



ESALQ



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ**

PEDRO FERNANDO VILANOVA FERREIRA

Genômica comparativa de dois isolados de *Sporisorium scitamineum* com níveis diferentes de agressividade na doença do carvão da cana-de-açúcar

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas como parte do requisito de obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a. Claudia Barros Monteiro-Vitorello.

PIRACICABA

2022

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, planta pertencente ao gênero *Saccharum* L. do grupo das gramíneas, é cultivada em mais de 100 países e responsável por atender 80% da demanda de açúcar do mundo, rendendo uma variedade de produtos que vão desde produtos químicos a industriais (CHAMI et al., 2020; QAMAR et al., 2021). Para os anos de 2022/23, a produção global de açúcar deve apresentar um aumento de 1.7 milhões de toneladas, totalizando 182.9 milhões de toneladas. Dentro deste cenário, o Brasil é considerado o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar do mundo (USDA, 2022). A rápida expansão do cultivo da cana vem acompanhada de uma crescente demanda da indústria alimentícia mas, principalmente, pelo bioetanol (EL CHAMI et al., 2020). O bioetanol é um dos biocombustíveis mais difundidos mundialmente (BORDONAL et al., 2018), sendo que, em 2021, o Brasil foi responsável por 27% da produção global, atrás apenas dos Estados Unidos (RFA, 2021).

Entretanto, patógenos, especialmente fungos, possuem o potencial de diminuir a produção da cana-de-açúcar através de doenças, como, por exemplo, a doença-do-carvão, causada pelo fungo biotrófico *Sporisorium scitamineum*, considerada como a mais séria e largamente disseminada, capaz de gerar perdas significativas de rendimento em variedades suscetíveis (RAJPUT et al., 2021; BHUIYAN et al., 2021). Além de perdas de rendimento, a doença-do-carvão pode resultar em redução da taxa fotossintética e do conteúdo de sacarose, além de outros indicadores de qualidade do suco e apresentar perfil fitoquímico alterado (RAJPUT et al., 2021). O manejo desta doença se sustenta, principalmente, na utilização de variedades resistentes (SUNDAR et al., 2012; RAJPUT et al., 2021).

A severidade da doença-do-carvão depende do grau de resistência do genótipo do hospedeiro e também do nível de virulência do patógeno (NALAYENI et al., 2021). Apesar da existência de diferentes raças ser controversa e da dificuldade de se isolar a agressividade dos isolados devido à sensibilidade da interação planta-patógeno, o sequenciamento completo de genomas pode ser utilizado para elucidar como a variabilidade genética está relacionada à patogenicidade de diferentes isolados (BHUIYAN et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

O presente projeto visa sequenciar e comparar os genomas haploides isolados de células sexualmente compatíveis de dois indivíduos $2n$ (teliósporos) do fungo *Sporisorium scitamineum* contrastantes quanto à agressividade em cana-de-açúcar: as células do isolado menos agressivo SSC39A, SSC39B e do isolado mais agressivo SSC04A, SSC04B. Buscando, desta forma, elucidar se o nível de polimorfismos e/ou heterozigidade são determinantes para a agressividade do patógeno.

3. OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo: 1) Isolar o DNA dos isolados SSC04A, SSC04B, SSC39A, SSC39B; 2) Utilizar a plataforma Oxford/Nanopore de sequenciamento de *reads* longos; 3) Utilizar ferramentas computacionais para montagem dos cromossomos do fungo, predição dos genes e análises comparativas; 4) Identificar genes polimórficos; 5) Avaliar o nível de heterozigidade; 6) Selecionar genes candidatos para avaliar a expressão dos mesmos genes utilizando RT-qPCR na interação do fungo com as plantas resistentes e suscetíveis ao carvão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material fúngico

Neste projeto, serão utilizadas células leveduriformes haplóides dos isolados SSC39A, SSC39B e SSC04A, SSC04B de *S. scitamineum* disponíveis no “Laboratório de Genética de Microrganismos João Lúcio de Azevedo” da Universidade de São Paulo – campus ESALQ para a obtenção de DNA para o sequenciamento completo do genoma. As células leveduriformes serão crescidas em meio YM líquido (*Yeast Universal Medium*) a 28°C overnight para a extração do DNA.

