**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Herança dos polimorfismos de restrição associados à região
subtelomérica de *Sporisorium scitamineum* em análise de
cruzamentos sexuais do fungo *in planta***

Daniel Prezotto Longatto

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Daniel Prezotto Longatto
Engenheiro Agrônomo

**Herança dos polimorfismos de restrição associados à região subtelomérica de
Sporisorium scitamineum em análise de cruzamentos sexuais do fungo *in*
*planta***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profª Drª **CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Longatto, Daniel Prezotto

Herança dos polimorfismos de restrição associados à região subtelomérica de *Sporisorium scitamineum* em análise de cruzamentos sexuais do fungo *in planta* / Daniel Prezotto Longatto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
97 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Segregação meiótica 2. Carvão da cana-de-açúcar 3. tel-RFLP 4. Cruzamentos controlados 5. Recombinação I. Título

CDD 633.61
L848h

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”.

Confúcio

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso”.

Albert Einstein

"Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada."

Immanuel Kant

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável".

Galileu Galilei

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."

Albert Einstein

"Todo conhecimento começa com o sonho. O sonho nada mais é que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada. Mas sonhar é coisa que não se ensina, brota das profundezas do corpo, como a alegria brota das profundezas da terra. Como mestre só posso então lhe dizer uma coisa. Contem-me os seus sonhos para que sonhemos juntos”.

Rubem Alves

*À DEUS, Santo Antonio, São Bento e Nossa Senhora
aos meus pais, Antonio Jorge e Eliana,
à minha irmã Carolina,
Com muito carinho dedico este trabalho
Muito obrigado por sonharmos juntos
E por me ajudarem a tornar realidade*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, e ao Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À minha orientadora Claudia Barros Monteiro Vitorello por todo apoio, acolhimento, ensinamentos, norteamento e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

À professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas – ESALQ, pela disponibilização das estufas utilizadas para cruzamentos sexuais do fungo.

Aos queridos Professor Antonio Oswaldo Roccia, Luciana Dias de Moraes e Silva, e mestrando Lucas Souza Lopes pelo amparo, engajamento, paciência, aconselhamento, carinho e orações nesta jornada que se encerra.

À Prof^a Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, e à Dra Giselle de Carvalho por toda disponibilidade, entusiasmo e inestimável apoio neste trabalho.

Aos técnicos, Ana, Beto, Carlinhos, Marcos, Rafael, Salete e Zezo e à Dra Mônica T. V. Labate por toda dedicação, carinho e disposição.

Aos meus amigos e companheiros do *Genomics group* do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”: Gislaine, Maria Carolina, Leandro, Juliana, Nathália, Leila, Patrícia, Suzane, Mariana, Tatiane, Gustavo, Ramon, Lucas, Pilar, Pedro, Filipe e Leonardo, pelas risadas, pela paciência, pelas palavras de apoio, por todas as confraternizações, reuniões, conversas, conselhos e disposição em ajudar, mesmo que apenas para molhar as caninhas e coletar os teliósporos.

Às colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas – ESALQ pelo apoio, convivência e afeto, especialmente Carmelice, Luciane, Carla, Alessandra, Cássia, Lourdes e Zirlane.

À minha família sem a qual nada disso teria sido possível, por todo amor, entrega, compreensão, preces, carinho, paciência e incontáveis momentos de apoio e inspiração, em especial meus pais Antonio Jorge e Eliana, minha irmã Carolina, meus avós Antonio (Nio), Ana, Maria Clementina e Angelino (*in memoriam*), meus tios, tias, primos e primas.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Cana-de-açúcar: produtividade e utilização	25
2.2 Doenças que afetam a cultura e o carvão da cana	26
2.3 Ciclo de vida de <i>Sporisorium scitamineum</i>	27
2.4 Reação sexual em <i>Sporisorium scitamineum</i>	32
2.5 Diversidade do patógeno	35
2.6 Regiões subteloméricas e origem da variação genética	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Inoculações de cana-de-açúcar com <i>Sporisorium scitamineum</i>	39
3.1.1 Material fúngico utilizado no primeiro ciclo da doença.....	39
3.1.2 Obtenção do segundo ciclo da doença	40
3.1.3 Obtenção do terceiro ciclo da doença	41
3.1.4 Inoculação de teliosporos produzidos no ciclo anterior da doença	42
3.1.5 Material vegetal utilizado	42
3.1.6 Preparo e Desinfecção dos minitoletes	42
3.1.7 Pré-germinação	43
3.1.8 Inoculações com teliosporos	43
3.1.9 Inoculações com esporídios de tipos de reação sexual compatíveis (selvagens e mutantes GFP)	43
3.1.10 Aclimatização dos minitoletes inoculados e cultivo protegido	44
3.2 Coleta dos chicotes	44
3.3 Coleta dos teliosporos (selvagens e mutantes GFP)	44
3.4 Isolamento de esporídios selvagens e mutantes GFP	45
3.5 Testes de compatibilidade para tipos de reação sexual (<i>plate mating type reaction</i>)	45

3.6 Avaliação da expressão do gene <i>gfp</i> em teliósporos e linhagens mutantes GFP	47
3.7 Técnicas gerais de biologia molecular.....	47
3.7.1 Extração do DNA total de esporídios haploides	47
3.7.2 RFLP da região subtelomérica	48
3.7.2.1 Digestão do DNA genômico e eletroforese	49
3.7.2.2 Transferência alcalina	49
3.7.2.3 Pré-Hibridização da membrana de DNA genômico	49
3.7.2.4 Preparo e marcação das sondas	50
3.7.2.5 Hibridização	51
3.7.2.6 Exposição e revelação	51
3.8 Estimativas de similaridade genética	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Coleta dos chicotes, isolamento de teliósporos e de esporídios haplóides	53
4.1.1 Primeiro ciclo da doença	53
4.1.2 Segundo ciclo da doença	55
4.1.3 Terceiro ciclo da doença	55
4.2 RFLP da região subtelomérica	56
4.2.1 Digestão do DNA genômico total dos esporídios e <i>Southern blotting</i>	56
4.2.2 Genotipagem das marcas tel-RFLP	57
4.3 Fenotipagem sexual e sua importância.....	67
4.4 Desvios de segregação para os tipos de reação sexual	71
4.5 Cruzamentos sexuais <i>in planta</i> utilizando esporídios e teliósporos	73
4.6 Detecção das marcas <i>gfp</i> na progênie F1 GFP e sua recombinação nos pró-basídios F1 GFP progênie F1 GFP	77
5 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

Herança dos polimorfismos de restrição associados à região subtelomérica de *Sporisorium scitamineum* em análise de cruzamentos sexuais do fungo *in planta*

A cana-de-açúcar constitui uma das principais fontes de alimento e de energia renovável no mundo. Entre os fatores bióticos que reduzem sua produtividade, destaca-se o carvão, doença causada pelo fungo biotrófico *Sporisorium scitamineum*, cujos danos à cultura podem ultrapassar 80%. No entanto, poucos estudos foram desenvolvidos sobre a genética desse patógeno. Assim, o presente trabalho estudou a dinâmica de marcas RFLP associados à região subtelomérica (tel-RFLP) e marcas GFP em três populações do patógeno (a, b e c) obtidas em ciclos sucessivos da doença. A população a inicialmente foi formada pela inoculação com teliósporos F1 oriundos do isolado 39 produzido em trabalho anterior (REIS, 2012). As populações b e c foram produzidas inicialmente por cruzamentos controlados. Estes envolveram como parentais esporídios haploides de tipos de reação sexual compatíveis e perfis tel-RFLP conhecidos. Na população b os esporídios parentais (18A e 39B) foram isolados de teliósporos distintos, apresentaram perfis tel-RFLP mais contrastantes e simularam fecundação cruzada. Na população c, os esporídios parentais 39A*gfp* e 39B*gfp* apresentaram perfis tel-RFLP mais semelhantes. Esses mutantes foram obtidos pela inserção heteróloga do gene *gfp* em esporídios obtidos de um único teliósporo simulando autofecundação (reação sexual intra-tétrade). A comparação entre os perfis de tel-RFLP dos esporídios selvagens e mutantes GFP detectou a inserção do gene *gfp* possivelmente na região subtelomérica do indivíduo 39A*gfp* (parental). A cada ciclo da doença teliósporos selvagens e mutantes GFP foram obtidos, sendo isolados dois esporídios para os cruzamentos controlados que levaram à produção do ciclo seguinte de doença. O uso de cruzamentos controlados possibilitou a produção de teliósporos idênticos geneticamente, permitindo inferir sobre eventos meióticos ocorrentes numa mesma progênie. A fenotipagem sexual dos esporídios que tiveram os perfis de tel-RFLP analisados reduziu o viés advindo do desvio da segregação esperada de 1:1 entre os tipos sexuais de esporídios pertencentes à mesma divisão meiótica. Além disso, auxiliou na detecção de recombinantes, visto que os *loci* de reação sexual segregam na meiose I. A análise das marcas tel-RFLP das progênies mutantes GFP e selvagens, obtida respectivamente em 1 e 2 ciclos da doença, evidenciou eventos de recombinação na segregação de cromossomos homólogos e eventos de recombinação homóloga. Mesmo apresentando número elevado, as marcas tel-RFLP foram capazes de rastrear indivíduos pertencentes a uma mesma população, o que poderá auxiliar em futuras avaliações epidemiológicas do carvão da cana-de-açúcar. Por fim, a expressão do gene *gfp* em células de pró-basídios mutantes possibilitou a detecção de recombinação homóloga associada a essa marca e a observação inédita de tétrades lineares de quatro células para essa espécie. Observou-se elevado potencial de utilização do gene *gfp* em estudos genéticos aplicados a esse patossistema. A recombinação sugerida na região subtelomérica mostrou frequência de recombinação ainda não descrita para essa espécie a ser estudada posteriormente.

Palavras-chave: Segregação meiótica; Carvão da cana-de-açúcar; tel-RFLP; Cruzamentos controlados; Recombinação

ABSTRACT

Inheritance of restriction polymorphisms of *S. scitamineum* subtelomeric region in fungal sexual crosses *in planta*

Sugarcane is a major source of food and renewable energy in the world. Among the biotic factors that reduce its productivity we highlight the sugarcane smut disease, caused by the biotrophic fungus *Sporisorium scitamineum*, whose damages to the crop can overpass 80%. However, few genetic studies have targeted this pathogen. Thus, the present work studied the dynamics of RFLP marks associated to the subtelomeric region (tel-RFLP) and GFP marks of three populations of the pathogen (a, b and c) obtained from consecutive disease cycles. Population a was initially formed with inoculation using teliospores F1 from the whip 39 obtained in previous work (REIS, 2012). Populations b and c were initially produced by controlled crosses of sexual compatible haploid sporidia with known tel-RFLP profiles as parents. In population b the parent sporidia (18A and 39B) were isolated from distinct teliospores, had more different tel-RFLP profiles (7 polymorphic marks) and simulated outcrossing. In population c, the parental sporidia 39Agfp and 39Bgfp had more similar tel-RFLP profiles. These mutants were obtained by heterologous insertion of gfp gene in sporidia obtained from single teliospore, simulating selfing (intra-tetrad mating type). The comparison between wild-type and GFP mutant sporidia tel-RFLP profiles had detected the gfp gene insertion in the subtelomeric region of the individual 39Agfp (parent). For each disease cycle wild-type and GFP mutant teliospores were obtained and two sporidia were isolated to perform controlled crosses that lead to the next disease cycle. The use of controlled crosses resulted in the production of genetically identical teliospores, which allowed inferring about same progeny meiotic occurring events. The sexual phenotyping of the sporidia that had their tel-RFLP analyzed reduced the bias resulted from deviation of expected 1:1 ratio segregation among the mating types of same meiotic division progeny. Besides, it helped in the recombinants detection, due to mating type loci segregation in meiosis I. The analysis of wild-type and GFP mutant progenies tel-RFLP marks, obtained for 2 and 1 disease cycles, has pointed out events of homologous chromosomes recombination and crossing-over events. Despite of the high amount of marks obtained, the tel-RFLP marks allowed the tracking of individuals from the same population, which can benefit future sugarcane smut disease epidemiologic evaluations. Moreover, the gfp gene expression of mutant pro-basidium cells led to the detection of crossing-over involving the GFP mark and the first observation of linear four-cells tetrads to this species. A high potential use of gfp gene in genetic studies applied to this pathosystem was observed. The recombination suggested for the subtelomeric region showed a recombination frequency haven't described for this species that needs to be further studied.

Keywords: Meiotic segregation; Sugarcane smut disease; tel-RFLP; Controlled crossings; Recombination

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo vital do fungo fitopatogênico *Sporisorium scitamineum* em interação com seu hospedeiro, a cana-de-açúcar.....22
- Figura 2 - Metodologia para obtenção das populações de *S. scitamineum* ao longo de ciclos sucessivos de infecção em cana de açúcar. As setas pretas indicam as inoculações realizadas. As progênies obtidas empregadas no estudo de marcas tel-RFLP e de marcas GFP estão assinaladas em negrito.....41
- Figura 3 - Fotos do crescimento leveduriforme e micelial filamentoso de *S. scitamineum* em placas de meio YM. a) auto combinação de colônia monoclonal de esporídios haplóides (à esquerda); b) combinação entre colônias monoclonais de esporídios haplóides incompatíveis no *locus* b (no centro); c) Formação de micélio dicariótico pela combinação de colônias haplóides compatíveis no *locus* b (à direita). Fotos de autoria própria, 201246
- Figura 4 - Etapas principais da metodologia empregada para análise da região subtelomérica de esporídios parentais e obtidos a partir da progênie F1. A. Coleta chicote em casa de vegetação. B. Chicote seco evidenciando massa de teliósporos. C. Isolamento e germinação *in vitro* de teliósporos selvagens e mutantes GFP – microscopia de luz aumento de 1000x. D. Separação de culturas monoclonais de esporídios a partir da inoculação feita com (C). E. Culturas monoclonais de esporídios - microscopia de luz aumento de 400x. F. Testes de compatibilidade sexual em placa realizados com as progênies obtidas em (D). G. Extração do DNA genômico das linhagens. H. Obtenção de marcas RFLP associadas à região subtelomérica via *Southern blotting* e hibridização com sonda pTel13. Fotos de autoria própria (2012, 2013, 2014).....52
- Figura 5 - Fotografia de um gel de agarose 0,6% preparado com tampão TBE 0,5x evidenciando a restrição completa do DNA genômico de esporídios haplóides F1 da população c com a endonuclease *EcoRI*. A. Marcador 1Kb ladder (Fermentas), B. Ssc39Agfp (parental 1), C. Ssc39Bgfp

(parental 2), D a M. Esporídios F1(39Agfp x 39Bgfp) de teliósporo 2 GFP. D. 7A, E. 8A, F. 12A, G. 16A, H. 26A, I. 11B, J. 19B, K. 23B, L. 24B, M. 33B, N. DNA genômico do esporídio Ssc 19B não digerido, O: Marcador *Lambda* cortado com *Hind*III (Fermentas)56

Figura 6 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais 39A, 39B, 39Agfp e 39Bgfp sugerindo a detecção da inserção da cópia do gene *gfp* na região subtelomérica do esporídio 39Agfp. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*.....57

Figura 7 – Autoradiografia que mostra a progênie GFP F1 (39Agfp x 39Bgfp) do pró-basídio 2 e de seus parentais GFP. Cada canaleta apresenta os perfis tel-RFLP correspondentes à hibridização com a sonda ptel13, e constitui parte da diversidade obtida pela restrição do DNA desses indivíduos. A.39Agfp (parental 1), B.39Bgfp (parental 2), C a L. Esporídios F1(39Agfp x 39Bgfp) de teliósporo 2 GFP. C. 7A, D. 8A, E. 12A, F. 16A, G. 26A, H. 11B, I. 19B, J. 23B, K. 24B, L. 33B, M. As setas indicam bandas polimórficas, sendo a marca do esporídio 39Agfp assinalada com dois asteriscos possivelmente associada à inserção do gene *gfp* na região subtelomérica do mesmo. As marcas assinaladas com um único asterisco são exclusivas da progênie F1 GFP, sendo decorrentes de recombinação homóloga58

Figura 8 - Dendrograma referente às marcas tel-RFLP dos esporídios parentais 39Agfp e 39Bgfp e das progênies GFP F1 dos pró-basídios 1 e 2. Observam-se eventos de recombinação entre progênies e entre esporídios de mesmo tipo sexual e de tipos sexuais distintos. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*60

Figura 9 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais 18A e 39B e as respectivas progênies F1 e F2 (cujos esporídios F1 empregados como parentais estão circulados em preto). A maior quantidade de variação inicial gerou padrões de

interpretação mais complexa. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*62

Figura 10 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios 39A e 39B e das progênes F1 e F2 da população a. Os esporídios F1 empregados como parentais para a produção da progênie F2 estão circulados em preto. Eventos de recombinação foram observados entre esporídios do mesmo tipo de reação sexual e entre esporídios de tipos distintos de reação sexual na progênie F2. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*63

Figura 11 - Dendrograma obtido mediante comparação das 41 marcas tel-RFLP dos 60 esporídios empregados nesse trabalho, pertencentes às populações a, b e c. Evidenciou-se maior parentesco entre o grupo formado pela população a (teliósporos) e a população c (GFP), em razão de ambos serem descendentes do chicote 39 (REIS, 2012). Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*66

Figura 12 - Dendrograma das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais GFP e da progênie do pró-basídio 1 F1 (39A gfp x 39B gfp) de *S. scitamineum* evidenciando recombinação entre cromossomos homólogos durante a meiose I (asterisco). Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*67

Figura 13 – Esquema da reação sexual envolvendo os *subloci* a e b que leva à formação da hifa dicariótica infectiva. As setas pretas indicam a interação entre os produtos gênicos produzidos pelos genes que os codificam. Os núcleos azuis indicam o tipo de reação sexual ‘A’ e os núcleos vermelhos o tipo de reação sexual ‘B’, o sistema de reconhecimento químico e de formação do fator de transcrição heterodimérico foram adaptados de Bölker, 2001.....69

Figura 14 - Resultado das inoculações utilizando teliósporos e esporídios haplóides sexualmente compatíveis. A, B e C. Plantas assintomáticas cv RB 92-5345 aos 20, 40 e 55 dai (testemunhas na primeira fileira), D, E, F. Chicotes F1 colhidos das populações a, b e c, respectivamente. Na fotografia E, além do chicote apical, observou-se a superbrotção, sintoma secundário que aparece em algumas plantas infectadas com o carvão mesmo durante o período de incubação. Fotos de autoria própria, 2012, 2013 e 201473

Figura 15 - Expressão das marcas *gfp* dos indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp* utilizados como parentais nos cruzamentos controlados que originaram a população c. Imagens de microscopia de luz (A, D, G, J), microscopia de epifluorescência (B, E, H, K) e sobreposição de ambas (C, F, I, L) referentes, respectivamente aos esporídios 39A selvagem (controle negativo), 39B selvagem (controle negativo). 39A*gfp* e 39B*gfp*. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 201478

Figura 16 – Expressão das marcas *gfp* dos pró-basídios GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) da população c. Imagens de microscopia de luz (A, F, K), microscopia de epifluorescência (B, G, L) e sobreposição de ambas (C, H, M). Esquemas dos fenótipos observados (D, I, M) e inferências sobre os genótipos observados (E, J, O) respectivamente referentes a um pró-basídio selvagem F1 (18Ax39B) da população b (controle negativo); a um pró-basídio GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) e um pró-basídio GFP F1 recombinante *gfp* evidenciando uma tétrade linear de 4 células. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 201479

Figura 17 – Estrutura genética do núcleos das células produzidas pelo pró-basídio ao final da meiose II. Os esporídios foram posicionados próximos aos pontos de brotação. As células com núcleo azul são produtos da meiose II da célula que ficou dentro da parede do teliósporo na meiose I. As células com núcleo vermelho representam as outras duas células produzidas pela célula que migrou durante a meiose I81

Figura 18 - Expressão das marcas *gfp* de esporídios da progênie GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*). Imagens de microscopia de luz (A, D, G, J), microscopia de epifluorescência (B, E, H, K) e sobreposição de ambas (C, F, I, L) referentes, respectivamente aos esporídios 27A*gfp*, 39A*gfp*, 25B*gfp* e 28B*gfp*. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 2014.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coleção de teliósporos e esporídios de <i>S. scitamineum</i> empregados como parentais e pertencentes às progênies produzidas em três ciclos sucessivos de inoculações de cana-de-açúcar	54
Tabela 2 – Proporção entre os tipos de reação sexual 'A' e 'B' observados entre esporídios de <i>S. scitamineum</i> obtidos pela germinação de teliósporos <i>in vitro</i>	72

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta da família Poaceae notável pela elevada síntese de biomassa vegetal e acúmulo de fotoassimilados sob a forma de sacarose em seus colmos, empregada principalmente na produção de açúcar, etanol e energia elétrica nas usinas, e alimentação animal (MOORE, 1987; VETTORE et al., 2003; GOLDENBERG, 2007; ROCHA et al., 2007; DE SOUZA et al., 2008). Dentre os fatores limitantes a sua produtividade, destacam-se doenças como o carvão, causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum*, presente em todas as áreas de cultivo comercial da cana-de-açúcar (COMSTOCK, 2000). Atualmente, o manejo fitossanitário da cultura recomenda o uso de cultivares com elevada resistência ao carvão para compor a maior parte dos talhões e o tratamento térmico dos toletes anterior ao plantio (COMSTOCK, LENTINI, 2005; TOKESHI, 2005). Contudo, o carvão nunca deixou de ser encontrado em plantios comerciais (BITTENCOURT, 2008). Com a assinatura do protocolo de cooperação entre o governo do estado de São Paulo, maior produtor brasileiro de cana-de-açúcar, e a União da Indústria Canavieira do estado, estabeleceu-se a proibição da queimada dos canaviais até 2017 (BRASIL, 2002). Apesar dos benefícios ambientais, a ascensão do sistema de colheita da cana crua tem aumentado a pressão fitossanitária sobre a cultura. Isso porque sem a queimada, os teliósporos e células leveduriformes saprofíticas do fungo podem permanecer no solo e nas soqueiras, permitindo haver sua reinfecção durante as rebrotas (BOCK, 1964; BITTENCOURT, 2008; FIGUEIREDO, 2008).

