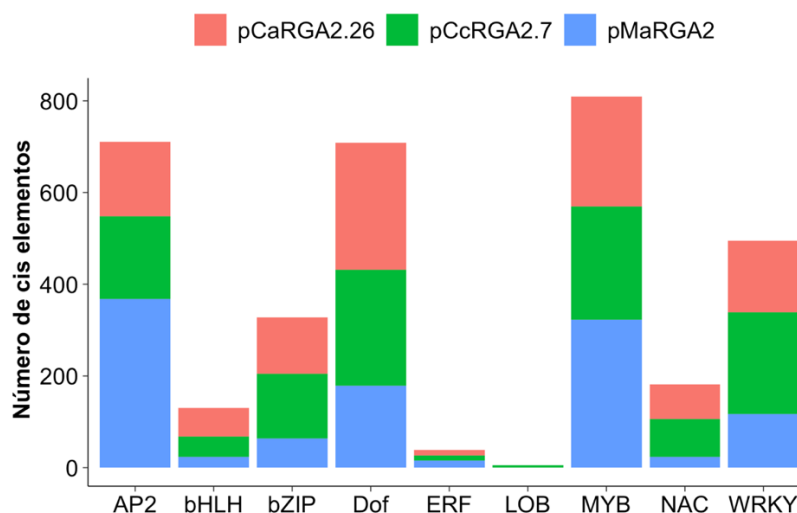
Figura 2 - Agrupamento das proteínas homólogas a MaRGA2 em *C. arabica* e *C. canephora* e a arquitetura dos domínios presente em cada proteína.



Fonte: o autor (2023)

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 3 - Análise *in silico* da abundância de elementos *cis* regulatórios na região promotora dos genes *CaRGA2*, *CcRGA2* e *MaRGA2*. Os elementos *cis* regulatório AP2, bHLH, bZIP, Dof, ERF, LOB, MYB, NAC e WRKY estão representados pelas cores rosa, verde e azul para pCaRGA2.26, pCcRGA2.7 e MaRGA2, respectivamente.



Fonte: o autor

Discussão

A busca por genes homólogos ao *RGA2* de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* em *C. arabica* e *C. canephora* foi conduzida com o intuito de fornecer pistas sobre a funcionalidade do gene *RGA2* na supressão dos efeitos deletéricos da infecção por *Fusarium* spp. Estudos anteriores mostraram que genótipos de plantas de banana suscetíveis ao Mal-do-Panama, doença causada pelo fungo FOC, tornaram-se resistentes após a superexpressão do gene *MaRGA2*. O controle da resistência a FOC foi explicado pelo maior acúmulo do *MaRGA2* em plantas resistentes à FOC, havendo claramente uma regulação qualitativa vinculada a presença/atividade de sequências regulatórias controlando a expressão do gene, pois plantas suscetíveis também carregam o *MaRGA2*, só que expresso em níveis basais (DALE *et al.*, 2017). Esses resultados fortalecem a hipótese de que a base da resistência de plantas às espécies do gênero *Fusarium* pode estar relacionada ao controle transcricional de genes da classe *RGA*.

Até o presente momento não existe relato da incidência da murcha de fusário em plantações de *C. arabica*. Diferentemente do que é observado em *C. canephora*, onde espécies de *Fusarium* foram associadas à murcha vascular letal (BELAN *et al.*, 2018). A resposta contrastante de *C. arabica* e *C. canephora* em campo ao complexo de espécies de *Fusarium* é um indicativo que os genes *CaRGA2.26* e *CcRGA2.7* podem apresentar um perfil transcricional diferente em cada espécie.