4.2. Extração de DNA e Sequenciamento

A extração de DNA ocorrerá segundo protocolo de Schwessinger & Rathjen (2017). A integridade do DNA e quantidade serão checadas em eletroforese em gel de campo pulsado (TANIGUTI et al. 2015) e medidas usando o fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A biblioteca de sequenciamento MinION será preparada de acordo com o kit Genomic DNA by Ligation (SQK-LSK109) (Oxford Nanopore Technologies), NEBNext Ultra II End-prep

reaction/FFPE DNA Repair (New England Biolabs), Ligation Buffer (LNB), NEBNext Quick T4 DNA Ligase, e Adapter Mix (AMX), de acordo com as instruções da fabricante. Uma amostra de 1uL da biblioteca final eluída em 15uL do Nanopore Elution Buffer será quantificada e 5-50fmol serão utilizados para carregar a flow cell com 45 poros disponíveis (MinION Flow Cells (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies; FLO-MIN106_SQK).

4.3. Montagem do genoma, predição de genes e análise comparativa

A montagem da sequência *de novo* será realizada utilizando os parâmetros padrões para o programa Canu 1.8 (KOREN et al., 2017). O software RACON (<https://github.com/isovic/racon>) será utilizado para realizar a correção dos *reads*. Os genomas dos dois isolados de *S. scitamineum* serão avaliados utilizando a ferramenta Mummer (KURTZ et al., 2004). Genes serão preditos no genoma dos isolados utilizando o pipeline FunGAP (MIN et al., 2017).

5. CRONOGRAMA

	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Cultivo <i>in vitro</i> do fungo	x					
Isolamento do DNA dos isolados	x					
Sequenciamento		x	x			
Montagem do genoma			x	x		
Análises comparativas				x	x	
Identificação de genes polimórficos				x	x	
Escrita da monografia				x	x	x
Apresentação e entrega da monografia						x

Este projeto é financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no processo 143879/2021-9.

REFERÊNCIAS

Annual Ethanol Production. Renewable Fuels Association (RFA). Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BHUIYAN, S. A. et al. Sugarcane Smut, Caused by *Sporisorium scitamineum*, a Major Disease of Sugarcane: A Contemporary Review. **Phytopathology**, v. 111, n. 11, p. 1905-1917, 1 nov. 2021.

BORDONAL, R. de O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development** 2018 **38:2**, v. 38, n. 2, p. 1-23, 27 fev. 2018.

EL CHAMI, D. et al. What are the impacts of sugarcane production on ecosystem services and human well-being? A review. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 188-199, 1 dez. 2020.

KOREN, S. et al. Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 722-736, 1 maio 2017.

KURTZ, S. et al. Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome biology**, v. 5, n. 2, p. R12, 30 jan. 2004.

MIN, B.; et al. FunGAP: Fungal Genome Annotation Pipeline using evidence-based gene model evaluation. **Bioinformatics**, v. 33, n. 18, p. 2936-2937, 15 set. 2017.

NALAYENI, K. et al. Comparative expression analysis of potential pathogenicity-associated genes of high- and low-virulent *Sporisorium scitamineum* isolates during interaction with sugarcane. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2021.

QAMAR, Z. et al. Novel approaches to circumvent the devastating effects of pests on sugarcane. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-25, 14 jun. 2021.

RAJPUT, M. A. et al. Sugarcane Smut: Current Knowledge and the Way Forward for Management. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1095, 19 dez. 2021.

Sugar: World Markets and Trade. USDA. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/sugar-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 3 jun. 2022.

SUNDAR, A. et al. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisorium scitamineum*. **Botany**, v. 53, p. 107-128, 2012.

TANIGUTI, L. M. et al. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 12 jun. 2015.

Pedro Fernando Vilanova Ferreira

Pedro Fernando Vilanova Ferreira



Claudia Barros Monteiro-Vitorello



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** a Prof^a. Dr^a. **Claudia Barros Monteiro Vitorello**, Departamento de Genética, pelo período de **22/09/2021 à 21/09/2024**.

Piracicaba, 23 de agosto de 2021.

Prof^a. Dr^a. Wanessa Melchert Mattos
Presidente da CEAP/ESALQ/USP