Juntamente com as demais espécies de fungos causadoras de carvão, *S. scitamineum* é um parasita de tecidos meristemáticos (STOLL et al., 2003; STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005). A infecção desses tecidos jovens do hospedeiro é realizada por apressórios produzidos por hifas dicarióticas (Figura 1). A formação das hifas dicarióticas, por sua vez, ocorre pela reação sexual (*mating type reaction*) entre hifas haplóides produzidas por esporídios haplóides de tipos sexuais distintos. Os esporídios, por sua vez, são originados da meiose do pró-basídio, estrutura resultante da germinação do teliósporo (esporo sexual diplóide) (ALBERT; SCHENCK, 1996; IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007; MOOSAWI-JORF; IZADI, 2007). Cada pró-basídio produzirá quatro esporídios, sendo dois esporídios de cada tipo de reação sexual, sendo possível a reação sexual entre esporídios produzidos por um mesmo pró-basídio ou por diferentes pró-basídios. Considerando ainda o ciclo de

vida do fungo, os teliósporos são produzidos pelo chicote, modificação do meristema apical da cana-de-açúcar que constitui o principal sintoma e sinal da doença. Diferentemente de outros fungos fitopatogênicos, os fungos causadores de carvão necessitam interagir com seus hospedeiros para produção dos esporos sexuais, sendo considerados biotróficos (BANUETT, 1995).

Figura 1 – Ciclo vital do fungo fitopatogênico *Sporisorium scitamineum* em interação com seu hospedeiro, a cana-de-açúcar.

Existe relato de favorecimento da autofecundação (*mating* intra-tétrede) entre esporídios oriundos de um mesmo pró-basídio para compor a hifa dicariótica que iniciará um novo ciclo de infecção do fungo. Como consequência, haverá menor chance de ocorrência da fecundação cruzada, isto é, a reação sexual entre esporídios produzidos por diferentes pró-basídios (BANNUET; HERSKOWITZ, 1994; HARTMANN; KAHMANN; BÖLKER, 1996). Em termos populacionais, a maior chance de ocorrência de autofecundação (50%) repercutiu na menor diversidade genética observada dentro e entre populações de *S. scitamineum* utilizando-se os marcadores microssatélites e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) por outros grupos de trabalho (FISCHER; HOLTON, 1957; RABOIN, 2007).

Apenas parte do ciclo de vida do fungo é restrito a planta, isto é, a formação de teliósporos viáveis à meiose. As demais fases do ciclo (esporídios haplóides e hifas dicarióticas) podem ser obtidas *in vitro* com certa facilidade (IZADI; MOOSAWI-JORF, 2006). A diversidade genética de isolados do patógeno coletados em canaviais de diferentes estados brasileiros também foi estudada por este grupo através de marcas RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) associadas à região subtelomérica e AFLP. A análise conjunta dessas marcas em haplóides originários de um mesmo teliósporo sugeriu que a autofecundação seja o método mais provável de cruzamentos em condições de campo (REIS, 2012) como predito anteriormente (RABOIN et al., 2007). Contudo, a presença de indivíduos heterozigotos para esses marcadores (REIS, 2012) considerando as progênes de esporídios motivou a continuidade do estudo genético aplicado sobre a região subtelomérica de *S. scitamineum* e o seu papel em ciclos sucessivos da doença. Obtiveram-se dois grupos distintos de isolados considerando a análise desses marcadores (REIS, 2012). Os esporídios 18A e 39B, de tipos de reação sexual compatível utilizados em cruzamentos sexuais no presente trabalho foram isolados cada qual de um desses dois grupos estabelecidos no trabalho anterior (chicotes 18 e 39, respectivamente). Cada um deles foi obtido de locais diferentes de produção canieira do país e apresentaram perfis de RFLP contrastantes entre si. Os esporídios 39A e 39B, de tipos de reação sexual compatíveis entre si e portadores de perfis de RFLP muito semelhantes, também foram isolados a partir de um mesmo teliósporo do chicote 39 em trabalho anterior (REIS, 2012). Esses indivíduos sofreram eventos distintos de agrotransformação para inserção heteróloga de cópia única do gene que codifica a expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Após a mutação, esses indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp* expressaram a proteína GFP tanto cultivados separadamente *in vitro* ou quando formou-se o micélio dicariótico resultante da combinação desses dois indivíduos em placa de Petri. No entanto, restava saber o micélio formado *in vitro* seria capaz de infectar a cana-de-açúcar, razão pela qual esses indivíduos também foram utilizados em cruzamentos controlados neste trabalho.

A partir das informações sobre os tipos de reação sexual, a presença de marcas GFP e marcas RFLP, foram estabelecidas neste trabalho três populações do patógeno visando atender aos seguintes objetivos:

- a) Avaliar a herança de polimorfismos de restrição associados à região subtelomérica de *Sporisorium scitamineum* em cruzamentos sucessivos na planta.
- b) Verificar a possibilidade da ocorrência de cruzamento entre indivíduos oriundos de populações diferentes e geneticamente distintos (18A x 39B).
- c) Identificar variantes genéticos em ciclos sucessivos de cruzamentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar: produtividade e utilização

A cana-de-açúcar é uma planta da família Poaceae de metabolismo C4 altamente produtiva, notável pela elevada capacidade de acumular açúcares sob a forma de sacarose em células do parênquima dos internódios (MOORE, 1987; ROCHA et al., 2007), podendo alcançar até 20% de seu peso seco (PAPINI-TERZI et al., 2009). Os colmos são formados por nós e internódios. Cada nó apresenta meristema intercalar, uma gema nodal situada acima da cicatriz foliar formada pelo encaixe de uma folha mais velha, e primórdios radiculares (MOORE, 1987). Esses primórdios, por sua vez, irão formar o sistema radicular primário da cana-planta quando se realiza o plantio dos toletes. Além do parênquima de reserva de carboidratos sob a forma de sacarose citado anteriormente, os internódios apresentam sistema vascular e epiderme coberta por cera (MOORE, 1987; ROCHA et al., 2007). A cultura corresponde a uma das mais importantes fontes de energia renovável (DE SOUZA et al., 2008; GOLDENBERG, 2008). A sacarose, extraída e purificada em usinas, é utilizada como alimento, sendo um dos subprodutos desse processo, o melaço, fermentado para produção de bioetanol nas destilarias (VETTORE et al., 2003; DE SOUZA et al., 2008). O bagaço da cana é consumido nas caldeiras dessas indústrias, num processo de conversão de energia térmica em mecânica que movimenta geradores de energia elétrica (WACLAWOVSKY et al., 2010).

A cana-de-açúcar atualmente tem sido plantada em mais de 100 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial (FAO, 2012), com aproximadamente 715 milhões de toneladas colhidas em 2013 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2013). As cultivares comerciais modernas dessa cultura são híbridos interespecíficos complexos originados das espécies *Saccharum officinarum* chamada de cana nobre, naturalmente mais rica em sacarose, e *Saccharum spontaneum*, mais fibrosa e mais tolerante a doenças. O complexo *Saccharum* possui também contribuições de *S. robustum*, *S. barberi* e *S. sinense* (IRVINE, 1999; GRIVET; DANIELS; CUADRADO et al., 2004; GRASZMANN; D'HONT, 2004; MING et al., 2010). A resistência genética a doenças é grandemente visada no desenvolvimento de novos genótipos de cana-de-açúcar. Isso se observa

não apenas devido ao dano gerado pelas doenças, mas, sobretudo pela inviabilidade financeira e menor eficiência de outras estratégias de manejo fitossanitário dessa cultura em relação ao controle através da resistência.

2.2 Doenças que afetam a cultura e o carvão da cana

As principais doenças que acometem a cultura da cana-de-açúcar e reduzem significativamente sua produção incluem as ferrugens alaranjada e marrom, o carvão, a escaldadura das folhas, o raquitismo das soqueiras, as podridões abacaxi e de *Fusarium* sp, e o mosaico da cana-de-açúcar - SCMV (SANGUINO, 1998; TOKESHI, 2005).

Cosmopolita, o carvão se destaca entre as doenças fúngicas (TOKESHI, 2005; SUNDAR, 2012), tendo sido relatado inicialmente na África do Sul em 1877 (ANTOINE, 1961). Em 1946 foram descritas as primeiras ocorrências da doença acometendo as cultivares POJ36 e POJ21 no município de Assis – SP, tendo havido disseminação para as demais áreas produtoras do país ao longo dos anos (BERGAMIN FILHO et al., 1987; RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA JUNIOR, 2009). Na década de 80 registrou-se a maior epidemia da doença no Brasil, em razão de aproximadamente 50% dos canaviais serem plantados com a cultivar NA56-79, altamente suscetível ao carvão. Os danos causados pelo carvão foram avaliados para um grupo de 18 cultivares em 4 ciclos sucessivos de produção, associando um incremento de 1% sobre a curva de progresso da doença levando a 0,86% de dano (CASAGRANDE, 1998). No estado de São Paulo, o uso de cultivares mais resistentes em plantios comerciais reduziu consideravelmente a incidência da doença, sendo a estratégia de manejo mais eficiente para esse patossistema, mesmo as cultivares mais suscetíveis sendo mais produtivas (BERGAMIN FILHO et al., 1987; CASAGRANDE, 1998; TOKESHI, 2005; RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA JUNIOR, 2009). Outras estratégias de manejo fitossanitário frente o carvão incluem a erradicação de soqueiras infectadas com a doença (*roguing*), o tratamento térmico dos toletes o plantio feito com mudas ou toletes sadios (COMSTOCK; LENTINI, 2005; TOKESHI, 2005).

A resistência da cana-de-açúcar ao carvão é dividida em resistência mecânica das gemas à infecção, e resistência bioquímica dos tecidos vegetais à colonização (DEAN, 1982). Mecanismos vegetais de resistência mecânica, por diminuir as

chances de ocorrência efetiva desse processo contribuem para a redução do número de brotações infectadas. A resistência bioquímica ao carvão, por reduzir a taxa de colonização do meristema e do colmo, poderá se manifestar com a redução do número de chicotes formados por unidade de área ao longo do tempo (LLOYD; PILLAY, 1980). A resistência da cana-de-açúcar à colonização pelo carvão foi associada ao acúmulo de poliaminas livres ou conjugadas em tecidos da planta (LEGAZ et al., 1998; PIÑÓN et al., 1999), e também à produção de diversas glicoproteínas recuperáveis de extrato de cana-de-açúcar (MARTÍNEZ et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2002), capazes de afetar a polaridade do citoplasma durante a germinação de teliósporos (FONTANIELLA et al., 2002) ou mesmo impedir a polarização da célula pela inibição da protusão do tubo germinativo. Ambos os mecanismos de resistência aparentemente são independentes, de modo que a cultivar “SP 70-1143”, de cultivo extensivo no país na década de 90 e dotada de grande resistência mecânica ao carvão em campo devido à constituição de suas gemas nodais, apresentou elevada incidência da doença quando inoculada artificialmente através de ferimentos feitos em tais gemas (GODOY; MELONI; AMORIM, 1994). Outros autores associaram a resistência com a pressão exercida pela quantidade de inóculo disponível. Considerando os dois mecanismos principais de resistência ao carvão, mesmo que uma cultivar apresente ambos, caso a pressão fitossanitária sobre esse vegetal ultrapasse o escopo de suas defesas, mesmo uma cultivar com alta resistência poderá manifestar a doença. (BOCK, 1964; DEAN, 1982). O único relato de produção *in vitro* de teliósporos de *S. scitamineum* foi obtido pelo cultivo de tipos celulares coletados da porção basal periférica de chicotes. A metodologia utilizada foi laboriosa e consistiu no cultivo de hifas diplóides coletadas dessa região basal de chicotes em meio enriquecido com extratos dos nós e tecidos meristemáticos de cana-de-açúcar adicionados posteriormente no mesmo meio de cultivo na forma líquida (TRIONE, 1990). Contudo, não houve relato da viabilidade dos esporos produzidos sob essas condições, sendo necessária a interação do fungo com a cana-de-açúcar para produção dos teliósporos.

2.3 Ciclo de vida de *Sporisorium scitamineum*

Agente causal do carvão da cana-de-açúcar, o fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw. pertence ao filo Basidiomycota,

classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales e à família Ustilaginaceae. *S. scitamineum* foi removido do gênero *Ustilago* (ex *Ustilago scitaminea*), com base em resultados de duas análises distintas (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002; STOLL et al., 2003; STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005), segundo as quais *S. scitamineum* difere das demais espécies de *Ustilago* na estrutura dos esporângios formados durante a fase sexuada do fungo que acontece dentro do hospedeiro (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002; STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005). A transmissão do carvão da cana-de-açúcar pode ocorrer principalmente por meio do carregamento de teliósporos através do vento, e pela deposição dos mesmos sobre brotações novas ou sobre o solo que recobre as soqueiras (BOCK, 1964; SANTIAGO et al., 2012). Como o patógeno *S. scitamineum* apresenta desenvolvimento sistêmico na cana-de-açúcar (TRIONE, 1980, 1990), o plantio de toletes ou de mudas contaminadas com hifas do fungo e/ou não desinfestadas adequadamente também pode transmitir a doença (COMSTOCK; LENTINI, 2005).

A infecção da planta está associada à penetração do tecido meristemático do vegetal por apressórios produzidos exclusivamente por hifas dicarióticas. Estas hifas, por sua vez, são formadas principalmente através da anastomose de hifas haploides emitidas por esporídios haploides de cada um dos dois tipos de reação sexual (ALBERT; SCHENCK, 1996; SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004) num evento intimamente ligado ao controle do ciclo celular conhecido como reação sexual ou *mating type reaction* (CASTILLO-LLUVA; PÉREZ-MARTÍN, 2005). Foram descritas também outras duas maneiras para a formação da referida hifa dicariótica em *S. scitamineum*: união de esporídios de tipos de reação sexual diferentes; e crescimento de dois promicélios juntos, seguida da quebra de sua parede celular no ponto de cruzamento e da migração dos núcleos para a célula fusionada (MOOSAWI-JORF et al., 2006; SANTIAGO et al., 2010). A exposição de células de *Ustilago maydis*, agente causal do carvão do milho, a ferormônios sexuais promove uma pausa do período G2 anterior à fusão dos citoplasmas, formando um filamento dicariótico infectivo (GARCÍA-MUSE et al., 2003). Dentro dos tecidos vegetais haverá então proliferação das células fúngicas sob a forma de hifas filamentosas cujos septos delimitam compartimentos cada qual abrigando um par de núcleos (SNETSELAAR; MIMS, 1992; BANUETT; HERSKOWITZ, 1996).

Os esporídios, por sua vez, são produzidos durante o processo de germinação dos teliósporos, que ocorre sob umidade relativa de 100%. Inicialmente o teliósporo absorve água e aumenta de tamanho, havendo rompimento de sua parede externa (exosporídio) e emissão de um pró-basídio, que ao sofrer meiose emite quatro esporídios (HARTMANN; KAHMANN; BÖLKER, 1996; SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004). Os esporídios haplóides podem se multiplicar por brotamento com padrão leveduriforme, ou podem emitir uma hifa haplóide caso estejam próximos a esporídios de tipo de reação sexual compatível (CHONA, 1943). Considerando-se fungo modelo *Ustilago maydis*, obtiveram-se tanto a germinação quanto a ocorrência de meiose *in vitro* a partir de teliósporos colhidos de plantas doentes (DONALDSON; SAVILLE, 2008). No entanto, indivíduos diplóides desse fungo cultivados *in vitro* a partir de mutantes auxotróficos compatíveis foram incapazes de completar a meiose (HOLLIDAY, 1961a, 1961b). Diferentemente de outros fungos fitopatogênicos, *U. maydis* necessita de etapa obrigatória de desenvolvimento *in planta* para que os teliósporos tornem-se aptos a sofrer meiose (BANUETT, 1995). *U. maydis* não forma corpos de frutificação como o fungo *Coprinus cinerea*, sendo que a meiose ocorre em estrutura específica chamada metabasídio cujas paredes celulares parecem estar ligadas à parede interna dos teliósporos (RAMBERG; McLAUGHLIN, 1980). O núcleo do teliósporo encontra-se no final da prófase I no momento em que o metabasídio se forma. Quando este atinge 10 µm ou mais de comprimento, ocorre migração do núcleo do teliósporo para o meio do metabasídio ao longo do eixo deste durante a metáfase I. Quando a telófase I se completa, ocorre a formação de um septo transversal próximo ao local do eixo, resultando em duas células cada qual com um núcleo (O'DONNELL; McLAUGHLIN, 1984).

Ainda em *U. maydis*, observou-se ocorrência da meiose II imediatamente, com o núcleo da célula mais distante do teliósporo original migrando para uma localização central, ao passo que o núcleo da célula restante migrava para o pescoço entre o metabasídio e o teliósporo, seguida de nova divisão formando-se mais dois núcleos e septos (O'DONNELL; McLAUGHLIN, 1984). Como resultado, formaram-se três núcleos haplóides em suas respectivas células do metabasídio, sendo o quarto núcleo haplóide localizado na base do teliósporo original (RAMBERG; McLAUGHLIN, 1980). Cada célula do metabasídio produz um basidiósporo através de brotamento, por meio da divisão do núcleo em dois núcleos-filhos. Os basidiósporos haplóides são liberados, passando a crescer

saprofiticamente por brotamento (BANUETT, 1995). Os estádios citológicos ocorrentes na prófase I, como a recombinação, pareamento de cromossomos homólogos e formação de complexo sinaptonêmico não foram descritos para *U. maydis* (DONALDSON; SAVILLE, 2008). Caso a meiose em *U. maydis* ocorra de forma análoga ao que ocorre com o fungo *C. cinerea*, então a replicação do DNA ocorreria *in planta*, antes da cariogamia, ao passo que eventos da prófase I e de recombinação ocorreriam provavelmente até o *checkpoint* do paquíteno antes do teliósporo entrar em dormência (DONALDSON; SAVILLE, 2008). Uma hipótese alternativa seria que a replicação do DNA se processaria após o teliósporo ficar dormente no período de 4 a 6 horas após a indução da germinação antes da formação do metabasídio (DONALDSON; SAVILLE, 2008).

Dentre os pontos de crescimento meristemático da cana-de-açúcar para os quais a infecção pelo carvão foi descrita destacam-se as gemas (ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1980; LLOYD; PILLAY, 1980; GLORIA; ALBERNAS; AMORIM, 1995; IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007). Também foi sugerida para esse patossistema a infecção via aberturas naturais, como estômatos (GLORIA et al. 1999; SANTIAGO et al., 2008). No intervalo de 6 até 36 horas após a deposição de teliósporos sobre as gemas da planta foi detectada a invasão meristemática (ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1980). A observação das hifas inter e intracelulares emitidas por *S. scitamineum* ao longo do processo de colonização de diferentes cultivares de cana-de-açúcar mostrou que estas não estavam distribuídas lateralmente no colmo e que apresentavam associação com feixes vasculares periféricos (LLOYD; PILLAY, 1980). O crescimento deste fungo no interior da cana-de-açúcar se dá principalmente por células do parênquima nos internódios inferiores, sendo que nos internódios superiores o crescimento das hifas culmina com a formação do chicote, modificação do meristema das brotações da planta composta por tecidos da planta intercalados com hifas do fungo. Alternativamente, o micélio pode permanecer dentro das gemas como infecção latente (AGNITORI, 1990; COMSTOCK; LENTINI, 2005; SANTIAGO et al., 2012).