O perfil da abundância dos elementos *cis* regulatórios presentes nas regiões promotoras dos genes *MaRGA2*, *CaRGA2.26* e *CcRGA2.7* revelam a co-ocorrência de importantes sítios de ligação para fatores de transcrição relacionados a resposta de defesa contra patógenos. Dentre eles podemos destacar o WRKY que já foi descrito por regular a resistência de *F. oxysporum* em algodão (WANG *et al.*, 2022), bHLH que já foi relatado por atuar na resistência do milho à *F. graminearum* (CAO *et al.*, 2023), e MYB por regular positivamente a resposta de defesa à *F. oxysporum* em tabaco (LIU *et al.*, 2015).

Um ponto que difere na disposição dos elementos *cis* regulatórios é a presença de cinco sítios para ligação do fator de transcrição domínio LOB (LBD) que estão presentes na região promotora do gene *CcRGA2.7* e ausentes em *MaRGA2* e *CaRGA2.26*. Considerando que as espécies *M. acuminata* ssp. *malaccensis* e *C. arabica* não apresentam sintomas de murcha vascular associada a *Fusarium* spp., esse resultado pode ser um indicativo que o fator de transcrição LBD atua como um regulador negativo na resposta de defesa à *Fusarium* spp.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Em um estudo anterior o gene de *A. thaliana* *LBD20* (*AtLBD20*) foi caracterizado como um gene de suscetibilidade à *F. oxysporum*. *AtLBD20* atua como um regulador negativo de um conjunto de respostas dependentes de ácido jasmônico e *F. oxysporum* (THATCHER *et al.*, 2012). Diante disso, *CcRGA2.7* torna-se um gene candidato interessante para estudos futuros sobre a funcionalidade desse gene no patossistema *C. canephora* e espécies do gênero *Fusarium*.

Conclusão

As análises exploratórias realizadas na presente pesquisa indicam que o gene *CcRGA2.7* é um bom candidato para investigações posteriores sobre a sua funcionalidade no patossistema *C. canephora*-*Fusarium* spp. Caso a hipótese que a regulação transcricional do gene *CcRGA2.7* seja controlada negativamente por fatores de transcrição da classe LBD seja confirmada a ferramenta de edição de genomas CRISPR poderá ser utilizada para a geração de plantas de *C. canephora* resistentes a *Fusarium* spp.

Referências

- BELAN, L. L. *et al.* First report of *Fusarium* species associated with Fusarium wilt in *Coffea canephora* plants in Brazil. **Plant disease**, v. 102, n. 9, p. 1859-1859, 2018.
- CAO, H. *et al.* ZmMYC7 directly regulates ZmERF147 to increase maize resistance to *Fusarium graminearum*. **The Crop Journal**, v. 11, n. 1, p. 79-88, 2023.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café. 10:1–41, 2023.
- DALE, J. *et al.* Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1496, 2017.
- DE WIT, P. J. G. M. *et al.* Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular plant pathology**, v. 10, n. 6, p. 735-747, 2009.
- LIU, Z., LUAN, Y., LI, J. *et al.* A expressão de um gene MYB de tomate em tabaco transgênico aumenta a resistência a *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. **Eur J Plant Pathol**, v. 144, 2016.
- SILVA, R. J. S.; MICHELI, F. RRGPredictor, a set-theory-based tool for predicting pathogen-associated molecular pattern receptors (PRRs) and resistance (R) proteins from plants. **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2666-2676, 2020.
- THATCHER, L. F. *et al.* The lateral organ boundaries domain transcription factor LBD20 functions in Fusarium wilt susceptibility and jasmonate signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 407-418, 2012.
- VELÁSQUEZ, D. *et al.* A method for detecting coffee leaf rust through wireless sensor networks, remote sensing, and deep learning: case study of the caturra variety in Colombia. **Applied Sciences**, v. 10, n. 2, p. 697, 2020.
- WANG, L. *et al.* Group IIc WRKY transcription factors regulate cotton resistance to *Fusarium oxysporum* by promoting GhMCK2-mediated flavonoid biosynthesis. **New Phytologist**, v. 236, n. 1, p. 249-265, 2022.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fapes e CNPq, e com o suporte e estrutura da UFES Campus de Alegre-ES.