Trione (1980, 1990) detectou duas formas de ocorrência de *S. scitamineum* em tecidos doentes de cana-de-açúcar: hifas dicarióticas somáticas e hifas monocarióticas diplóides produtoras de teliósporos. Enquanto que as hifas dicarióticas predominaram dentro do vegetal, as hifas diploides foram observadas apenas na porção branca, basal e periférica de chicotes. Nessa região da planta foi

descrita a cariogamia de núcleos geneticamente distintos que antes coexistiam na hifa dicariótica (TRIONE, 1990). O chicote é constituído por *sori* contendo teliósporos (PIÑÓN et al., 1999; FONTANIELLA et al., 2002), sendo que o crescimento mais intenso do fungo e esporulação ocorrem na porção periférica do chicote (WALLER, 1970; TRIONE, 1990), enquanto que na porção central o crescimento fúngico é mais lento (TRIONE, 1980). A produção dos *sori* ocorre entre 6 e 12 semanas após a inoculação com teliósporos (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004). O chicote se desenvolve no lugar de algumas folhas do eixo da brotação, prejudicando a formação de colmos. As plantas infectadas se tornam mais fibrosas, perfilham mais precocemente e direcionam consideravelmente seus fotoassimilados para a formação do chicote (CASAGRANDE, 1998; TOKESHI, 2005). Os colmos produzidos são menores, apresentam menor teor de sacarose e produzem caldo de menor qualidade, prejudicando sua industrialização, levando a danos à cultura da cana-de-açúcar que podem ultrapassar 80% (TOKESHI, 2005; FIGUEIREDO, 2008). Em razão disso, os teliósporos do fungo são empregados em testes de patogenicidade no programa de melhoramento vegetal da cultura (COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO - COPERSUCAR, 1995). Esses testes visam selecionar genitores resistentes e avaliar o comportamento das progênes frente o patógeno (CASAGRANDE, 1998; TOKESHI, 2005; RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA JUNIOR, 2009; BUENO, 2010).

Uma vantagem na utilização deste patossistema como modelo para estudar os mecanismos moleculares que atuam na interação entre fungos patogênicos e cana-de-açúcar é a possibilidade de manipulação em laboratório. Três formas distintas de crescimento *in vitro* de *S. scitamineum* foram descritas até o momento: esporídios haplóides que se multiplicam por brotamento, micélio dicariótico branco, e micélios negros potencialmente capazes de produzir teliósporos (TRIONE, 1990; IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007). Tanto os esporídeos quanto as hifas dicarióticas são facilmente observadas através da germinação de teliósporos de *S. scitamineum* e separação de esporídios em meio próprio para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007). Em meio enriquecido com extratos de meristema e do tecido nodal de cana-de-açúcar, coberto com fina camada de meio líquido cerca de 5% dos isolados de *S. scitamineum* coletados da porção periférica branca do tecido da base do chicote desenvolveram colônias

negras capazes de produzir teliósporos, de modo similar ao que ocorre *in planta* (TRIONE, 1990).

2.4 Reação sexual em *Sporisorium scitamineum*

A reação sexual dos fungos causadores de carvão em gramíneas é governada por dois *loci* gênicos que operam simultaneamente em um sistema de autoincompatibilidade. No referido sistema apenas indivíduos haplóides que possuam cópias alélicas distintas em ambos os referidos *loci* conseguirão se fundir para formar uma hifa dicariótica (KRONSTAD; STABEN, 1997). O sistema de reação sexual é dito tetrapolar quando os dois *loci* de autoincompatibilidade (denominados *a* e *b*) estão localizados em cromossomos separados, sendo então passíveis de sofrerem segregação independente durante a meiose. O sistema tetrapolar foi descrito para *U. maydis*, causador do carvão do milho e *S. reilianum*, causador de carvão em milho e cevada (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). No entanto, outro sistema de reação sexual também foi descrito para fungos causadores do carvão, o sistema bipolar. Nesse sistema, as regiões genômicas equivalentes aos *loci a* e *b* descritos no sistema tetrapolar (chamadas de *subloci a* e *b*) segregam como se fossem um *locus* único chamado de MAT. Dois *loci* foram descritos até o momento em *U. hordei*: MAT1 (que abriga os *subloci a1* e *b1*) e MAT2 (que apresenta os *subloci a2* e *b2*) cada qual portadora de alelos distintos entre si nos *subloci a* e *b* (BAKKEREN; KRONSTAD, 1993, 1994, 1996). A ocorrência do sistema bipolar foi associada a duas situações: ligação física e genética dos *subloci a* e *b* num mesmo cromossomo ou quando os *subloci* estão separados por uma região que mesmo grande (descrita de 400-500 pb em *U. hordei*) seja refratária à recombinação (BAKKEREN; KRONSTAD, 1995; KRONSTAD, STABEN, 1997) ou ainda devido a não descrição de recombinantes considerando-se uma população de 20 promicélios obtidos pela germinação de teliósporos (ALEXANDER; SRINIVASAN, 1966). O sistema bipolar foi descrito para os fungos *U. hordei*, causador do carvão da cevada (BAKKEREN; KRONSTAD, 1993, 1994, 1996; BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008) e *S. scitamineum* (ALEXANDER; SRINIVASAN, 1966; KMIT, 2014)

Em *Ustilago maydis* atribuiu-se a presença de dois genes com mais de um alelo no *locus a* o reconhecimento químico mútuo e fusão entre indivíduos haplóides

(esporídios) sexualmente compatíveis e provável contribuição à manutenção da hifa dicariótica (KRONSTAD; STABEN, 1997). O reconhecimento químico consiste num sistema de produção de ferormônios lipopeptídeos (Mfa1 e Mfa2) que são reconhecidos respectivamente por proteínas receptoras transmembrana (Pra2 e Pra1). Cada esporídio produzirá um ferormônio que será reconhecido pelo esporídio de tipo de reação sexual distinto, e apresentará um receptor transmembrana que reconhecerá o ferormônio produzido pelo esporídio de outro tipo de reação sexual (SNETSELAAR; MIMS, 1992). Depois que o ferormônio é detectado, proteínas G heterotriméricas e MAP-quinases promoverão a transdução do sinal que culminará com a emissão de hifas de conjugação da ponta de cada esporídio. Essas hifas crescerão uma em direção à outra, e sofrerão anastomose em suas extremidades. Caso esse mecanismo de detecção e transdução do sinal seja prejudicado, haverá efeito prejudicial na formação da hifa dicariótica infectiva e patogenicidade de *U. maydis* (BÖLKER, 2001; BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Ainda em *U. maydis*, as duas formas alternativas do *locus a* (*a1* e *a2*) foram descritas como idiomórficas, considerando-se que mapearam no mesmo *locus*, mesmo que a evolução de cada uma aparentemente tenha sido independente (FROELIGER; LEONG, 1991). A presença de um gene associado a ferormônio no alelo *a2* de *U. maydis* foi atribuída a um ancestral com mais cópias alélicas para esse *locus*, tendo sido descritos ainda mais dois genes no *locus a*: *lga2* e *rga2* (URBAN; KAHMANN; BÖLKER, 1996). Além da fusão de esporídios haplóides, a sinalização mediada por ferormônios foi associada à comunicação núcleo-célula em hifa dicariótica recém-formada de *U. maydis* (KRONSTAD; STABEN, 1997) e à manutenção do crescimento filamentoso da hifa dicariótica. Linhagens diplóides heterozigotas para o *locus b* e homozigotas para o *locus a* quando misturadas com esporídios com alelo distinto ao que apresenta em suas duas cópias do *locus a*, passam a apresentar crescimento filamentoso (SPELLIG et al., 1994).

Em *U. maydis*, após a compatibilidade no *locus a* que levou à formação da hifa dicariótica, esta somente continuará a se desenvolver com hábito filamentoso e culminará com a emissão de apressório que caracteriza a patogênese caso também ocorra compatibilidade sexual no *locus b*. A ativação dos genes do *locus b* é regulada à montante por um fator de transcrição heterodimérico, formado por duas subunidades transcritas divergentemente por dois genes regulatórios *bE* (*bEast*) e *bW* (*bWest*). Cada subunidade apresenta homeodomínios de classes distintas (HD1

e HD2) (GILLISSEN et al., 1992; KRONSTAD; STABEN, 1997). As porções dos genes *bE* e *bW* que codificam os N-terminais das subunidades são mais variáveis, sendo as respectivas regiões C-terminais conservadas (KRONSTAD; LEONG, 1990; GILLISSEN et al., 1992). Aparentemente o *locus b* apresenta função bastante semelhante nos fungos *U. hordei* e *U. maydis*, cujos produtos gênicos do *locus b* interagiram para formar uma hifa dicariótica (BAKKEREN; KRONSTAD, 1994, Idem, 1996). Existe consenso na literatura de que o fator de transcrição heterodimérico será funcional desde que suas subunidades venham da transcrição de alelos distintos (*bE1+bW2* ou ainda *bE2+bW1*) (KRONSTAD; STABEN, 1997).

Para fungos causadores de carvão que apresentam sistema bipolar de organização dos *loci* de reação sexual como *S. scitamineum*, os teliósporos são produzidos por hifas diplóides resultantes da cariogamia de núcleos cada qual portador de uma das cópias do *loci* de reação sexual descritas: MAT1 e MAT2. Com efeito, cada teliósporo será heterozigoto para o *locus* de reação sexual, que por não sofrer recombinação levará à produção de esporídios haplóides com os dois tipos de reação sexual em proporções equivalentes à observada na população como um todo: 50% para cada tipo de reação sexual (GIRAUD et al., 2008). No entanto, uma vez formados e liberados, os esporídios de tipos de reação sexual distintos próximos fisicamente poderão reconhecer mutuamente os ferormônios sexuais produzidos e o restante do processo que culminará com a infecção dos tecidos meristemáticos poderá prosseguir. Esses esporídios sexualmente compatíveis que virão a se fundir poderão se originar de um mesmo evento meiótico (mesmo teliósporo diplóide), ou poderão advir cada qual da meiose de teliósporos distintos. Em fungos, essa compatibilidade sexual que é determinada na fase haplóide e que pode advir de uma das duas possibilidades descritas no período anterior são denominadas autofecundação (fecundação intra-tétrade) e fecundação cruzada (KALTZ; SHYKOFF, 1999; GIRAUD et al., 2008). No entanto, o heterotalismo evidenciado pelos tipos distintos de reação sexual em fungos causadores do carvão não implica em favorecimento à fecundação cruzada, sendo relatada ocorrência predominante de reação sexual entre esporídios intra-tétrade, mesmo que ambas as modalidades de reação sexual sejam possíveis (FISHER; HOLTON, 1957; GIRAUD et al., 2008). Para *M. violaceum* existe relato de preferência de ocorrência de reação sexual e formação de hifa dicariótica infectiva mediante fusão de esporídios recém produzidos pelo pró-basídio, inclusive mesmo antes destes começarem a se reproduzir

mitoticamente por brotamento e se desassociem do mesmo (KALTZ; SHYKOFF, 1999). Ainda em *M. violaceum*, altas taxas de autofecundação foram consideradas como uma forma de assegurar a reprodução, devido à distribuição errática das populações de suas plantas hospedeiras ao longo da Europa e parte da Ásia (GIRAUD et al., 2008). Existem relatos semelhantes de maior ocorrência natural de autofecundação em *Ustilago hordei* (FISHER; HOLTON, 1957) e *S. scitamineum* (RABOIN et al., 2007; REIS, 2012). A ocorrência predominante de reação sexual restrita ao conjunto formado pelos 4 esporídios resultantes de uma mesmo ciclo de divisão meiótica tem sido associada a uma perda ligeiramente menor de heterozigosidade em senso amplo do que se observa nos cruzamentos entre esporídios originados de eventos meióticos distintos (ZAKHAROV, 2005)

2.5 Diversidade do patógeno

A diversidade de *S. scitamineum* foi estudada de maneiras distintas por diferentes autores ao longo do tempo. O comportamento diferencial de cultivares de cana-de-açúcar frente a linhagens distintas do carvão foi descrito no Havaí, tendo havido descrição de duas raças do patógeno nesse arquipélago (A e B), pela ocorrência da doença causada pela raça B em cultivares resistentes à raça A (COMSTOCK; HEINZ, 1977). Em Taiwan foram descritas três raças (1, 2 e 3) (LEU et al., 1976). Diferenças quanto à colonização dos tecidos da planta pelo patógeno também foram relatadas dependendo da intensidade de resistência da cultivar em relação ao fungo (LLOYD; PILLAY, 1980). Foram descritas raças do patógeno também no Brasil, Paquistão e Filipinas. Porém, a não uniformidade de técnicas de inoculação e de reações de uma mesma cultivar em ensaios feitos em países distintos gerou polêmica quanto à caracterização das raças (FERREIRA; COMSTOCK, 1989; COMSTOCK, 2000).

Técnicas envolvendo marcadores genéticos passaram a ser utilizadas para caracterizar molecularmente a variabilidade entre diferentes indivíduos de *S. scitamineum* coletados em diferentes locais produtores. Destacamos o uso de AFLPs aplicado ao estudo de 38 isolados oriundos de 13 países que destacou um grupo de isolados do sudeste asiático com maior virulência em relação os demais, incluindo cultivares australianas (BRAITHWAITE et al., 2004). Diferenças fenotípicas entre isolados distintos do patógeno foram maiores do que marcadores neutros

como AFLP puderam acessar, o que poderia relacionar esses caracteres com heranças monogênicas, expressão diferencial de genes, ou ainda variações ambientais (ABO; OKUSANYA, 1996; SUNDAR, 2012). Outras técnicas de genotipagem também incluíram: RAPD realizado com 18 isolados de diferentes províncias chinesas (XU et al., 2004), que levou a observação de 6 grupos (UPGMA) sob coeficiente de dissimilaridade de 0,7, mas não conseguiu associar a variabilidade evidenciada pela formação dos grupos com sua origem geográfica. A análise de sequências de DNA ribossômico de isolados coletados na África do Sul, na ilha francesa de Reunião, Guadalupe e Havaí detectou baixa variabilidade entre os isolados, que apresentaram 96,1% e 96,9% de identidade e mudanças de bases nitrogenadas de 17 e 21 considerando-se, respectivamente, as regiões ITS1 e ITS2 (SINGH et al., 2005). Diferentes populações de *S. scitamineum* oriundas de 77 chicotes coletados em 15 países foram analisadas via microssatélites (SSR), resultando no alinhamento das linhagens africanas, americanas e algumas das asiáticas num mesmo grupo, levantando a hipótese do surgimento do patógeno no continente asiático (COMSTOCK et al., 2007; RABOIN et al., 2007).

No Brasil, relataram-se ainda níveis de agressividade variáveis de populações distintas do patógeno provenientes de diferentes canaviais infectados no Estado de São Paulo (RAGO; CASAGRANDE; MASSOLA JUNIOR, 2009). Em trabalho anterior, foram utilizados marcadores moleculares do tipo AFLP e tel-RFLP para acessar a variação genética entre isolados *S. scitamineum* obtidos de diferentes regiões canavieiras do Brasil (REIS, 2012). Os resultados demonstraram que existe variação dentro de linhagens haplóides obtidas a partir de teliósporos isolados de um mesmo chicote e entre teliósporos de diferentes regiões, tendo sido a genotipagem via tel-RFLP *fingerprinting* mais eficiente do que o AFLP para revelar a variação genética entre isolados de *S. scitamineum*. Inferiu-se que as hifas dicarióticas que deram origem às linhagens haploides obtidas a partir de um mesmo pró-basídio na maioria das vezes se revelaram homozigotas para o mesmo marcador, no entanto, heterozigotas também foram observadas (REIS, 2012). A presença de heterozigotos nas populações analisadas sugere que existe uma frequência de recombinação ainda não descrita para *S. scitamineum*, apesar do alto grau de autofecundação sugerido para esta espécie (RABOIN et al., 2007). Essa variação genética está principalmente associada à região subtelomérica. Variantes

heterozigotos foram encontrados em menor frequência nas análises de AFLP (REIS, 2012).

2.6 Regiões subteloméricas e origem da variação genética

Os telômeros correspondem às extremidades dos cromossomos, sendo sua integridade um dos principais elementos de estabilidade genômica em eucariotos (BLACKBURN, 2001, 2003). Muito do que se sabe sobre a importância dos telômeros se deve a trabalhos iniciados por Barbara McClintock com milho (McCLINTOCK, 1938, 1941, 1942), e por Muller com *Drosophila melanogaster* (MULLER, 1938; MULLER; HERSKOWITZ, 1954). A estrutura do telômero é conhecida desde os anos 80 com a descoberta da enzima telomerase, de natureza ribonucleoprotéica, responsável pela replicação das pontas dos telômeros pela adição de sequências teloméricas distribuídas em repetições em tandem ricas em guanina (GREIDER; BLACKBURN, 1985; BLACKBURN, 2001; CHAN; BLACKBURN, 2003). Com efeito, essas sequências atuam na prevenção de perdas de DNA da fita descontínua durante a replicação nas extremidades dos cromossomos com o auxílio de proteínas que se ligam ao telômero (*telomere-binding proteins*). Em linhas gerais, telômeros e telomerases funcionam de forma similar nos eucariotos, podendo haver diferenças nas sequências repetitivas (Blackburn, 2001).

Ao longo dos ciclos de divisão celular em células que possuem telomerase, a porção final do DNA telomérico se encontra em constante mudança devido a adições e perdas de sequências repetitivas (BLACKBURN, 2001). Trata-se, portanto, de uma região do genoma com alta taxa de evolução (NACHMAN, 2002). Adjacentes às repetições terminais teloméricas localizam-se as sequências subteloméricas. Semelhantemente à região telomérica, as sequências subteloméricas frequentemente apresentam repetições em tandem e podem ser trocadas entre telômeros (BLACKBURN, 2001). No entanto, o fato de poderem diferir significativamente entre espécies, associado a sua elevada taxa de evolução as torna capazes de estudos de diversidade genética entre indivíduos de uma mesma espécie. Nesse contexto, a homogeneidade de repetições subteloméricas foi associada a eventos de crossing over desiguais (BLACKBURN, 2001).

A região subtelomérica abriga genes com diversas funções descritas nos últimos anos. Em *Drosophila*, o comprimento das sequências dos telômeros é

mantido por ação de elementos transponíveis (*non-LTR retrotransposon*) (ABAD et al., 2004), foi descrito ainda que as regiões subteloméricas desse inseto apresentariam propriedades heterocromáticas como mecanismo potencial de proteção ao telômero (DORER; HENIKOFF, 1997; BLACKBURN, 2001). A presença de elementos repetitivos na região subtelomérica também foi associada à propensão a eventos de recombinação e ao silenciamento de genes (THAM; ZAKIAN, 2002). Nessa região genômica também foram descritos genes de avirulência e evasão do sistema imunológico do hospedeiro, para os seguintes microorganismos patogênicos aos seres humanos: *Plasmodium falciparum*, uma das espécies causadoras da malária (FIGUEIREDO; SCHERF, 2005), *Trypanosoma brucei* (HORN; BARRY, 2005) e o fungo *Pneumocystis carinii*, causador de um tipo de pneumonia (KEELY et al., 2005). Em *Sacharomyces cerevisiae*, foi descrita uma família de genes associados ao metabolismo de carboidratos relacionados ao nicho das diferentes linhagens analisadas (DENAYROLLES et al., 1997), genes relacionados à resposta a estresses, à floculação (*flo*) e à anaerobiose (*pau*) (RACHIDI et al., 2000; VERSTREPEN et al., 2005).

A diversidade genética de microrganismos de interesse agrícola, incluindo patógenos de plantas, e espécies atuantes no controle biológico de doenças vegetais também foi avaliada considerando-se as regiões subteloméricas. Destaca-se a análise de RFLP da região subtelomérica empregada com sucesso para avaliar se linhagens do fungo *Ustilago hordei*, causador do carvão da cevada, pertenciam ou não a mesma genealogia (ABDENNADHER; MILLS, 2000). Outros exemplos incluem: *Ustilago maydis*, causador do carvão do milho (SÁNCHEZ-ALONZO et al., 1996; SÁNCHEZ-ALONZO; GUZMAN, 1998), *Rosellinia necatrix* (AIMI et al., 2002), *Beauveria bassiana* (PADMAVATHI; UMA DEVI; UMA MAHESWARA RAO, 2003), *Glomus intraradices* (HIJRI; NICULITA; SANDERS, 2007) e *Magnaporthe oryzae* (FARNAN; KIM, 2005; REHMEYER et al., 2006). Considerando-se o sistema formado entre a cana-de-açúcar e o carvão, a diversidade entre isolados do fungo coletados em diferentes estados produtores de cana do Brasil foi estudada através dos marcadores AFLP e tel-RFLP (REIS, 2012), conforme citado anteriormente. Com efeito, muitas informações ainda poderão ser obtidas pela continuidade dos estudos da região telomérica de *S. scitamineum*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Inoculações de cana-de-açúcar com *Sporisorium scitamineum*

Inoculações da cana-de-açúcar com o fungo *S. scitamineum* foram realizadas para obter gerações consecutivas de progênes de esporídios avaliadas suas marcas tel-RFLP, tipo de reação sexual e marcas GFP (apenas para a população c, conforme será esclarecido nos itens seguintes). Cada tratamento consistiu de um cruzamento sexuado de tipos celulares de *S. scitamineum* em minitoletes de cana-de-açúcar em ciclos sucessivos da doença. Cada tratamento apresentou 12 repetições representadas por plantas, bem como 6 plantas não inoculadas (testemunhas). As plantas inoculadas num mesmo dia foram colocadas na casa de vegetação seguindo-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC).

3.1.1 Material fúngico utilizado no primeiro ciclo da doença

O primeiro ciclo da doença foi obtido pela realização de dois tipos de cruzamentos envolvendo tipos celulares do patógeno: I) cruzamentos naturais e II) cruzamentos controlados. Os cruzamentos naturais foram feitos mediante a inoculação da planta com teliósporos diplóides, o que simulou a condição de inoculação natural observada no campo. Esses teliósporos foram coletados da primeira geração de chicotes produzidos por plantas inoculadas com teliósporos do chicote 39 obtidos em trabalho anterior (REIS, 2012) e constituíram o primeiro tratamento da população a. As progênes de esporídios decorrentes desse cruzamento compuseram também da população a.

Os cruzamentos controlados, por sua vez, foram realizados pela inoculação de esporídios haploides de tipo de reação sexual compatível. Dois tipos de cruzamentos controlados foram feitos neste trabalho. O primeiro tipo constituiu a combinação de esporídios coletados de chicotes obtidos de diferentes locais produtivos do Brasil em trabalho anterior (Chicotes 18 e 39 – REIS, 2012). As progênes obtidas a partir desse cruzamento formaram a população b. Este cruzamento constituiu o primeiro tratamento da população b. Os esporídios utilizados como parentais, 18A e 39B, vieram cada qual de um dos dois grupos observados anteriormente (REIS, 2012). Esses esporídios apresentam perfis de tel-RFLP

contrastantes e constituíram claramente um evento de fecundação cruzada, pois cada um deles foi obtido de teliósporos coletados em locais diferentes. A quantidade inicial de variação compreendeu 7 marcas tel-RFLP entre os esporídios 18A e 39B. A escolha desses esporídios como parentais também foi motivada pela verificação se o sistema suportaria essa situação de fecundação cruzada mais acentuada, quanto à produção de teliósporos viáveis.

O segundo tipo de cruzamento controlado utilizado ocorreu entre os esporídios haplóides mutantes 39A*gfp* e 39B*gfp*. Este cruzamento constituiu o primeiro tratamento da população c. Esses esporídios são chamados de mutantes GFP, pois sofreram transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em trabalho anterior (comunicação pessoal Dr^a. Giselle de Carvalho) para expressão heteróloga de uma cópia única do gene *gfp* que codifica a expressão da proteína verde fluorescente (GFP). A produção das linhagens parentais mutantes GFP foi realizada em trabalho conjunto pela Dr^a. Giselle de Carvalho, e pelas estudantes Jackeline de Almeida, Mariana Marrafon e Tatiane Shyton. O cruzamento entre esses mutantes GFP simulou situação de reação sexual intra-tétrade, pois os respectivos esporídios selvagens que sofreram a mutação (39A e 39B) haviam sido isolados a partir da germinação de um único teliósporo obtido do chicote 39. Os indivíduos 39A e 39B apresentaram perfis de tel-RFLP muito similares, com apenas duas marcas distintas entre si (REIS, 2012), conforme esquematizado na figura 2.

3.1.2 Obtenção do segundo ciclo da doença

O segundo ciclo da doença para cada população (a, b e c) foi obtido pela inoculação de dois esporídeos sexualmente compatíveis pertencentes a cada progênie produzida nas três populações descritas no item 3.1.1. As respectivas inoculações constituíram o segundo tratamento das três populações. Como havia mais de uma progênie F1 da germinação de teliósporos produzidos na população (a) condição inicial de campo, um sorteio definiu que os indivíduos empregados na inoculação para obtenção do ciclo seguinte fossem de teliósporos diferentes (fecundação cruzada – *outcrossing*). Como se observa na figura 2, considerando as progênies da geração F1 (18A x 39B) e F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) os indivíduos sorteados utilizados nos cruzamentos, respectivamente, 9A e 10B, e 36A*gfp* 5B*gfp*

foram originados da mesma progênie, constituindo dois casos distintos de autofecundação (reação sexual intra-tétrade).

3.1.3 Obtenção do terceiro ciclo da doença

O terceiro ciclo da doença foi obtido pela inoculação de dois esporídios de cada uma das duas progênes selvagens obtidas no ciclo anterior da doença, referentes às populações a e b, de forma semelhante à empregada nas demais inoculações (Figura 2). Esses cruzamentos controlados representaram eventos de autofecundação e constituíram o terceiro tratamento respectivamente das populações a e b.

Figura 2 - Metodologia para obtenção das populações de *S. scitamineum* ao longo de ciclos sucessivos de infecção em cana-de-açúcar. As setas pretas indicam as inoculações realizadas. As progênes obtidas empregadas no estudo de marcas tel-RFLP e de marcas GFP estão assinaladas em negrito

3.1.4 Inoculação de teliósporos produzidos no ciclo anterior da doença

A viabilidade dos teliósporos produzidos por cruzamentos naturais e cruzamentos controlados e a cada ciclo da doença foi avaliada pela inoculação de minitoletes de cana-de-açúcar com o objetivo de avaliar sua capacidade de produção de novo ciclo da doença.

3.1.5 Material vegetal utilizado

O material vegetal consistiu em 180 minitoletes de gemas únicas obtidos do terço médio e terço inferior de colmos colhidos em soqueiras com 9 a 12 meses de idade localizadas na área experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba. Os genótipos de cana-de-açúcar utilizados variaram em algumas ocasiões, devido à disponibilidade do material sadio em campo, e incluíram as cultivares de resistência intermediária ao carvão: CB 49-260, IACSP 95-5000, RB 92-5345, e o clone altamente suscetível à doença IAC 66-6. Devido ao caráter qualitativo dos ensaios em casa de vegetação, o uso de cultivares com menor grau de resistência frente ao patógeno pautou a escolha das cultivares. Como o objetivo das inoculações foi a produção de teliósporos, sendo, portanto, qualitativo, o número elevado de gemas por tratamento foi justificado para aumentar a chance de obtenção de chicotes, considerando a não germinação de parte das gemas ou a possibilidade de que a infecção não fosse bem sucedida. .

3.1.6 Preparo e Desinfecção dos minitoletes

Os colmos colhidos foram lavados, tiveram seu terço superior removido, e o restante subdividido em subunidades denominadas minitoletes, cada um deles contendo uma gema. O tratamento térmico foi realizado por 30 minutos a 52°C respeitando-se o volume de 6 L de água para cada quilograma de minitoletes. Em seguida, procedeu-se a desinfecção dos mesmos com solução de hipoclorito de sódio a 0,01% por 10 minutos e lavagem tripla com água deionizada.

3.1.7 Pré-germinação

Nesta etapa, os minitoletes limpos foram dispostos com as gemas voltadas para cima em bandejas plásticas. Todo o conjunto foi umedecido com água deionizada, e coberto com uma dupla camada de papel absorvente úmido para evitar dessecação. Os minitoletes foram incubados a temperatura ambiente, no escuro, por 20 horas.

3.1.8 Inoculações com teliósporos

As inoculações foram realizadas utilizando-se os minitoletes pré-germinados, agulhas estéreis e suspensão de teliósporos ($1,8 \times 10^6$ teliósporos viáveis por mL de solução NaCl 0,85 Mol L⁻¹). Procedeu-se a inoculação por punção adaptada de Ferreira e Comstock (1989), havendo deposição de suspensão de teliósporos em dois orifícios laterais aos pólos germinativos da gema com ajuda de uma agulha. Com isso, quebrou-se a resistência mecânica à entrada do patógeno. No tratamento controle, houve a deposição de uma gota de água ultrapura sobre os orifícios feitos nas gemas.

3.1.9 Inoculações com esporídios de tipos de reação sexual compatíveis (selvagens e mutantes GFP)

As inoculações foram feitas utilizando-se os minitoletes pré-germinados, e injeção de suspensão de esporídios haplóides dos dois tipos de reação sexual descritos para *S. scitamineum* em dois pontos laterais ao pólo germinativo da gema (ALBERT; SCHENCK, 1996). A suspensão consistiu em solução (NaCl 0,85 Mol L⁻¹) acrescida de duas culturas monoclonais de células haplóides leveduriformes crescidas em meio YM sólido por 4 dias a 28°C, uma de cada tipo de reação sexual, totalizando aproximadamente 1×10^6 células por mL de cada uma (0,5 OD aferida em Biomate ® a 600 nm). Com uma agulha foram feitos dois orifícios um em cada lado da gema do minitolete, conforme descrito no item anterior. Em cada orifício foi então injetada a suspensão de células haplóides, com ajuda da agulha. No tratamento controle, houve a deposição alternativa de uma gota de solução salina sobre os orifícios feitos nas gemas.

3.1.10 Aclimatização dos minitoletes inoculados e cultivo protegido

Após a inoculação, cada minitolete foi semi-enterrado em vaso plástico de 2 L contendo substrato Basaplant® úmido adicionado de 4 g de fórmula NPK (05-20-25) utilizada no plantio comercial de cana-de-açúcar. Em seguida, depositou-se uma fina camada de substrato sobre os minitoletes, e o conjunto foi regado. Os vasos foram dispostos em uma bandeja para cada tratamento e regados a cada dois dias. Após 30 dias, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação. As plântulas foram adubadas a cada 30 dias com 1 g de Cloreto de Potássio e 1,5 g de Fórmula NP (05-25) e receberam irrigação diária até emissão dos chicotes. Os cartuchos das plântulas foram examinados para identificação de chicotes a cada três dias, a cada ciclo de infecção.

3.2 Coleta dos chicotes

Uma vez detectada a emissão eminente do chicote, pelo engrossamento da ponta do cartucho, as plantas foram separadas das demais. Como o amadurecimento dos teliósporos ocorre em contato com a planta, os chicotes foram colhidos apenas de 7 a 15 dias após o início da sua emissão para fora do cartucho. O restante do colmo, sistema radicular e substrato foram autoclavados antes do descarte (incineração).

3.3 Coleta dos teliósporos (selvagens e mutantes GFP)

Os chicotes colhidos foram separados do cartucho, e tiveram os 3 cm apicais removidos, pois constituem locais mais sujeitos a contaminação com outros microorganismos. A porção basal dos chicotes, de coloração branca também foi eliminada, bem como cerca de 5 cm acima dela, pois constituem regiões com teliósporos que apesar da coloração amarronzada característica ainda estão imaturos. A porção central restante dos chicotes foi envolvida por papel pardo e secas em estufa a 37°C por 4 h. O chicote, já seco, foi batido em envelope de papel pardo para liberação dos teliósporos que foram recolhidos em microtubos plásticos de 1,5 mL. Os microtubos foram selados com filme plástico, etiquetados e então

guardados em dessecador contendo sílica ativa selado com vaselina. Essa metodologia de estoque de teliósporos foi aprimorada nesse trabalho, e visou manter os teliósporos sob baixa umidade relativa do ar para aumentar o tempo de sua conservação, conforme recomendado por MATA (1975).

3.4 Isolamento de esporídios selvagens e mutantes GFP

Cerca de 5 mg de teliósporos selvagens ou mutados para expressão do gene *gfp* foram colocados em tubos contendo 1 mL de solução ($\text{NaCl } 0,85 \text{ Mol L}^{-1}$) adicionada dos antibióticos: sulfato de estreptomicina (5mg/L) e tetraciclina (2,5 mg/L) por 30 minutos (adaptado de ALBERT; SCHENCK, 1996). Cerca de 100 μL dessa suspensão de teliósporos foram plaqueados em placas de Petri contendo meio YM sólido (3g extrato de levedura; 3g extrato de malte; 5g peptona de soja; 10g D- glicose; 15 g ágar bacteriológico e água destilada qsp 1L) e incubadas a 28°C sem iluminação por 15h (adaptado de SINGH; SOMAI; PILLAY, 2005). As placas foram observadas em microscopia de luz, para detecção de teliósporos crescendo isoladamente.

Cada progênie de esporídios obtida neste trabalho foi oriunda da inoculação de um pró-basídio decorrente da germinação de teliósporos obtidos de ciclos consecutivos de doença das três populações. Dentro de cada população, a cada ciclo da doença, cerca de três pró-basídios distintos foram inoculados cada qual em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio YM, e incubados a 28°C por 24 h sob agitação constante (200 rpm). Cerca de 100 μL dessa suspensão de esporídios (0,7 OD a 600 nm) foram diluídas em série (10^{-1} a 10^{-4}) com solução ($\text{NaCl } 0,85 \text{ Mol L}^{-1}$) (10^{-1} a 10^{-4}) e foram plaqueadas com alça de Drigalski em meio YM sólido. Após 24h de crescimento a 28°C sem iluminação, as placas foram observadas em microscopia de luz, para seleção de colônias isoladas de esporídios, que foram transferidas com palito para uma nova placa contendo meio YM.

3.5 Testes de compatibilidade para tipos de reação sexual (*plate mating type reaction*)

Esses testes foram realizados entre os esporídios isolados a partir da germinação *in vitro* de teliósporos isolados para cada progênie (descritos no item

2.2.4) e esporídios de tipo de reação sexual conhecido considerando os trabalhos de Reis (2012) e Kmit (2014). O objetivo principal foi fenotipar os esporóides obtidos de cada progênie quanto ao seu tipo de reação sexual. Os testes consistiram combinação de esporídios haploides em mesmo sítio de reação em placa de Petri realizadas de forma controlada, similar ao teste *Bauch* (BAUCH, 1923; ALEXANDER; SRINIVASAN, 1966); utilizando os esporídios de tipos de reação sexual conhecido e aqueles cujo tipo sexual se desejava determinar. O tipo de reação sexual de cada esporídio foi determinado pela observação de seu hábito de crescimento (BÖLKER et al., 1992). Os esporídios foram considerados sexualmente compatíveis, isto é, portadores de tipos de reação sexual distintos, mediante a formação de micélios brancos no sítio de reação (Figura 2).

Figura 3 - Fotos do crescimento leveduriforme e micelial filamentosos de *S. scitamineum* em placas de meio YM. a) auto combinação de colônia monoclonal de esporídios haplóides (à esquerda); b) combinação entre colônias monoclonais de esporídios haplóides incompatíveis no *locus* b (no centro); c) Formação de micélio dicariótico pela combinação de colônias haplóides compatíveis no *locus* b (à direita). Fotos de autoria própria, 2012

Os testes compreenderam duas repetições biológicas para cada combinação entre colônias de células haploides distintas obtidas pela germinação *in vitro* de teliósporos, e também auto-combinação de cada colônia de células haploides para detectar possíveis contaminações cuja não ocorrência ajuda a corroborar os resultados das combinações. Os tipos de reação sexual obtidos foram denominados 'A' e 'B', sendo que a nomenclatura dos indivíduos parentais 18A, 39A, 39B, 39A*gfp* e 39B*gfp* remete ao número do chicote utilizado por Reis (2012). Considerando as progênies obtidas nos ciclos sucessivos de infecção, o grau de parentesco em relação à inoculação feita com os indivíduos parentais variou de F1 a F2 para esporídios e de F1 a F3 para teliósporos. Para cada esporídio dessas progênies o número que antecede a letra indicativa do tipo de reação sexual ('A' ou 'B') remete ao número da colônia monoclonal obtida na etapa de isolamento.

3.6 Avaliação da expressão do gene *gfp* em teliósporos e linhagens mutantes GFP

A expressão do gene *gfp* foi avaliada qualitativamente pela observação de lâminas produzidas com as suspensões de teliósporos mutantes GFP e de células haploides de cada um dos tipos de reação sexual descritos obtidas da progênie F1 desses teliósporos (descritas nos itens 3.1.4 e 3.1.5). As lâminas foram observadas em microscópio de Epifluorescência (Leica DFC 365 FX, Leica Microsystems) semelhantemente ao descrito anteriormente (SPELLIG et al., 1996; LORANG et al., 2001), em colaboração com a pesquisadora Dr^a. Giselle de Carvalho, responsável pelo desenvolvimento de um trabalho que inclui a análise *in vitro* e *in planta* de linhagens de *S. scitamineum* com expressão heteróloga do gene *gfp*. Os teliósporos mutantes GFP e respectivas progênies produzidas com auxílio da referida pesquisadora também estão sendo empregados nos estudos desenvolvidos por ela.

3.7 Técnicas gerais de biologia molecular

Estratégias de rotina em laboratório de biologia molecular foram realizadas de acordo com metodologias descritas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.7.1 Extração do DNA total de esporídios haplóides

Colônias de esporídios parentais e pertencentes às progênies F1 e F2 selvagem e mutante GFP tiveram seu DNA extraído segundo a metodologia descrita a seguir. Inicialmente, cada colônia foi inoculada em meio líquido YEDP (10g extrato de levedura; 10g peptona de soja; 20g D- glicose; água destilada qsp 1L), colocadas sob agitação de 200 rpm a 28°C por 24 horas. O conteúdo do frasco foi centrifugado a 14.500 rpm por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, o centrifugado obtido foi acondicionado em ultrafreezer por 4 horas, sendo depois transferido para almofariz. Neste procedeu-se a maceração das amostras pela adição de nitrogênio líquido e uso de pistilo até obtenção de pó branco, que foi adicionado de 1,7 mL de solução de lise e 200 µL de 2-betamercaptoetanol, sendo feita a homogeneização, e transferência do conteúdo para 2 microtubos de 2 mL, 950 µL em cada. Em cada microtubo foram adicionados 950 µL de fenol saturado,

homogeneizando-se por inversão por 1 minuto. Centrifugou-se a 14.500 rpm por 20 minutos, transferindo-se a fração superior para outro microtubo de 2 mL. Em seguida, o mesmo volume de clorofórmio foi adicionado em cada microtubo sendo adicionado, homogeneizando-se por inversão por 1 minuto. A fração superior foi transferida para outro microtubo de 2 mL, adicionando-se 1 volume de isopropanol gelado, homogeneizando-se por inversão por 1 minuto. As amostras mantidas em freezer (-20°C) por 2 horas para aumentar a eficiência da precipitação do DNA. Depois disso, realizou-se nova centrifugação a 14.500 rpm por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante, e adicionando-se 500 µL de etanol 70% gelado. Os microtubos foram gentilmente invertidos e centrifugados a 14.500 rpm por 6 minutos, descartando-se o sobrenadante, sendo esse processo repetido duas vezes. Após isso, os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente com a boca voltada para baixo. Os *pellets* secos de DNA foram ressuspensos em 100 µL de solução de T₁₀E₁ (TrisHCl 10mM pH 8, EDTA 1mM pH 8) adicionada de 1 mg mL⁻¹ de enzima RNase A livre de DNase e Proteases (Fermentas). Procedeu-se então tratamento térmico por 20 minutos a 37°C em banho-maria para ação da enzima, conforme recomendação do fabricante. Por fim, uma alíquota de 2 µL do DNA obtido foi separada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TBE 0,5X, por 2 horas a 25 mA, corado com SYBR Gold® (Invitrogen) 500X e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.7.2 RFLP da região subtelomérica

Para a maioria das progênies de esporídios obtidas em ciclos sucessivos da doença para as três populações, a genotipagem quanto ao tel-RFLP foi realizada para 5 esporídios de cada tipo de reação sexual descritos para *S. scitamineum* (ALBERT; SCHENCK, 1996; IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007). Neste trabalho, como citado anteriormente os tipos de reação sexual foram chamados de 'A' e 'B'. Esses indivíduos da progênie juntamente com os indivíduos parentais sexualmente compatíveis que lhes deram origem compuseram cada membrana, não ultrapassando um total de 15 esporídios. A seguir será descrita a metodologia empregada para tal genotipagem.

3.7.2.1 Digestão do DNA genômico e eletroforese

O DNA genômico dos esporídeos pertencentes às progênes isoladas a cada ciclo da doença (item 3.7.1) foi incubado por 12 horas a 37°C com a endonuclease *EcoRI* (Fermentas). Cada reação totalizou volume final de 20 µL (15 µg de DNA, 2 U da endonuclease, tampão de reação específico para *EcoRI* [1X]). Alíquotas de 20µL de DNA digerido sofreram eletroforese por 16 horas a 10mA em gel de agarose 0,6% (p/v) de cerca de 20 cm x 22,5 cm feito com tampão TBE 0,5X. A coloração foi feita com SYBR Gold ® (Invitrogen) 500X e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.7.2.2 Transferência alcalina

O gel de agarose obtido no item anterior foi submetido à depurinação através da incubação em 500 mL de solução de HCl (0,25M) por 10 minutos, sob agitação (90 rpm). Em seguida, foram feitas duas lavagens consecutivas do gel utilizando imersão em solução de NaCl (1,5 M) e NaOH (0,5M) por 15 minutos, para desnaturação do DNA. Depois disso foram feitas duas reações de neutralização consecutivas com a solução (TrisHCl 0,5 M; NaCl 1,5M, pH 7,5), por 15 minutos sob agitação. A membrana de náilon (HYBOND- N+ - Amersham) foi imersa em solução SSC 2X (NaCl 0,3M, Citrato de sódio 0,03 M, pH 7,0). A transferência foi realizada pela colocação do gel sob uma placa de vidro, sendo posicionada uma membrana de náilon umidificada em solução SSC 2X sobre o gel, sendo o conjunto coberto por papéis de filtro. A transferência ocorreu em 14 h. A fixação do DNA à membrana foi realizada pela incubação das membranas em estufa a 80°C por 2 h, segundo metodologia descrita (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.7.2.3 Pré-Hibridização da membrana de DNA genômico

A membrana foi acondicionada em garrafas próprias a hibridização, contendo 50 µL da solução de pré-hibridização por cm² de membrana, sendo levada ao forno a 50°C, em rotação por período 1 - 2 h. A solução de pré-hibridização foi composta por 0,5 M NaCl, 4% (p/v), reagente bloqueador e tampão de hibridização, seguindo o protocolo do kit *AlkPhos Direct Labelling Reagents* - Amersham (GE Healthcare).

3.7.2.4 Preparo e marcação das sondas

A sonda foi preparada a partir do plasmídeo pTEL13 que corresponde à região telomérica (LEVIS et al., 1997). Células de *Escherichia coli* contendo o referido plasmídeo que apresenta gene de resistência ao antibiótico ampicilina foram gentilmente cedidas pela Pesquisadora Dr^a Marisa Vieira Queiroz da Universidade Federal de Viçosa. Essas células foram crescidas a 37°C por 15 horas em 50 mL de meio *Circle grow*® (MP Biomedicals) contendo 200mg/mL de ampicilina. As células de *E. coli* foram centrifugadas a 14.500 rpm por 5 minutos, e sofreram lise alcalina para extração do plasmídeo (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para confirmação da sequência repetitiva o DNA plasmidial obtido foi submetido à reação de PCR utilizando os *primers* M13 (*forward*: GTA AAA CGA CGG CCA G; *reverse*: CAG GAA ACA GCT ATG AC) de acordo com as condições: 2 µL de amostra na concentração de 15 ng em 50 µL de reação contendo: 1,5 mM MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 0,2µM de cada *primer*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, Tampão da *Taq* 10X e água ultrapura para completar o volume da reação. As condições da reação da PCR incluíram desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C para anelamento dos *primers*, extensão de 40 s a 72°C e uma extensão final de 3 minutos a 72°C em termociclador (Veriti 96 Well ThermalCycler, Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, TBE 0,5X, a 25 mA por 2 h. Uma vez confirmada a presença do inserto desejado, alíquotas de 30 µg de DNA plasmidial foram incubadas por 12 horas a 37°C com 5U das endonucleases *Eco*RI (Fermentas) e *Bam*HI (Fermentas), tampão tango 1X (Fermentas) totalizando volume final de 50 µL por reação com água ultrapura. Alíquotas de 2 µL de DNA digerido foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) de cerca de 10 cm em tampão TBE 0,5X, por 12 horas a 15 mA, sendo coradas com brometo de etídio (1 mg/mL⁻¹) e fotografadas sob ação de luz UV em fotodocumentador *ImageQuant* 300 (GE). A sonda constituiu no inserto purificado a partir do gel de agarose utilizando o kit *GFX*® (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante. A marcação da sonda e a hibridização foram realizadas em conformidade com o protocolo do kit *Gene Images*™ *AlkPhos Direct*™ *Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

3.7.2.5 Hibridização

Uma vez marcada, a sonda foi adicionada dentro da solução de pré-hibridização dentro da garrafa juntamente com a solução de pré-hibridização, e retornou ao forno a 55°C, sob rotação por mais 12 horas.

3.7.2.6 Exposição e revelação

A membrana acondicionada em um saco plástico recebeu 0,8 mL de detector, que foi homogeneizado sobre a superfície da membrana seguida de incubação por 10 minutos ao abrigo da luz. Depois disso, o excesso do detector foi removido, sendo o saco plástico selado para sua deposição dentro de um cassete de exposição. Sobre o saco plástico contendo a membrana foi colocado um filme de revelação (KODAK), sendo o cassete fechado por 4 horas ao abrigo da luz. Em seguida, o cassete foi aberto, e o filme foi imerso em solução reveladora (KODAK) por 2 minutos, em seguida em água destilada por 30 segundos, solução fixadora (KODAK) por 1 minuto e por fim água destilada por 30 segundos. Por fim, os filmes foram secos a temperatura ambiente por 5 minutos.

3.8 Estimativas de similaridade genética

As estimativas de similaridade genética dos esporídios obtidos nas diferentes progênes foram obtidas através do software PAST (PAlaeontological STatistics, version 1.15, <http://folk.uio.no/ohammer/past>) (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) considerando-se o coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901). Justifica-se a escolha deste coeficiente porque este considera o número de presença de marcas comuns em relação ao total de marcas analisadas, desconsiderando o número de ausências conjuntas. O algoritmo de médias aritméticas de grupos não ponderados UPGMA (*unweighted pair-group method arithmetic averages*) foi empregado na construção dos dendrogramas, com auxílio do software PAST. Amplamente utilizado em estudos de divergência genética, esse algoritmo confere pesos iguais para cada indivíduo de um mesmo grupo e calcula a similaridade média de um indivíduo a ser inserido no grupo já existente, sem, contudo, considerar a estrutura do grupo *a priori* (SNEATH; SOKAL, 1973; DUARTE; SANTOS; MELO, 1999). A consistência dos dendrogramas foi avaliada através da reamostragem *bootstrap*, a qual representa a frequência com

que o agrupamento aparece nas réplicas de *bootstrap*, sendo os valores calculados com base em 1.000 replicações.

As principais etapas da metodologia utilizada para análise das marcas RFLP associadas aos sítios de restrição da região subtelomérica de *S. scitamineum* são mostradas na figura 4:

Figura 4 - Etapas principais da metodologia empregada para análise da região subtelomérica de esporídios parentais e obtidos a partir da progênie F1. A. Coleta chicote em casa de vegetação. B. Chicote seco evidenciando massa de teliósporos. C. Isolamento e germinação *in vitro* de teliósporos selvagens e mutantes GFP – microscopia de luz aumento de 1000x. D. Separação de culturas monoclonais de esporídios a partir da inoculação feita com (C). E. Culturas monoclonais de esporídios - microscopia de luz aumento de 400x. F. Testes de compatibilidade sexual em placa realizados com as progênies obtidas em (D). G. Extração do DNA genômico das linhagens. H. Obtenção de marcas RFLP associadas à região subtelomérica via *Southern blotting* e hibridização com sonda pTel13. Fotos de autoria própria (2012, 2013, 2014)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cada ciclo da doença, foram coletados teliósporos e esporídios decorrentes da germinação dos mesmos para compor as progênies. Dentro de cada progênie, os esporídeos foram fenotipados quanto ao tipo de reação sexual e aproximadamente 5 esporídeos de cada tipo sexual foram genotipados quanto ao RFLP da região subtelomérica. O aumento do número de esporídios analisados dentro de diferentes eventos meióticos ocorrentes numa mesma geração (progênie de esporídios) em três populações distintas de *S. scitamineum* expandiu os estudos iniciados por Reis (2012) na região subtelomérica desse fungo a ciclos sucessivos de infecção.

4.1 Coleta dos chicotes, isolamento de teliósporos e de esporídios haplóides

Todos os ciclos de inoculações sucessivas realizadas foram bem sucedidos na produção de pelo menos um chicote, considerando-se as três populações do patógeno estabelecidas neste trabalho descritas anteriormente (a, b e c) (Tabela 1). Para as populações (a) e (b) obtiveram-se dois ciclos sucessivos da doença, e para a população c foi obtido um ciclo consecutivo da doença. As inoculações feitas com os teliósporos produzidos a cada ciclo de doença para avaliação da capacidade desses esporos causarem a doença também produziram ao menos um chicote para todas as progênies analisadas (Tabela 1).

4.1.1 Primeiro ciclo da doença

Considerando-se o primeiro ciclo de doença (F1), os chicotes foram emitidos a partir de 60 dias e 120 dias após a inoculação (dai) para as populações obtidas, respectivamente, pela inoculação de (b) esporídios selvagens 18A e 39B e de (a) teliósporos selvagens (do chicote 39 produzido por planta cv IACSP 98 205353 gentilmente cedido pela Dr^a. Silvana Creste do Centro APTA Cana – IAC Ribeirão Preto; REIS, 2012). Inoculações feitas em minitoletes da cultivar CB 49-260 sob as mesmas condições com esporídios F1 da população (a) e (c) esporídios transformados 39A*gfp* e 39B*gfp* emitiram chicotes, respectivamente, a partir de 120 dai e 200 dai. Esse aumento do período de incubação da doença observado na

Tabela 1 - Coleção de teliósporos e esporídios de *S. scitamineum* parentais e pertencentes às progênes produzidas em três ciclos sucessivos de inoculações de cana-de-açúcar

Data inoculação origem	Inoculação de origem	Data isolamento	Origem do chicote (cv)	Genealogia obtida
-	Teliósporos (natural)	2011	Chicote 18 - cultivar (cv) SP 89 1115 Paranaíba - MS (REIS, 2012)	Parental 18A (população b)
-	Teliósporos (natural)	2011	Chicote 39 - cv IACSP 98 205353 (REIS, 2012)	Parentais 39A e 39B (população a e b)
jul/12	Teliósporos do chicote 39	out/12	F1 do chicote 39	esporídios F1 pop a (F2 de 39)
dez/12	Esporídios parentais pop b (18Ax39B)	fev/13	cv IACSP 95-5000	esporídios F1 pop b F1 (18A x 39B)
dez/12	Idem	mai/13	cv IACSP 95-5000	Idem
mar/13	Teliósporos F1 pop b	jul/13	cv CB 49-260	teliósporos F2 pop b
abr/13	Esporídios F1 pop b (9Ax10B)	ago/13	cv RB 92-5345	esporídios F2 pop b F2 (18A x 39B)
abr/13	Idem	ago/13	cv RB 92-5345	Esporídios F2 pop b F2 (18A x 39B)
mar/13	Esporídios parentais mutantes pop c (39Agfp x 39Bgfp)	out/13	cv CB 49-260	Esporídios F1 GFP F1 (39Agfp x 39Bgfp)
mar/13	Esporídios F1 pop a	jul/13	cv CB 49-260	Esporídios F2 pop a (F3 de 39)
jun/13	Esporídios parentais mutantes pop c (39Agfpx 39Bgfp)	mar/14	clone IAC 66-6	Teliósporos F1 GFP pop c
dez/13	Teliósporos F2 pop a	mai/14	clone IAC 66-6	Teliósporos F3 pop a (F4 de 39)
dez/13	Esporídios F2 pop a	abr/14	clone IAC 66-6	Teliósporos F3 pop a (F4 de 39)
dez/13	Esporídios F2 pop b (17Ax31B)	mai/14	clone IAC 66-6	Teliósporos F3 pop b F3 (18A x 39B)
dez/13	Teliósporos F1 GFP pop c	mai/14	clone IAC 66-6	Teliósporos F2 GFP pop c F2 (39Agfp x 39Bgfp)
dez/13	Esporídios F1 GFP pop c	mai/14	clone IAC 66-6	Idem

população (c) foi atribuído ao direcionamento de recursos das células e hifas do fungo para a produção da proteína verde fluorescente (GFP) durante a colonização da cana-de-açúcar. Alguns dos teliósporos produzidos por plantas inoculadas com os teliósporos selvagens, e com os pares de esporídios 18A e 39B; e 39A*gfp* e 39B*gfp* foram direcionados para o isolamento das progênes F1 para as três populações, mediante a germinação desses esporos *in vitro* durante a qual foram produzidos os esporídios, também elencados na tabela 1.

4.1.2 Segundo ciclo da doença

No segundo ciclo da doença, os chicotes foram emitidos cerca de 120 dai para a população (a), 120 dai para a população (b) e novamente observou-se ocorrência de período maior de incubação para a população (c), de 150 dai, considerando-se os dois chicotes produzidos a partir das inoculações realizadas com os esporos F1 GFP em clones IAC66-6 em maio de 2014. Consequentemente, não foi possível realizar o isolamento de esporídios da progênie F2 GFP a serem empregados em inoculações visando o terceiro ciclo da doença para essa população. Além disso, um chicote também foi produzido por uma planta do clone IAC66-6 inoculada com indivíduos F1 GFP (36A x 5B) da população (c). Os teliósporos coletados serão empregados em inoculações e usos futuros.

4.1.3 Terceiro ciclo da doença

A partir das progênes F2 obtidas do ciclo anterior para as populações (a) e (b), foram escolhidos ao acaso dois esporídios com tipos de reação sexual distintos para novo ciclo de inoculação e produção da doença. Considerando as progênes da geração F2 (teliósporos 39 F3) e F2 (18A x 39B) foram sorteados para compor os cruzamentos, respectivamente, os esporídios 20A e 29B, e 17A e 31B, constituindo dois casos distintos de fecundação intra-tétrade. Até o momento três chicotes produzidos por plantas do clone IAC66-6 inoculados com teliósporos F2 da população (a), e dois chicotes produzidos pela inoculação da mesma cultivar com indivíduos F2 (18A x 39B) foram coletados. Em todos os casos, os teliósporos foram armazenados para usos futuros, corroborando uma vez mais a eficiência da inoculação com esporídios em ciclos sucessivos do carvão da cana-de-açúcar.

4.2 RFLP da região subtelomérica

Os esporídios haplóides selvagens e mutantes GFP parentais, juntamente com os esporídios F1 obtidos para as populações (a), (b) e (c), e os esporídios F2 obtidos para as populações (a) e (b) foram empregados na análise do comportamento genético de marcas tel-RFLP ao longo de ciclos sucessivos de inoculações, considerando-se os eventos de divisão celular reducional (meiose).

4.2.1 Digestão do DNA genômico total dos esporídios e *Southern blotting*

Os fragmentos de DNA obtidos pela restrição completa do DNA genômico total dos esporídios pertencentes às diferentes progênes (figura 5) foram transferidos para membrana de náilon por capilaridade (*Southern blotting*).

Para observação dos 60 esporídios analisados neste trabalho foram produzidas 7 membranas.

4.2.2 Genotipagem das marcas tel-RFLP

A seguir serão elencados e discutidos os resultados do RFLP associado à região subtelomérica de *S. scitamineum* em ciclos sucessivos da doença. Neste trabalho todas as restrições necessárias para a obtenção dos numerosos fragmentos de DNA que representam polimorfismos a serem acessados foram feitas com a endonuclease *EcoRI*. Ao todo, das 41 marcas tel-RFLP detectadas, 11 marcas se conservaram entre todos os 60 esporídios analisados, e as 30 marcas restantes foram polimórficas para pelo menos em um esporídio. A análise comparativa dos perfis de marcas tel-RFLP dos indivíduos 39A e 39B selvagens, e dos indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp*, obtidos pela inserção heteróloga em eventos separados de cópia única do gene *gfp* evidenciou aparecimento de uma marca exclusiva no indivíduo 39A*gfp* em substituição a uma banda comum aos três indivíduos restantes (figura 6).

Figura 6 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais 39A, 39B, 39A*gfp* e 39B*gfp* sugerindo a detecção da inserção da cópia do gene *gfp* na região subtelomérica do esporídio 39A*gfp*. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*

Observa-se que os esporídios 39B e 39Bgfp apresentaram perfis idênticos considerando as 41 marcas tel-RFLP analisadas neste trabalho. A localização da referida marca *gfp* exclusiva do esporídio 39Agfp está assinalada por dois asteriscos na autorradiografia das marcas tel-RFLP dos parentais 39Agfp e 39Bgfp e de sua progênie GFP F1 obtida a partir do pró-basídio 2 (figura 7).

Figura 7 – Autorradiografia que mostra a progênie GFP F1 (39Agfp x 39Bgfp) do pró-basídio 2 e de seus parentais GFP. Cada canaleta apresenta os perfis tel-RFLP correspondentes à hibridização com a sonda ptel13, e constitui parte da diversidade obtida pela restrição do DNA desses indivíduos. A.39Agfp (parental 1), B.39Bgfp (parental 2), C a L. Esporídios F1(39Agfp x 39Bgfp) de teliósporo 2 GFP. C. 7A, D. 8A, E. 12A, F. 16A, G. 26A, H. 11B, I. 19B, J. 23B, K. 24B, L. 33B, M. As setas indicam bandas polimórficas, sendo a marca do esporídio 39Agfp assinalada com dois asteriscos possivelmente associada à inserção do gene *gfp* na região subtelomérica do mesmo. As marcas assinaladas com um único asterisco são exclusivas da progênie F1 GFP, sendo decorrentes de recombinação homóloga

A inserção da cópia desse gene repórter na região subtelomérica do esporídio 39A*gfp* mostra-se plausível devido à natureza repetitiva constitutivamente mais sujeita a eventos de recombinação que a região subtelomérica e telomérica apresentam (BLACKBURN, 2001; THAM; ZAKIAN, 2002). Considerando-se a mesma figura 14, as marcas tel-RFLP assinaladas com apenas um asterisco foram observadas exclusivamente nas progêneses GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*). O aparecimento dessas marcas é resultante de eventos de recombinação entre cromátides-irmãs durante a meiose (*crossing-over*), corroborando o grande dinamismo dessas marcas mesmo em apenas um ciclo consecutivo da doença na população c. Apenas a progênie de esporídios obtida a partir do pró-basídio 2 dessa geração F1 foi mostrada.

As marcas RFLP constituem-se como *loci* cromossômicos de ação codominante altamente reprodutíveis passíveis de segregação mendeliana produzidos pela ação de endonucleases de restrição amplamente utilizados em estudos genéticos desde a década de 1980 (VIEIRA; NATAL; SILVA FILHO, 2004). A altíssima reprodutibilidade do marcador tel-RFLP foi evidenciada pela observação de perfis idênticos entre as hibridizações feitas com a sonda ptel13 (LEVIS et al., 1997) empregando-se os esporídios 18A, 39A e 39B sob restrição com a endonuclease *EcoRI* neste trabalho com os perfis obtidos por Reis (2012) sob as mesmas condições. Como o número de sítios de restrição do tipo II presentes no DNA genômico mesmo considerando-se endonucleases de corte raro é elevado, uma vez terminada a restrição, apenas parte da variabilidade advinda da produção dos fragmentos encerrados por dois sítios consecutivos de restrição poderá ser detectada em uma autorradiografia mediante a hibridização com sequências complementares a porções dos fragmentos denominadas sondas. Duas fontes principais de polimorfismo são acessíveis pelo uso de marcadores RFLP. A primeira delas é o comprimento dos fragmentos produzidos, expresso no nome da técnica. A segunda fonte de polimorfismo advém da possibilidade de detecção de alteração de sítios de restrição do tipo II entre diferentes indivíduos analisados seja por adição, deleção ou substituição de bases nitrogenadas, ou alterações cromossômicas (MICHELMORE; HULBERT, 1987; VIEIRA; NATAL; SILVA FILHO, 2004).

Conforme dito anteriormente, a região subtelomérica juntamente com a região telomérica apresentam sequências repetitivas, com relatos de associações com elementos transponíveis (BLACKBURN, 2001; ABAD et al., 2004), sendo portanto

Por consequência, a amostragem ao acaso dos esporídios para a composição dos subconjuntos de tipos de reação sexual distintos para a composição das progênes foi bem sucedida em acessar haplótipos distintos nas diferentes progênes e para ambos os tipos de reação sexual.

Conforme tratado anteriormente, os indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp* por terem recebido inserção do gene *gfp* apresentaram maiores diferenças entre seus perfis tel-RFLP em relação aos tipos selvagens, que eram mais similares quanto a suas marcas RFLP. Além disso, observando-se os haplótipos obtidos em cada progênie obtida pelo cruzamento controlado desses esporídios, nota-se que a recombinação das marcas RFLP ocorreu tanto dentro de um mesmo tipo de reação sexual quanto entre tipos diferentes de reação sexual dentro de uma mesma progênie. A observação dos haplótipos mostrados na figura 8 revelou ainda que houve recombinação das marcas RFLP entre as duas progênes obtidas de cruzamento controlado. Contudo, não foi possível determinar quantos eventos de recombinação ocorreram, dado o elevado número de marcas tel-RFLP detectadas. Isso se deve ao fato de serem passíveis de detecção cerca de duas marcas do referido marcador para cada um dos 22 cromossomos do fungo (comunicação pessoal Prof^a. Dr^a. Claudia Vitorello). No que se refere à progênie obtida pelo pró-basídio 2 F1 GFP (39A*gfp* x 39B*gfp*), os esporídios 7A, 8A e 12A apresentam o mesmo tipo de reação sexual e perfis de tel-RFLP idênticos entre si, sendo o mesmo comportamento observado para os esporídios 11B, 23B, 24B e 33B dessa mesma progênie (Figura 5); e para os indivíduos 27A e 32B, e 25B e 28B na progênie do pró-basídio1 F1 GFP (39A*gfp* x 39B*gfp*). Observa-se que a observação de esporídios idênticos advém da metodologia empregada para isolamento das progênes de esporídios, a qual não inviabilizou a representatividade das tétrades que constituem cada divisão reducional (figura 8).

No que se refere à população (b), iniciada por cruzamento controlado entre esporídios de teliósporos distintos e com perfis de tel-RFLP mais contrastantes, obtiveram-se respectivamente 9 e 8 haplótipos distintos para as marcas RFLP em dois ciclos consecutivos da doença, F1 e F2. Novamente, observou-se a recombinação das marcas tel-RFLP entre esporídios de um mesmo tipo de reação sexual em cada ciclo analisado (figura 9). O aumento sutil no número de haplótipos nas progênes da população (b) em relação ao observado na população (c) poderia ser resultante da maior fonte inicial de variação entre as marcas tel-RFLP dos

indivíduos parentais 18A e 39B, da população (b). Essa maior dissimilaridade entre as marcas desses parentais aumentou o número de marcas RFLP que vieram a sofrer eventos de segregação independente e mesmo de recombinação observados nessa população (figura 9).

Figura 9 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais 18A e 39B e as respectivas progênes F1 e F2 (cujos esporídios F1 empregados como parentais estão circutados em preto). A maior quantidade de variação inicial gerou padrões de interpretação mais complexa. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*

No entanto, novamente não foi possível determinar o número total de eventos de recombinação que deram origem aos referidos haplótipos dado o número elevado de marcas tel-RFLP produzidas, potencialmente duas por cromossomo. Na geração F1 analisada, considerando os indivíduos do tipo de reação sexual 'A', o grupo formado pelos indivíduos 26A e 49A, mostrou-se mais distante do outro grupo formado pelos indivíduos 1A, 9A, 13A e 19A, em relação ao comportamento observado na dentro de cada tipo de reação sexual na população (c). Esse maior distanciamento entre os grupos desse tipo de reação sexual 'A' na população (b) sugere a ocorrência de recombinação homóloga durante a meiose I. Ainda considerando a figura 9, na mesma geração F1 destacamos eventos de recombinação entre esporídios de tipos de reação sexual distintos, e a presença de

esporídios idênticos para o pool de 41 marcas analisado (1A e 9A; 10B, 12B e 15B todos da F1). Interessantemente, o esporídio 21A, da F2, foi agrupado juntamente com os demais indivíduos da F1, incluindo um grupo que contém seu parental de mesmo tipo sexual 9A. No entanto, essa foi a maior semelhança observada entre um indivíduo parental e outro da progênie de um ciclo consecutivo deste trabalho. Esse comportamento poderia ser atribuído novamente ao número elevado de marcas detectadas, mas, sobretudo ao dinamismo das regiões subteloméricas em dois ciclos consecutivos da doença. O agrupamento de indivíduos de mesmo tipo de reação sexual observada nas populações (b) e (c) (figuras 9 e 8) corroborou a ocorrência de segregação dos *loci* sexuais durante a meiose I.

Por fim, analisaremos as marcas tel-RFLP das progênes de esporídios da população (a) que diferentemente das populações (b) e (c) não apresenta evidências de produção de teliósporos idênticos do ponto de vista genético (figura 10). Isso se deve ao fato de terem sido empregados cruzamentos naturais para obtenção do primeiro ciclo de doença da população (a).

Figura 10 - Dendrograma obtido mediante comparação das marcas tel-RFLP dos esporídios 39A e 39B e das progênes F1 e F2 da população (a). Os esporídios F1 empregados como parentais para a produção da progênie F2 estão circulosados em preto. Eventos de recombinação foram observados entre esporídios de mesmo tipo de reação sexual e entre esporídios de tipos distintos de reação sexual na progênie F2. Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*

A utilização de cruzamento natural impossibilitou a determinação dos indivíduos parentais cujo cruzamento veio a formar a progênie F1 da população (a). Por essa razão, os esporídios 39A e 39B foram acrescentados na análise das marcas tel-RFLP em razão de terem sido obtidos do chicote 39 (REIS, 2012), sendo portanto, aparentados das progênies da população (a). A observação da figura 10 revela que para a referida população foram obtidos, respectivamente, 2, 2 e 4 haplótipos para os três pró-basídios F1 analisados, e cerca de 7 haplótipos para a progênie F2 obtida pelo cruzamento controlado entre esporídios obtidos de diferentes pró-basídios F1 (1A do pró-basídio 2 e 1B do pró-basídio 3). Eventos de recombinação de marcas tel-RFLP foram observados entre os esporídios pertencentes a uma mesma progênie de esporídios (como a progênie F2). Considerando a geração F2 e seus parentais houve agrupamento de alguns esporídios do tipo sexual 'A' com seu parental do tipo sexual 'B', sugerindo ocorrência de evento de recombinação homóloga (crossing-over). No que tange a análise das progênies F1 da população (a), mesmo que as progênies F1 dos 3 pró-basídios utilizados tenham compreendido apenas 2 a 4 indivíduos, foi possível detectar eventos de recombinação na segregação de cromossomos homólogos na meiose I de indivíduos obtidos de um mesmo chicote (figura 10). No entanto, o número elevado de marcas tel-RFLP impossibilitou que o número de eventos de recombinação fosse determinado.

Novamente foram observados indivíduos geneticamente idênticos considerando-se as marcas tel-RFLP analisadas: os dois indivíduos do tipo de reação sexual 'A' isolados da progênie F1 do pró-basídio 3. Esse comportamento é decorrente da metodologia empregada para o isolamento dos esporídios que já foi citada anteriormente. Ressaltamos também que indivíduos F1 empregados nos cruzamentos sexuais que originaram a geração F2 apareceram circulados de preto, tendo vindo de dois pró-basídios distintos de um mesmo chicote, simulando assim ocorrência de fecundação cruzada a partir de inóculo produzido por uma mesma planta. (figura 10).

Uma última observação, contudo, chamou a atenção: o esporídio 2B F1 do pró-basídio 1 apresentou perfil de marcas tel-RFLP idêntico ao apresentado pelos indivíduos 2B e 3B do pró-basídio 3 (figura 10). Trata-se de uma observação singular, e pouco intuitiva, haja vista a chance muito baixa de ocorrência dessa coincidência considerando a genética indeterminável das hifas dicarióticas que

infectaram os minitoletes de cana-de-açúcar advindas da germinação *in loco* dos teliósporos utilizados na inoculação inicial. Atribuiu-se a observação desse evento à limitação de resolução de bandas inerente da hibridização de marcas RFLP, sugerindo-se que esses esporídios advindos da germinação de teliósporos distintos dificilmente apresentariam mesmo perfil caso fosse possível contabilizar para todos os esporídios a totalidade do conjunto formado pelas duas marcas associadas aos telômeros existentes por cromossomo.

O dendrograma apresentado na figura 11 representa a análise conjunta de todas as 41 marcas tel-RFLP dos 60 esporídios utilizados nas análises desse trabalho. As progênies das respectivas populações foram representadas por retângulos com diferentes tons de cinza, sendo os parentais das progênies F1 representados por retângulos pretos com a letra P em branco. Os três retângulos pretos representaram, respectivamente, os seguintes grupos de parentais: 39B e 39B*gfp*; 39A e 39A*gfp*; e 18A (selvagem). As duas progênies (F1 e F2) da população (b), que teve como um de seus parentais o esporídio 18A do chicote 18 formaram um grupo separado das demais populações. Esse comportamento se explica em razão de as populações (a) e (c) ambas serem descendentes dos esporídios e teliósporos do chicote 39 (REIS, 2012). Em outras palavras, foi possível rastrear indivíduos pertencentes a uma mesma população obtida de ciclos sucessivos da doença apesar do número elevado de marcas tel-RFLP. A genotipagem de indivíduos utilizando-se as marcas tel-RFLP já havia sido bem sucedida para avaliar se teliósporos do fungo *Ustilago hordei* atribuídos a uma determinada linhagem de fato pertenciam a ela, mediante comparação do perfil dessas marcas (ABDENNADHER; MILLS, 2000). No trabalho de Reis (2012), a genotipagem das marcas tel-RFLP de isolados de *S. scitamineum* coletados de canaviais localizados em estados diferentes do Brasil constituíram de fato o primeiro relato de estudo genético do carvão da cana-de-açúcar do país utilizando-se esse marcador. Este trabalho constituiu, portanto, o primeiro relato de uso de marcas tel-RFLP no sistema carvão-cana-de-açúcar para rastreabilidade de gerações consecutivas da doença, semelhantemente ao realizado por Abdennadher e Mills (2000) com o sistema *U. hordei*-aveia. Como consequência, reiterou-se a importância das marcas tel-RFLP em estudos genéticos de *S. scitamineum* iniciada por Reis (2012), conferindo à genotipagem dessas marcas também um promissor potencial como ferramenta de

4.3 Fenotipagem sexual e sua importância

A fenotipagem sexual realizada durante o isolamento das progênies de esporídios das diferentes populações produzidas neste trabalho inegavelmente contribuiu para aumentar as chances de isolamento dos quatro esporídios produzidos a cada divisão meiótica nos pró-basídios. No entanto, é pertinente ressaltar que a informação advinda da determinação do tipo de reação sexual também auxiliou na observação de um evento de recombinação homóloga numa das progênies analisadas neste trabalho. A progênie do pró-basídio 1 F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) mostrada na figura 12 constitui um recorte do dendrograma apresentado anteriormente para a população c. Nessa figura, a presença de um asterisco resalta o agrupamento dos esporídios 27A e 32B em razão de apresentarem perfis de tel-RFLP idênticos considerando-se as 41 marcas analisadas. Esses esporídios, juntamente com os indivíduos 20A e 37B formaram um grupo separado em relação outros grupos formados respectivamente pelos esporídios restantes do tipo sexual A, do tipo sexual B e seus parentais.

Figura 12 - Dendrograma das marcas tel-RFLP dos esporídios parentais GFP e da progênie do pró-basídio 1 F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) de *S. scitamineum* evidenciando recombinação entre cromossomos homólogos durante a meiose I (asterisco). Relações entre as marcas derivaram do coeficiente de Jaccard. O dendrograma foi produzido utilizando o método UPGMA. Números sob as ramificações são valores de *bootstrap*

A presença de tal comportamento em uma progênie na qual houve separação de marcas entre os demais esporídios de tipos de reação sexual distintos sugere a ocorrência de recombinação entre cromátides-irmãs na meiose I. No entanto, a observação desse evento de recombinação homóloga somente foi possível graças à fenotipagem sexual, considerando-se a segregação independente de ambos os *loci* sexuais e das marcas tel-RFLP. Ressaltamos ainda que esse agrupamento de dois esporídios de ambos os tipos de reação sexual num mesmo *cluster* também implicou a impossibilidade de separação dos dois tipos de reação sexual distintos utilizando-se as marcas tel-RFLP. Um das possíveis explicações para esse comportamento seria o contexto genômico que os loci de reação sexual ocupam em *S. scitamineum*. Resultados obtidos por Kmit (2014) durante o estudo dos *loci* de reação sexual desse patógeno revelaram que os referidos *loci* não estão ligados aos telômeros, sendo mais próximos da região centromérica nos diferentes tipos de reação sexual.

Como citado anteriormente, a patogenicidade em *S. scitamineum* depende da formação de hifas dicarióticas funcionais pela combinação de esporídios de tipos de reação sexual compatíveis (IZADI; MOOSAWI-JORF, 2007). Por sua vez, a cariogamia dos núcleos haplóides geneticamente distintos presentes nas células da hifa dicariótica ($n + n$) ocorre *in planta*, resultando em uma hifa diplóide que produzirá os teliósporos diplóides que originarão novos esporídios haplóides durante sua germinação. Com efeito, geneticamente cada teliósporo possui as duas cópias idiomórficas dos *loci* MAT1 e MAT2 da hifa dicariótica que lhes deu origem (TRIONE, 1980; BANNUET; HERSKOWITZ, 1994; ALBERT; SCHENCK, 1996; HARTMANN; KAHMANN; BÖLKER, 1996; MOOSAWI-JORF; IZADI, 2007). Conforme dito anteriormente, o sistema de reação sexual desse fungo é considerado bipolar, em que o tipo de reação sexual de cada esporídio é determinado pela presença de uma cópia única e idiomórfica dos *loci* MAT: MAT1 ou MAT2, cada qual formado por uma combinação de dois *subloci* distintos fisicamente ligados, chamados de *a* e *b*. Esses *subloci* correspondem aos *loci a* e *b* descritos para fungos com sistema tetrapolar, sendo o *locus a* associado ao reconhecimento químico celular do esporídios num sistema de ferormônio/receptor de membrana, e o *locus b* relacionado à compatibilidade dos núcleos presentes na hifa dicariótica formada para continuidade de seu crescimento que culmina com a emissão do apressório capaz de infectar os tecidos meristemáticos (BAKKEREN; KRONSTAD, 1993, 1994; BÖLKER, 2001). O indivíduo portador do *locus* MAT1 possui alelos diferentes simultaneamente

daqueles apresentados pelo portador do *locus* MAT2 considerando ambos os *subloci* (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). A reação sexual governada pelos *subloci* *a* e *b* está esquematizada na figura 13.

Figura 13 – Esquema da reação sexual envolvendo os *subloci* *a* e *b* que leva à formação da hifa dicariótica infectiva. As setas pretas indicam a interação entre os produtos gênicos produzidos pelos genes que os codificam. Os núcleos azuis indicam o tipo de reação sexual 'A' e os núcleos vermelhos o tipo de reação sexual 'B', o sistema de reconhecimento químico e de formação do fator de transcrição heterodimérico foram adaptados de Bölker, 2001

O estudo da estrutura dos *loci* associados à reação sexual em fungos sugeriu que esses organismos apresentassem configurações parecidas com estágios iniciais de evolução de cromossomos sexuais de plantas e animais, como o acúmulo de elementos repetitivos de DNA e regiões de supressão de recombinação (FRASER et al., 2004; FRASER; HEITMAN, 2005; HOOD; ANTONOVICS; KOSKELLA, 2004). Considerando fungos causadores de carvão em gramíneas, o fungo tetrapolar *U. maydis* apresenta *loci* *a* e *b* menos extensos, respectivamente 4,5-8kb e 4kb aproximadamente. No entanto, os *loci* associados à reação sexual do fungo bipolar

U. hordei são consideravelmente maiores, incluindo aproximadamente 500kb e outros genes não relacionados à compatibilidade sexual, além dos *loci* MAT1 ou MAT2 (BAKKEREN; KRONSTAD, 1994; BAKKEREN et al., 2006).

Os basidiomicetos bipolares *Cryptococcus neoformans* e *Malassezia globosa*, patógenos ocasionais de pele humana também apresentam extensões consideráveis nos *loci* relacionados à reação sexual, que ultrapassam respectivamente 100kb e 170kb, com pelo menos 20 genes e 82 genes (FRASER; HEITMAN, 2004). O aumento da região associada à reação sexual nesses basidiomicetos é atribuído ao movimento evolutivo de supressão de recombinação nessa região e em regiões adjacentes a ela no genoma. A levedura *M. sympodiales*, que ocupa nicho semelhante a *M. globosa* foi recentemente associada ao sistema de reação sexual pseudobipolar da levedura vermelha *Sporidiobolus salmonicolor* (COELHO; SAMPAIO; GONÇALVES, 2010). Foi descrita a presença de extensa região com limitação à recombinação entre os *subloci* a e b associados à reação sexual dessa levedura, especula-se que esse organismo esteja em processo de transição do sistema tetrapolar para o bipolar em decorrência de especialização de nicho, observada nas leveduras desse gênero associadas a doenças oportunistas em humanos (COELHO; SAMPAIO; GONÇALVES, 2013).

Como cada divisão reducional é singular, e os *subloci* a e b de *S. scitamineum* estão fisicamente ligados por uma região aparentemente refratária à recombinação de aproximadamente 50 kb (KMIT, 2014), cada progênie decorrente da germinação de teliósporos poderia resultar em esporídios haplóides potencialmente diferentes geneticamente dos dois indivíduos cuja reação sexual havia originado os teliósporos, considerando o efeito da segregação dos cromossomos homólogos e/ou da recombinação. No entanto, a não descrição até o presente momento de recombinação nos *loci* sexuais MAT1 ou MAT2 em fungos causadores de carvão com sistema bipolar (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008; KMIT, 2014) implica que cada um dos cromossomos homólogos portadores respectivamente dos *loci* MAT1 e MAT2 iria para células diferentes durante a meiose I. Haveria, portanto, duas cópias de cada *loci* nos cromossomos duplicados, e consequentemente cada célula filha da meiose I ao sofrer meiose II produziria dois indivíduos de mesmo tipo de reação sexual. A segregação dos tipos de reação sexual na meiose I tem sido associada à ocorrência de reação sexual intra-tétrade

em fungos como *Microbotryum violaceum* (KIRBY, 1984; ZAKHAROV, 1986; HOOD; ANTONOVICS, 2004; GIRAUD et al., 2008).

Dessa forma, considerando a segregação dos *loci* sexuais durante a meiose, a fenotipagem sexual realizada para todos os esporídios constituiu-se como uma valiosa informação para composição de cada progênie de esporídeos analisadas quanto a suas marcas tel-RFLP. Isso porque, além de permitir a investigação da segregação de cromossomos homólogos característica da meiose I, o conhecimento do tipo de reação sexual auxiliou na detecção de mais genótipos distintos (haplótipos) quanto às marcas tel-RFLP. Isso se justifica em razão da observação de possível desequilíbrio na proporção entre os diferentes tipos de reação sexual das progênies obtidas neste trabalho que também foi descrito para o sistema carvão da antera-*Silene latifolia* (KALTZ; SHYKOFF, 1997; GIRAUD et al., 2008). Dessa forma, assegurou-se que os esporídios portadores do tipo de reação sexual observados em menor número durante o isolamento das progênies (o tipo sexual 'A' na maior parte dos casos) fossem contemplados nas hibridizações com a sonda da região telomérica. Caso o sorteio dos indivíduos fosse aleatório e desconsiderasse o tipo de reação sexual haveria um viés significativamente maior nas análises das marcas tel-RFLP, pois cada tipo de reação sexual representa metade dos esporídios produzidos por cada pró-basídio mesmo que eventos *a posteriori* levem a taxas diferenciais de crescimento mitótico desses esporídios (KALTZ; SHYKOFF, 1997). Por essa razão, o sorteio dos esporídios submetidos à análise dessas marcas ocorreu de forma aleatória dentro de cada conjunto de indivíduos de tipos de reação sexual diferentes.

4.4 Desvios de segregação para os tipos de reação sexual

A cada divisão meiótica são produzidos dois esporídios de cada um dos dois tipos de reação sexual descritos para *S. scitamineum* (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Seria esperada que dentro da progênie advinda da germinação de cada teliósporo, por ocorrência da meiose, a proporção de esporídios de cada tipo de reação sexual descrito se aproximasse de 50%. No entanto, neste trabalho observamos um desequilíbrio entre a proporção de indivíduos de tipos de reação sexual distintos obtidos pela germinação *in vitro* de

teliósporos únicos. Consequentemente, o isolamento das progênes F1 e F2 para as populações estabelecidas implicou num aumento do escopo de indivíduos coletados aleatoriamente a partir de diluições em série de esporídios. Considerando-se os chicotes coletados, o conjunto de esporídios isolados submetidos a testes de reação sexual foi maior do que o que foi efetivamente empregado nas análises das marcas de tel-RFLP. Na maior parte dos casos, durante a etapa de fenotipagem sexual, a amostragem variou para serem isolados pelo menos 5 esporídios portadores do tipo de reação sexual 'A', frente um total de algumas dezenas de indivíduos do tipo de reação 'B' para a maior parte dos cruzamentos (tabela 2).

Tabela 2 – Proporção entre os tipos de reação sexual 'A' e 'B' observados entre esporídios de *S. scitamineum* obtidos pela germinação de teliósporos *in vitro*

Genealogia analisada	nº de teliosp.	nº esporídios (por teliósporo)	Proporção entre os tipos sexuais A e B
Parental 18 ^a (população b)	1	12	2A:10B
Parentais 39A e 39B (população a e b)	1	2	1A:1B
esporídios F1 pop a (F2 de 39)	3	8 (2, 2, 4)	1A:1B
esporídios F1 pop b F1 (18A x 39B)	8	66 (54, 12)	34A:16B 12 ao acaso
esporídios F1 pop b F1 (18A x 39B)	1	27	17A:10B
teliósporos F2 pop b	1	31	8A:23B
esporídios F2 pop b F2 (18A x 39B)	2	66 (31) 35	7A:24B 5A:30B
Esporídios F2 pop b F2 (18A x 39B)	3	126 (32) 62	6A:26B 7A:55B
Esporídios F1 GFP F1 (39A <i>gfp</i> x 39B <i>gfp</i>)	2	90 (57) 33	5A:52B 8A: 25B
Esporídios F2 pop a (F3 de 39)	1	32	8A:24B

Proporções enviesadas também foram observadas entre diferentes esporídios de tipos de reação sexual distintos oriundos da germinação de esporos do fungo *Microbotryum violaceum*, causador do carvão de antera na planta *Silene latifolia* (KALTZ; SHYKOFF, 1997). A hipótese mais plausível atribuída a esse desbalanço na proporção entre os tipos de reação sexual oriundos de uma mesma meiose foi a

haplo-letalidade, com relato de que tais esporídios não foram capazes de sobreviver por poucos ciclos consecutivos de divisões mitóticas (GIRAUD et al., 2008), mesmo que durante a meiose que o teliósporo sofre ao germinar tivessem sido produzidos esporídios de ambos os tipos sexuais em proporções iguais (KALTZ; SHYKOFF, 1997, 1999). Outra explicação para o desbalanço poderiam ser eventos anteriores de recombinação noutros *loci* associados fisicamente à reação sexual (*sweep* genômico) cuja perturbação pode ter reduzido o vigor de um dos tipos de reação sexual, sem, contudo, inviabilizá-los. Uma das explicações para justificar a elevada ocorrência de alelos que levam à letalidade dos esporídios haplóides em *M. violaceum* foi que a combinação entre esporídios em desbalanço poderia conferir alguma vantagem quando em dicariose, no entanto tal vantagem não parece atenuar a desvantagem que esse viés traz em termos de taxas de infecção (ANTONOVICS; O'KEEFE; HOOD, 1998).

4.5 Cruzamentos sexuais *in planta* utilizando esporídios e teliósporos

Conforme dito anteriormente, a produção de teliósporos em *S. scitamineum* somente corre mediante interação do fungo com a cana-de-açúcar, sendo o patógeno biotrófico (BANUETT, 1995). Consequentemente, os cruzamentos sexuais do fungo realizados neste trabalho precisaram ser feitos utilizando-se gemas sadias dessa cultura (figura 14).

Figura 14 - Resultado das inoculações utilizando teliósporos e esporídios haplóides sexualmente compatíveis. A, B e C. Plantas assintomáticas cv RB 92-5345 aos 20, 40 e 55 dai (testemunhas na primeira fileira), D, E, F. Chicotes F1 colhidos das populações a, b e c, respectivamente. Na fotografia E, além do chicote apical, observou-se a superbrotção, sintoma secundário que aparece em algumas plantas infectadas com o carvão mesmo durante o período de incubação. Fotos de autoria própria, 2012, 2013 e 2014

Discorreremos a seguir um pouco mais sobre os cruzamentos sexuais do fungo realizados neste trabalho. Primeiramente, quanto à população c, utilizaram-se como indivíduos parentais os indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp* decorrentes da inserção heteróloga do gene *gfp* em dois esporídios oriundos de um mesmo teliósporo 39 com perfis tel-RFLP bastante semelhantes (REIS, 2012). Além de representar um quadro de fecundação dentro de uma mesma tétrade (*selfing*), a escolha desses indivíduos apresentou outras duas motivações principais. Primeiramente buscou facilitar a visualização da segregação dos cromossomos homólogos e da ocorrência de eventos de recombinação mediante interpretação dos perfis de tel-RFLP das progênes, devido à menor quantidade inicial de variação para essas marcas apresentada pelos indivíduos parentais (apenas 4 marcas distintas entre si, sendo a presença de uma e ausência de outra associadas à inserção do gene *gfp*). A outra motivação foi o fato de ambos os indivíduos terem sido transformados com o gene *gfp* por membros do grupo *Genomics* na época de início das atividades desse trabalho, tendo sido investigado nesse trabalho o uso desse gene repórter aplicado a estudos de segregação meiótica e a manutenção no gene inserido ao longo de cruzamentos *in planta*. Em todas as populações a invasão dos tecidos meristemáticos foi atribuída à produção *in loco* das hifas dicarióticas entre as escamas das gemas. Como a população de esporídios que foram inoculadas em minitoletes, tanto na população b como na c, eram compostas exclusivamente por apenas um genótipo de cada tipo de reação sexual compatível, infere-se que todas as hifas dicarióticas que invadiram essas plantas tenham sido geneticamente idênticas, proporcionando a produção de teliósporos também idênticos após a cariogamia dos núcleos. Isso permitiu a comparação entre progênes diferentes produzidas por teliósporos de um mesmo ciclo da doença relatados no item 2.3. No entanto, a mesma inferência não pode ser feita a partir da inoculação com teliósporos da população a devido à singularidade de cada divisão meiótica associada à impossibilidade de detecção de quantas hifas dicarióticas potencialmente distintas em termos genéticos vieram a colonizar a planta e induzir a formação do chicote. A germinação de cada teliósporo inviabiliza sua caracterização genética como diplóide, e a quantidade de diferenças entre as marcas tel-RFLP de teliósporos distintos coletados de um mesmo chicote F1 da população a não foi suficiente para determinar se esses esporos vieram da colonização de hifas dicarióticas geneticamente distintas ou não.

Existem relatos na literatura de inoculação de coleóptilos de aveia com o conjunto de hifas dicarióticas de *Ustilago hordei* produzidas *in vitro* mediante a combinação par a par de quatro esporídios de dois tipos de reação sexual, isolados pela germinação de um teliósporo, pois nesse fungo o heterotalismo é bipolar (ABDENNADHER; MILLS, 2000). Nesse mesmo trabalho houve produção de teliósporos em casa de vegetação em gerações consecutivas da doença descendentes de uma linhagem específica que tiveram suas marcas tel-RFLP compradas com aquelas de teliósporos que se desejava determinar se seriam aparentadas à referida linhagem, conforme citado anteriormente (ABDENNADHER; MILLS, 2000). Singh, Somai e Pillay (2004) e Moosawi-Jorf e Izadi (2007) utilizaram apenas dois esporídios obtidos pela germinação de teliósporos isolados, bem como o micélio dicariótico obtido pela reação sexual *in vitro* desses esporídios para inocular plântulas de cana-de-açúcar obtidas por micropropagação. Contudo, não foi relatada a emissão de chicotes pelas plantas inoculadas (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004; MOOSAWI-JORF; IZADI, 2007), mas sim a detecção do fungo em diferentes partes das plântulas infectadas de 18h a 1 mês após as inoculações.

No que se refere ao sistema carvão-cana-de-açúcar, o uso de apenas dois esporídios de uma mesma meiose, ou de meiose distintas para obtenção de ciclos sucessivos da doença a partir desses cruzamentos controlados realizado neste trabalho ainda não havia sido descrito na literatura. A inoculação de minitoletes com esporídios geneticamente conhecidos de forma simples conforme aplicada neste trabalho poderia ser utilizada em estudos populacionais ou epidemiológicos do carvão no programa de melhoramento vegetal. Neste trabalho, o material vegetal inoculado consistiu de minitoletes de cana-de-açúcar, cuja produção e processamento são mais rápidos e apresentam menor custo em relação ao cultivo *in vitro* para obtenção de plântulas dessa cultura. Ressaltamos ainda que ambas as suspensões de teliósporos e de leveduras sexualmente compatíveis utilizadas nas inoculações foram realizadas utilizando-se solução salina ($\text{NaCl } 0,85 \text{ Mol L}^{-1}$) em substituição à água destilada estéril. A adição de pequena quantidade de soluto mostrou-se capaz de aumentar o período viável dos tipos celulares do fungo em suspensões salinas armazenadas por até 45 dias a 4°C mediante testes de germinação e viabilidade *in vitro* (dados não mostrados). Um maior favorecimento à estabilidade osmótica da suspensão em que teliósporos ou esporídios foram imersos possivelmente contribuiu para o sucesso das inoculações, pois buscou compensar

em parte o empobrecimento de solutos e exsudatos presentes na superfície das gemas e minitoletes decorrente da lavagem intensiva que esse material sofreu durante a etapa de desinfecção.

Como as hifas dicarióticas infectivas de *S. scitamineum* não conseguem penetrar naturalmente as células das escamas (folhas) que envolvem as gemas, necessitam crescer por entre elas até atingir os tecidos meristemáticos (SINGH; BUDHRAJA, 1964). Dentre as adaptações anatômicas apresentadas por cultivares de cana-de-açúcar que apresentam resistência à infecção do carvão, destacam-se: maior justaposição das escamas sobre as gemas, maior deposição de lignina na parede celular das células das escamas e maior número de tricomas (GLORIA; ALBERNAS; AMORIM, 1995; PIÑÓN et al., 1999; FONTANIELLA et al., 2002). Gemas localizadas nos internódios inferiores de um colmo, morfologicamente mais desenvolvidas, naturalmente conferem maior proteção à planta em relação àquelas localizadas nos internódios superiores (LLOYD; PILLAY, 1980). A injeção de teliósporos sob as escamas que envolvem as gemas e a retirada das folhas mais externas das gemas antes da inoculação contribuiu para o aumento da taxa de infecção, denotando a importância físico-química dessas folhas frente à entrada de *S. scitamineum* (LLOYD; PILLAY, 1980; DEAN, 1982). O uso de agulha para injeção da suspensão de teliósporos durante as infecções realizadas nesse trabalho buscou favorecer a infecção ao permitir que o fungo redirecione a energia que possivelmente seria dispendida para crescer por entre as escamas até atingir o tecido meristemático para processos como a diferenciação dos apressórios. A metodologia de inoculação empregada constituiu numa modificação da descrita por Bueno (2010) que depositou uma gota de 40µL de suspensão de teliósporos sobre as gemas dos minitoletes seguida de ferimento feito com agulha no centro da gema. No entanto, neste trabalho foram feitas duas perfurações laterais em cada gema inoculada em substituição à perfuração única central, sendo a suspensão de teliósporos acondicionada dentro dos furos com ajuda da agulha para minimizar danos no pólo germinativo da gema.

Trabalhos como o de Andreis (1981) relataram a germinação de teliósporos de *S. scitamineum* ocorrendo em 48h em solo úmido, associada à infecção da cana-de-açúcar através de solo contaminado. Sugere-se que os responsáveis pela infecção num período mais longo do que a viabilidade dos teliósporos sobre o solo úmido sejam esporídios leveduriformes saprofíticos. Posto isso, e considerando-se

que a formação da hifa dicariótica infectiva advém da germinação prévia dos teliosporos, ocorrência da meiose e liberação dos esporídios, também motivou o uso de esporídios nas infecções dos minitoletes realizadas neste trabalho. Sugere-se a aplicação de esporídios diretamente sobre o solo de soqueiras em vasos como única fonte de inoculação para corroborar a hipótese de que esses esporídios persistiriam no solo em médio prazo nutrindo-se saprofiticamente até que condições favoráveis à ocorrência da doença se restabelecessem, como durante a rebrota das soqueiras. Nesse caso, pode haver coincidência entre a alternância entre os tipos celulares dicariótico e monocariótico haploide (esporídio) e as oscilações de temperatura e umidade relativa do ar ao longo das estações e a sobrevivência dos esporídios no solo ou na superfície da palhada ou de outras espécies.

4.5 Detecção das marcas *gfp* na progênie F1 GFP e sua recombinação nos próbasídios F1 GFP

Dentre as técnicas descritas de detecção e acompanhamento da colonização de fungos fitopatogênicos em tecidos vegetais destacam-se o do gene repórter (*gfp*) que codifica a proteína verde fluorescente (GFP). A GFP é uma pequena proteína de 238 aminoácidos, 27-kDa que absorve luz em picos de 395 e 475 nm e emite luz num pico de 508 nm responsável pela bioluminescência em cnidários (SPELLIG et al., 1996; LORANG et al., 2001). A preferência pela utilização de GFP no estudo das relações fungo-planta está associada à alta estabilidade desta proteína *in vivo*, a qual necessita apenas de UV ou luz azul e oxigênio para emissão de fluorescência, não sendo necessários cofatores ou substratos para a sua atividade. Além disso, a GFP já sofreu ligações com diversos C e N terminais de proteínas celulares e extracelulares sem perda de função, permitindo a marcação de proteínas para ensaios de expressão e de rastreamento funcional (LORANG et al., 2001).

O gene repórter *gfp* também foi empregado em outros estudos (BAE; KNUDSEN, 2000; LÜBECK et al., 2002; SARROCCO et al., 2006; ZHANG et al., 2008; PANTELIDES et al., 2009). De maneira geral, a expressão da GFP auxilia não apenas no monitoramento da dinâmica de populações, mas também na avaliação da persistência desses organismos no ambiente, e nas interações entre micoparasitas, fitopatógenos e plantas (LU et al., 2004; NEVEU et al., 2007). O alto nível de expressão associado à fluorescência clara obtidos com o fungo *Ustilago maydis*

utilizando uma versão sintética da GFP chamada *sGFP(Ser65T)* (HEIM et al., 1995), na qual a Ser65 foi substituída por uma treonina (CHIU et al., 1996; SPELLIG et al., 1996) mostrou que a GFP melhorada poderia ser utilizada com sucesso para o estudo da interação entre plantas e fungos basidiomicetos causadores de carvão (SPELLIG et al., 1996) grupo ao qual pertence o fungo *S. scitamineum*.

A análise dos resultados mostrados nos itens anteriores evidenciou o sucesso de cruzamentos controlados empregando cruzamentos controlados de dois esporídios de tipos de reação sexual compatível e distinto. Conforme citado anteriormente, a população (c) se originou da inoculação com esporídios haplóides 39A*gfp* e 39B*gfp*, sabidamente capazes de expressar a proteína GFP em culturas puras (figura 15).

Figura 15 - Expressão das marcas *gfp* dos indivíduos 39A*gfp* e 39B*gfp* utilizados como parentais nos cruzamentos controlados que originaram a população c. Imagens de microscopia de luz (A, D, G, J), microscopia de epifluorescência (B, E, H, K) e sobreposição de ambas (C, F, I, L) referentes, respectivamente aos esporídios 39A selvagem (controle negativo), 39B selvagem (controle negativo), 39A*gfp* e 39B*gfp*. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 2014

O micélio dicariótico produzido pela reação sexual entre os referidos esporídios mutantes GFP também apresentou fluorescência *in vitro* (comunicação pessoal Dr^a Giselle de Carvalho). Neste trabalho, as progênies obtidas na população (c) através de cruzamentos controlados, além de atestarem a capacidade infectiva do micélio produzido por parentais mutantes GFP também tiveram suas marcas *gfp* estudadas. Todos os indivíduos da progênie F1 analisados cresceram em meio YM de forma semelhante, não tendo havido correlação entre a inserção do gene *gfp* e a haplo-letalidade desses esporídios. A observação de pró-basídios mutantes GFP decorrentes da germinação *in vitro* de teliósporos GFP F1 em microscopia de epifluorescência permitiu o estudo genético das tétrades lineares com 4 células associado às marcas *gfp* (figura 16).

Figura 16 - Expressão das marcas *gfp* dos pró-basídios GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) da população c. Imagens de microscopia de luz (A, F, K), e de epifluorescência (B, G, L) e sobreposição de ambas (C, H, M). Esquemas dos fenótipos observados (D, I, N) e inferências sobre os genótipos observados (E, J, O) respectivamente referentes a um pró-basídio selvagens F1 (18Ax39B) da população b (controle negativo), a um pró-basídio GFP F1 (39A*gfp* x 39B*gfp*) e um pró-basídio GFP F1 recombinante *gfp* evidenciando uma tétrade linear de 4 células. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 2014

A tétrade linear mostrada na figura 16-M constitui possivelmente um evento de recombinação homóloga entre as marcas *gfp* de cromátides-irmãs durante a meiose I (*crossing over*). Essa inferência advém do fato de haver maior probabilidade de que cada evento de inserção do gene *gfp* no genoma de cada

esporídio 39A*gfp* e 39B*gfp* tenha acontecido em cromossomos distintos, passíveis de sofrer segregação juntamente com seus homólogos na meiose I. A espessura considerável das paredes dos teliósporos impediu que o conteúdo da célula decorrente da meiose II que está ativa dentro dessa estrutura não pudesse ser observado na microscopia de fluorescência para detecção de segregantes portadores do gene *gfp*. Isso fez com que para certos fenótipos observados, como o fenótipo I (figura 16), estivessem associadas até dois genótipos possíveis. Mesmo que o genótipo do teliósporo mostrado em H fosse recombinante (segundo pró-basídio da figura 16-J), as paredes no teliósporo impediriam a observação do fenótipo completo das 4 células. Todavia, o fenótipo detectado em M, esquematizado em N, se constituiria como um recombinante simples (letra O), sendo a ocorrência de dois eventos de recombinação das marcas *gfp* em uma mesma meiose com altamente improvável. Em ambos os cenários de recombinação ocorrendo dentro da célula que foi envolvida pela parede do teliósporo, o fenótipo M seria advindo de recombinação homóloga.

Ressaltamos que a observação da tétrade mostrada figura 16-M somente foi possível pela presença das marcas *gfp*. A referida tétrade constitui a primeira evidência fenotípica (imagem) descrita na literatura de tétrade linear de 4 células em *S. scitamineum*. A produção de tétrade apresentando a referida configuração havia sido inferida devido à sua semelhança genética com o fungo *Ustilago maydis*, para o qual diversos estudos meióticos foram realizados (RAMBERG; McLAUGHLIN, 1980; O'DONNELL; McLAUGHLIN, 1984). Ressaltamos que o comportamento observado na tétrade ordenada da figura 16-M corrobora a descrição dos eventos citológicos equivalentes às fases da meiose em *U. maydis*, segundo as quais dentre as quatro células formadas no pró-basídio, devido à segregação das células ser linear, as duas primeiras (uma que se encontra dentro da parede do teliósporo e aquela delimitada entre esta e o primeiro septo) são provenientes do núcleo que permaneceu dentro da estrutura do antigo teliósporo, e a terceira e quarta células são originadas do núcleo produzido durante a meiose I que se lançou para fora da parede do teliósporo (RAMBERG; McLAUGHLIN, 1980; O'DONNELL; McLAUGHLIN, 1984). O esquema apresentado na figura 17 auxilia na visualização das observações descritas, podendo ser aplicado à segregação dos *loci* MAT1 e MAT2.

Figura 17 – Estrutura genética dos núcleos das células produzidas pelo pró-basídio ao final da meiose II. Esporídios foram posicionados próximos aos pontos de brotação. As células com núcleo azul são produtos da meiose II da célula que ficou dentro da parede do teliósporo na meiose I. As células com núcleo vermelho representam as outras duas células produzidas pela célula que migrou durante a meiose I

Por fim, destacamos que as progênes de esporídios produzidas a partir de pró-basídios F1 GFP também foram observadas por meio da microscopia de epifluorescência (figura 17). A observação conjunta dos resultados mostrados nas figuras 16 e 18 revelaram que a expressão do gene *gfp* persistiu ao longo de um ciclo consecutivo da doença.

Figura 18 - Expressão das marcas *gfp* de esporídios da progênie GFP F1 (39Agfp x 39Bgfp). Imagens de microscopia de luz (A, D, G, J), microscopia de epifluorescência (B, E, H, K) e sobreposição de ambas (C, F, I, L) referentes, respectivamente aos esporídios 27Agfp, 39Agfp, 25Bgfp e 28Bgfp. Microscópio utilizado Leica DFC 365 FX. Colaboração Dr^a. Giselle de Carvalho, 2014

5 CONCLUSÕES

O cruzamento entre indivíduos de populações diferentes e geneticamente distintos foi possível, tendo resultado em progênies recombinantes quanto às marcas tel-RFLP. Essa recombinação englobou eventos de segregação de cromossomos homólogos na meiose I e eventos de recombinação homóloga que ocorreram entre esporídios de mesmo tipo de reação sexual e de tipo de reação sexual distinto. Esses eventos de recombinação foram detectados também entre progênies de esporídios obtidas a partir de cruzamentos controlados e cruzamentos naturais.

Em ciclos sucessivos de cruzamentos foram detectados variantes genéticos para as marcas tel-RFLP e para as marcas GFP.

A fenotipagem sexual auxiliou na avaliação da herança dos tel-RFLP devido ao desvio na proporção esperada de 1:1 entre os diferentes tipos de reação sexual. A variação nas marcas tel-RFLP observada entre os indivíduos 39A e 39A*gfp* permitiu detectar a inserção do gene *gfp* na região subtelomérica do indivíduo 39A*gfp*.

Os resultados da microscopia de epifluorescência mostraram que a expressão do gene *gfp* foi mantida em um ciclo consecutivo da doença. Além disso, a observação de tétrades ordenadas produzidas por pró-basídios GFP F1 permitiu detectar um evento de recombinação homóloga das marcas GFP e constituiu per se uma evidência fenotípica inédita da produção de tétrades ordenadas por *S. scitamineum*. Esses resultados corroboram o dinamismo das regiões subteloméricas mesmo em poucos ciclos de ocorrência da meiose, e atestam um dos usos potenciais desse gene repórter no entendimento genético da biologia do fungo.

Os eventos de recombinação da região subtelomérica observados poderiam implicar em conjunto de alterações parte das quais benéficas à virulência do patógeno. A realização de testes de patogenicidade com esses indivíduos auxiliaria na elucidação dessa hipótese, sendo alvo de estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABAD, J.P.; DE PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; DE JONG, P.J.; MARTIN-GALLARDO, VILLASANTE, A. Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 1613–1619, 2004.
- ABDENNADHER, M.; MILLS, D. Telomere-associated RFLPs and electrophoretic karyotyping reveal lineage relationships among race specific strains of *Ustilago hordei*. **Current Genetics**, New York, v. 38, p. 141–147, 2000.
- AGNITORI, V.P. **Diseases of sugarcane and sugarbeet**. Oxford: Oxford and IBH Publ., 1990. v. 1, 483 p.
- AIMI, T.; KANO, S.; YOTSUTANI, Y.; MORINAGA, T. Telomeric *fingerprinting* of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p. 95–101, 2002.
- ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the bE mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 1189–1192, 1996.
- ALEXANDER, K.C.; RAMAKRISHNAN, K. Infection of the bud, establishment in the host and production of whips in sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) of sugarcane. **Proceedings International Society Sugarcane Technology**, Quatre-bornes, v. 17, p. 1452–1455, 1980.
- ANDREIS, H.J. Viability of sugarcane smut spores in a Florida organic soil at three moisture levels. In: AMERICAN SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGISTS 1979 MEETINGS, 9., 1981, Belle Garde. **Proceedings...** Belle Grade: American Society Sugar Cane Technologists, 1981. p. 44–46.
- ANTONOVICS, J.K.; O'KEEFE; HOOD, M.E. Theoretical population genetics of mating-type linked haplo-lethal alleles. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 159, p. 192–198, 1998.
- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; ALBERNAS, M.C.C.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Morphological characteristics of sugarcane clones, susceptible and resistant to smut (*Ustilago scitaminea*). In: RAO, G.P.; BERGAMIN FILHO, A.; MAGAREY, R.C.; AUTREY, L.J.C. (Org.). **Sugarcane pathology**. New Hampshire; Enfield: Science Publ., 1999. v. 1, p. 167–182.
- BAE, Y.S.; KNUDSEN, G.R. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β -glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 810–815, 2000.
- BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Conservation of the b mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 1, p. 123–136, 1993.

_____. Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 15, p. 7085-7089, 1994.

_____. The pheromone cell signalling components of the *Ustilago a* mating type loci determine intercompatibility between species. **Genetics**, Austin, v. 143, p. 1601–13, 1996.

BAKKEREN, G.; KÄMPER, J.; SCHIRAWSKI, J. Sex in smut fungi: structure, function and evolution of mating-type complexes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, suppl. 1, p. S15-S21, 2008.

BAKKEREN, G.G.; JIANG, R.L.; WARREN, Y.; BUTTERFIELD, H.; SHIN, R.; CHIU, R.; LINNING, J.; SCHEIN, N.L.; HU, G. Mating factor linkage and genome evolution in basidiomycetous pathogens of cereals. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, p. 655–666, 2006.

BANUETT, F. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumours in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 29, p. 179-208, 1995.

BANUETT, F.; HERSKOWITZ, I. Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. **Experimental Mycology**, Orlando, v. 18, p. 247-266, 1994.

_____. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 2965-2976, 1996.

BAUCH, R. Ueber *Ustilago longissima* und ihre Varietät macrospora. **Zeitschrift für Botanik**, Berlin, v. 15, p. 241-279 1923.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; CARDOSO, C.O.N.; SANGUINO, A.; IRVINE, J.E.; SILVA, W.M. **Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia**. Piracicaba: Centro de Tecnologia COPERSUCAR, 1987. 23 p. (Boletim Técnico, Edição Especial).

BITTENCOURT, E. Prevenção reduz perdas. **Canal: o Jornal da Bioenergia**, Goiânia, ano 2, n. 19, p. 12-15, 2008.

BLACKBURN, E.H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, Cambridge, v. 106, p. 661–673, 2001.

_____. Telomere states and cell fates. **Nature**, London, v. 408, p. 53–56, 2000

BÖLKER, M. *Ustilago maydis*: a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, New York, v. 147, p. 1395-1401, 2001.

BÖLKER, M.; URBAN, M.; KAHMANN, R. The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. **Cell**, Cambridge, US, v. 68, p. 441–50, 1992.

BRASIL. Leis, decretos, etc. **Lei Estadual no 11.241, de 19 de setembro de 2002**. Disponível em: <http://www.sigam.ambiente.sp.gov.br/sigam2/Repositorio/24/Documentos/Lei%20Estadual_11241_2002.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2014.

CASAGRANDE, M.V. **Avaliação da incidência da doença e estimativa de danos ocasionados pelo carvão (*Ustilago scitaminea* Sydow) em variedades de cana-de-açúcar**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

CASTILLO-LLUVA, S.; PÉREZ-MARTÍN, J. The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3544–3560, 2005.

CHAN, S.R.; BLACKBURN, E.H. Telomeres and telomerase. **Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B Biological sciences**, London, v. 359, p. 109–121, 2004.

CHONA, B.L. Sugarcane smut and its control. **Indian Farming**, New Delhi, v. 4, p. 401–404, 1943.

CHIU, W.-I.; NIWA, Y.; ZENG, W.; HIRANO, T.; KOBAYASHI, H.; SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current Biology**, London, v. 6, p. 325–330, 1996.

CHRISTENSEN, J.J. **Corn smut caused by *Ustilago maydis***. Worcester: The American Phytopathological Society, 1963. 50 p. (Monography, 2).

COELHO, M.A.; SAMPAIO, J.P.; GONÇALVES, P. A deviation from the bipolar-tetrapolar mating paradigm in an early diverged basidiomycete. **Public Library of Science Genetics**, San Francisco, v. 6, e1001052, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001052>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

_____. Living and thriving on the skin: *Malassezia* Genomes tell the story. **Mbio**, Washington, v. 4, n. 2, p. 1–4, ano. Disponível em: <<http://mbio.asm.org/content/4/2/e00117-13.full>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

COMSTOCK, J.C.; HEINZ, D.J. A new race of culmicolous smut of sugarcane in Hawaii. **Sugarcane Pathologists' Newsletter**, Aiea, v. 19, p. 24–25, 1977.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane smut disease**, Gainesville: University of Florida, IFAS Extension, 2005. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/SC/SC00800.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2012.

COMSTOCK, J.C.; FERREIRA, S.A.; TEW, T.L. Hawaii's approach to control of sugarcane smut. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 452–457, 1983.

COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Avaliação de diferentes métodos de inoculação do carvão da cana-de-açúcar (*Ustilago scitaminea* Sydow)**. Piracicaba: Centro de Tecnologia COPERSUCAR, 1995. 19 p. (Relatório Anual 1994/95).

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodelling in three modern *Saccharum officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 847–854, 2004.

DE SOUZA, A.P.; GASPAR, M.; DA SILVA, E.A.; ULIAN, E.C.; WACLAWOVSKY, A.J.; NISHIYAMA JR., M.Y.; DOS SANTOS, R.V.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, G.M.; BUCKERIDGE, M.S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 31, p. 1116–1127, 2008.

DEAN, J.L. The effect of wounding and high pressure spray inoculation on the smut reactions of sugarcane clones. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 1023-1025, 1982.

DENAYROLLES, M.; DE VILLECHENON, E.P.; LONVAUD-FUNEL, A.; AIGLE, M. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces*. **Current Genetics**, New York, v. 31, p. 457–461, 1997.

DONALDSON, M.E.; SAVILLE, B.J. Bioinformatic identification of *Ustilago maydis* meiosis genes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, suppl. 1, S47-S53, 2008.

DORER, D.R.; HENIKOFF, S. Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans. **Genetics**, Austin, v. 147, p. 1181–1190, 1997.

DUARTE, M.C.; SANTOS, J.B.; MELO, L.C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 427-432, 1999.

FAO. **FAOSTAT, 2012**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 24 jun. 2014.

FARNAN, M.L.; KIM, Y.-S. Telomere hypervariability in *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, Hoboken, v. 6, p. 287-298, 2005.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAU, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 211-229.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; ANDRADE LANDELL, M.G. de. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p. 31-41.

FIGUEIREDO, L.M.; SCHERF, A. *Plasmodium* telomeres and telomerase: the usual actors in an unusual scenario. **Chromosome Research**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 517-524, 2005.

FISCHER, G.W.; HOLTON, C.S. **Biology and control of the smut fungi**. New York: Ronald Press, 1957. 622 p.

FONTANIELLA, B.; MÁRQUEZ, A.; RODRÍGUEZ, C.W.; PIÑÓN, D.; SOLAS, M.T.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 881-889, 2002.

FRASER, J.A.; HEITMAN, J. Evolution of fungal sex chromosomes. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 51, p. 299–306, 2004.

_____. Chromosomal sex-determining regions in animals, plants and fungi. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 15, p. 645–651, 2005.

FRASER, J.A.; DIEZMANN, S.; SUBARAN, R.L.; ALLEN, A.; LENGELER, K.B.; DIETRICH, F.S.; HEITMAN, J. Convergent evolution of chromosomal sex-determining regions in the animal and fungal kingdoms. **Public Library of Science (PLoS) Biology**, San Francisco, v. 2, p. 2243–2255, 2004.

FROELIGER, E.; LEONG, S.A. The a mating-type alleles of *Ustilago maydis* are idiomorphs. **Gene**, Amsterdam, v. 100, p. 113–22, 1991.

GARCÍA-MUSE, T.; STEINBERG, G.; PÉREZ-MARTÍN, J. Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 2, p. 494-500, 2003.

GILLISSEN, B.; BERGEMANN, J.; SANDMANN, C.; SCHROEER, B.; BÖLKER, M.; KAHMANN, R. A two-component regulatory system for self/nonself recognition in *Ustilago maydis*. **Cell**, Cambridge, v. 68, p. 647–657, 1992.

GIRAUD, T.; YOCKTENG, R.; LOPEZ-VILLAVICENCIO, M.; REFREGIER, G.; HOOD, M.E. The mating system of the anther smut fungus, *Microbotryum violaceum*: selfing under heterothallism. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, p. 765–775, 2008.

GLORIA, B.A.; ALBERNAS, M.C.; AMORIM, L. Structural characteristics of buds of sugarcane cultivars with different levels for resistance in smut. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 102, n. 5, p. 502-508, 1995.

GLORIA, B.A.; CAPOTE-ALBERNAS, M.C.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Morphological characteristics of sugarcane clones, susceptible and resistant to smut (*Ustilago scitaminea*). In: RAO, G.P.; BERGAMIN FILHO, A.; MAGAREY, R.C.; AUTREY, L.J.C. (Ed.). **Sugarcane pathology: fungal diseases**. Enfield: Science Publ., 1999. p. 167-182.

GOLDENBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, Washington v. 315, p. 808–881, 2007.

GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. **Cell**, Cambridge, v. 43, p. 405–413, 1985.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication.

Ethnobotany Research & Applications, Forth Worth, v. 2, p. 9–17, 2004.

Disponível em:

<<http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/handle/10125/134/11547-3465-02-009.pdf?sequence=4>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

HAMMER, Ø; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, Columbia, v. 4, p. 1-9, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 22 fev. 2014.

HARTMANN, H.A.; KAHMANN, R.; BÖLKER, M. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenic development in *Ustilago maydis*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 15, p. 1632-1641, 1996.

HEIM, R.; CUBITT, A.B.; TSIEN, R.Y. Improved green fluorescence. **Nature**, London, v. 373, p. 663-664, 1995.

HIJRI, M.; NICULITA, H.; SANDERS, I.R. Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* (Glomeromycota). **Fungal Genetic Biology**, Orlando, v. 44, p. 1380-1386. 2007.

HOOD, M.E.; ANTONOVICS, J.; KOSKELLA, B. Shared forces of sex chromosome evolution in haploids and diploids. **Genetics**, Austin, v. 168, p. 141–146, 2004.

HOLLIDAY, R. The genetics of *Ustilago maydis*. **Genetical Research**, London, v. 2, p. 204-230, 1961a.

_____. Induced meiotic crossing-over in *Ustilago maydis*. **Genetical Research**, London, v. 2, p. 231-248, 1961b.

HORN, D.; BARRY, J.D. The central roles of telomeres and subtelomeres in antigenic variation in African trypanosomes. **Chromosome Research**, Oxford, v. 13, p. 525–533, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola**. Janeiro de 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301.comentarios.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2014.

IRVINE, J.E. *Saccharum* species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 98, p. 186-195, 1999.

IZADI, M.B.; MOOSAWI-JORF, S.A. Isolation and identification of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* using specific primers. **Asian Journal of Plant Sciences**, Islamabad, v. 6, n. 7, p. 1137-1142, 2007.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Voudoise des Sciences Naturelles**, Lausanne, v. 37, p. 547-579, 1901.

KALTZ, O.; SHYKOFF, J.A. Sporidial mating-type ratios of teliospores from natural populations of the anther smut fungus *Microbotryum* (= *Ustilago*) *violaceum*. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 158, p. 575–584, 1997.

_____. Selfing propensity of the fungal pathogen *Microbotryum violaceum* varies across *Silene latifolia* host plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 12, p. 340–349, 1999.

KEELY, S.P.; RENAULD, H.; WAKEFIELD, A.E.; CUSHION, M.T.; SMULIAN, A.G.; FOSKER, N.; FRASER, A.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; PRICE, C.; QUAIL, M.A.; SEEGER, K.; SHARP, S.; TINDAL, C.J.; WARREN, T.; ZUIDERWIJK, E.; BARRELL, B.G.; STRINGER, J.R.; HALL, N. Gene arrays at *Pneumocystis carinii* telomeres. **Genetics**, Austin, v. 170, p. 1589–1600, June 2005.

KMIT, M.C.P. **Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em *Sporisorium scitamineum*, agente causador do carvão de cana-de-açúcar**. 2014. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

KRONSTAD, J.W.; LEONG, S.A. The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 4, n. 8, p. 1384-1395, 1990.

KRONSTAD, J.W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 245–276, 1997.

LEGAZ, M.E.; DE ARMAS, R.; PIÑON, D.; VICENTE, C. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1723-1728, 1998.

LEGAZ, M.E.; DE ARMAS, R.; MILLANES, A.M.; RODRÍGUEZ, C.W.; VICENTE, C. Heterofructans and heterofructan-containing glycoproteins from sugarcane: structure and function. **Research and Development Biochemistry**, San Jose, v. 6, p. 31-51, 2005.

LLOYD, H.L.; PILLAY, M. The development of an improved method for evaluating sugarcane for resistance to smut. **Proceedings of South Africa Sugar Technology Association**, Durban, v. 54, p. 168-172, 1980.

LORANG, J.M.; TUORI, R.P.; MARTINEZ, J.P.; SAWYER, T.L.; REDMAN, R.S.; ROLLINS, J.A.; WOLPERT, T.J.; JOHNSON, K.B.; RODRIGUEZ, R.J.; DICKMAN, M.B.; CIUFFETTI, L.M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1987-1994, 2001.

LU, Z.X.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J.K. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3073-3081, 2004.

LÜBECK, M.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, B.; THRANE, U.; JANVIER, C.; JENSEN, D.F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 815-826, 2002.

MARTINEZ, M.; MEDINA, I.; NARANJO, S.; RODRIGUEZ, C.W., de ARMAS, R., PIÑÓN, D., VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 102, p. 445-448, 2000.

MATA, J.F.R.; TOKESHI, H. Comparação em três métodos de preservação de *Ustilago scitaminea*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 2, p. 187-193, 1975.

McCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following breakage at meiotic anaphase. **Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin**, Columbia, v. 290, p. 1-48, July 1938.

_____. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. **Genetics**, Austin, v. 26, p. 234-282, 1941.

_____. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 28, p. 458-463, 1942.

MICHELMORE, R.W.; HULBERT, H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MILLANES, A.M.; FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M.L.; VICENTE, C. Glycoproteins from sugarcane plants regulate cell polarity of *Sporisorium scitaminea* teliospores. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 253-265, 2005.

MING, R.; MOORE, P.H.; WU, K.-K.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; TEW, T.L.; MIRKOV, T.E.; DA SILVA, J.; JIFON, J.; RAI, M.; SCHNELL, R.J.; BRUMBLY, S.M.; LAKSHMANAN, P.; COMSTOCK, J.C.; PATERSON, A.H. Sugarcane Improvement through breeding and biotechnology. **Plant Breeding Reviews**, Oxford, v. 27, p. 15-118, 2010.

MOORE, P.H. Anatomy and morphology of sugarcane. In: HEINZ, D. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 85–142.

MOOSAWI-JORF, S.A.; IZADI, M.B. *In vitro* detection of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* in tissue-cultured plantlets of sugarcane using Polymerase Chain Reaction (PCR). **Journal of Applied Sciences**, Islamabad, v. 7 n. 23, p. 3768-3773, 2007.

MULLER, H.J. The remaking of chromosomes. **Collecting Net**, Woods Hole, v. 13, p. 182–198, 1938.

MULLER, H.J.; HERSKOWITZ, I.H. Concerning the healing of chromosome ends produced by breakage in *Drosophila melanogaster*. **The American Naturalist**, Chicago, v. 88, p. 177–208, 1954.

NEVEU, B.; LABBÉ, C.; BÉLANGER, R.R. GFP technology for the study of biocontrol agents in tritrophic interactions: a case study with *Pseudozyma flocculosa*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, p. 275-281, 2007.

O'DONNELL, K.L.; MCLAUGHLIN, D.J. Ultrastructure of meiosis in *Ustilago maydis*. **Mycologia**, New York, v. 76, n. 3, p. 468-485, 1984.

PADMAVATHI, J.; UMA DEVI, K.; UMA MAHESWARA RAO, C. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: a potential biopesticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 4, p. 469–477, 2003.

PANTELIDES, I.S.; TJAMOS, S.E.; STRIGLIS, I.A.; CHATZIPAVLIDIS, I.; PAPLOMATAS, E.J. Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 30-36, 2009.

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago scitaminea* and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, München, v. 1, n. 1, p. 71-80, 2002.

PIÑÓN, D.; ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Role of polyamines in the infection of sugarcane buds by *Ustilago scitaminea* spores. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 37, p. 57-64, 1999.

RABOIN, L.M.; SELVI, A.; OLIVEIRA, K.M.; PAULET, F.; CALATAYUD, C.; ZAPATER, M.F.; BROTTIER, P.; LUZARAN, R.; GARSMEUS, O.; CARLIER, J.; D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 64-76, 2007.

RACHIDI, N.; MARTINEZ, M.J.; BARRE, P.; BLONDIN, B. *Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 35, n. 6, p. 1421-1430, 2000.

RAGO, A.M.; CASAGRANDE, M.V.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 2, p. 93-97, 2009.

RAMBERG, J.E.; MCLAUGHLIN, D.J. Ultrastructural study of promycelial development and basidiospore initiation in *Ustilago maydis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 58, n. 14, p. 1548-1561, 1980.

REIS, G.V. **Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de *fingerprinting* da região telomérica**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

REHMEYER, C.; LI, W.; KUSABA, M.; KIM, Y.-S.; BROWN, D.; STABEN, C.; DEAN, R.; FARMAN, M. Organization of chromosome ends in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, p. 4685-4701, 2006.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA-JR, M.Y.; VÊNCIO, R.Z.N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.C; DE ROSA JR, V.E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M.; GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.O.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BioMed Central Genomics**, London, v. 8, p. 71, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SÁNCHEZ-ALONSO, P.; GUZMÁN, P. Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis* RecQ-like helicase motifs at telomeric ends. **Genetics**, Austin, v. 148, p. 1043-1054, 1998.

SÁNCHEZ-ALONSO, P.; VALVERDE, M.E.; PAREDES-LÓPEZ, O.; GUZMÁN, P. Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. **Microbiology**, New York, v. 142, n. 10, p. 2931-2936, 1996.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 24, p. 90-91, 1998.

SANTIAGO, R.; DE ARMAS, R.; LEGAZ, M.-E.; VICENTE, C. Separation from *Ustilago scitaminea* of different elicitors which modify the pattern of phenolic accumulation in sugarcane leaves. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 90, n. 1, p. 87-96, 2008.

SANTIAGO, R.; DE ARMAS, R.; BLANCH, M.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. "In vitro" effects of caffeic acid upon growth of the fungi *Sporisorium scitamineum*. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 5, p. 233-240, 2010.

SANTIAGO, R.; ALARCÓN, B.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Changes in cinnamyl alcohol dehydrogenase activities from sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 145, n. 2, p. 245–259, 2012.

SINGH, K.; BUDHRAJA, T.R. The role of bud scales as barriers against smut infection. In: BIENNIAL CONFERENCE OF SUGARCANE RESEARCH AND DEVELOPMENT, 5., 1964. **Proceedings...** Jullundur, v. 5, p. 687-690, 1964.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PILLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Science**, Limerick, v.167, p. 987-994, 2004.

_____. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. **Federation of European Microbiological Societies ems Microbiology Letters**, Oxford, v. 247, p. 7-15, June 2005.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numeric taxonomy**: the principles of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

SNETSELAAR, K.M.; MIMS, C.W. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. **Mycologia**, New York, v. 84, p. 193-203, 1992.

SPELLIG, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 252, p. 503–509, 1996.

SPELLIG, T.; BÖLKER, M.; LOTTSPEICH, F.; FRANK, R.W.; KAHMANN, R. Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 13, p. 1620–1627, 1994.

STOLL, M.; PIEPENBRING, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, p. 976–984, 2003.

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisorium scitamineum*. In: MWORIA, J.K. **Botany**. 2002. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/botany/-a-mini-review-on-the-status-of-smut-disease-of-sugarcane-caused-by-sporisorium-scitamineum->>. Acesso em: 29 ago. 2012.

THAM, W.-H.; ZAKIAN, V.A. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, p. 512-521, 2002.

TOKESHI, H. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 207-225.

TRIONE, E.J. Growth and sporulation of *Ustilago scitaminea*, *in vivo* and *in vitro*.

Mycological Research, Cambridge, v. 94, n. 4, p. 489–493, 1990.

_____. Teliospore formation by *Ustilago scitaminea* in sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 513-516, 1980.

URBAN, M.; KAHMANN, R.; BÖLKER, M. The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 250, p. 414–420, 1996.

VERSTREPEN, K.J.; JANSEN, A.; LEWITTER, F.; FINK, G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nature Genetics**, New York, v. 37, p. 986–990, 2005.

VETTORE, A. L.; SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI JÚNIOR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAÚJO, P.G.; SCULACCIO, S.S.; ANGELLA, A.; LIMA M.M.; DE ROSA JÚNIOR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.

VIEIRA, M.L.C.; NATAL, A.; SILVA FILHO, M.C. Genética e melhoramento vegetal. In: MIR, L. (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 33, p. 679-699.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Sporisorium scitaminea*) in Kenya. II. Infection and resistance. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 54, p. 405–414, 1970.

WACLAWOVSKY, A.J.; SATO, P.M.; LEMBKE, C.G.; MOORE, P.H.; SOUZA, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, p. 263-276, 2010.

WU, K.K.; HEINZ, D.J.; HOGARTH, D.M. Association and heritability of sugarcane smut resistance to races A and B in Hawaii. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 754-760, 1988.

ZAKHAROV, I.A. Intratetrad mating and its genetic and evolutionary consequences. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 41, p. 508–519, 2005.

ZHANG, P.; XU, B.; WANG, Y.; LI, Y.; QIAN, Z.; TANG, S.; HUAN, S.; REN, S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffe*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 943-949, 2008.