Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em Sporisorium scitamineum, agente causador do carvão da cana-deaçúcar

Maria Carolina Pezzo Kmit

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba 2014

Maria Carolina Pezzo Kmit Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em Sporisorium scitamineum, agente causador do carvão da cana-de-açúcar

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 Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba 2014

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

Kmit, Maria Carolina Pezzo

Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em *Sporisorium* scitamineum, agente causador do carvão da cana-de-açúcar / Maria Carolina Pezzo Kmit. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014. 98 p. : il.

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

1. Biblioteca em BACs 2. *Mating type* 3. Basidiomicetos 4. Genes homólogos 5. *Sporisorium scitamineum* I. Título

CDD 633.61 K49c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, irmão, familiares e principalmente ao meu filho Luca, por todo amor, apoio, incentivo, e acima de tudo por sempre acreditarem em mim...

Dedico.

Ao meu namorado e amigos, os quais fizeram parte dessa conquista...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Departamento de Genética pela oportunidade, qualidade de ensino, estrutura oferecida durante o desenvolvimento dos experimentos e oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudo e suporte financeiro.

Especialmente à Profa. Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello, pelos ensinamentos, orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, do Instituto de Biociências da USP, pelo apoio e contribuição na etapa de sequenciamento de DNA.

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, do CBMEG da UNICAMP, pela atenção e contribuição indispensável na etapa da construção da Biblioteca Genômica tipo BAC.

Ao Prof. Dr. João Paulo Kitajima, diretor de Bioinformática da Mendelics Analise Genomica, pela contribuição na etapa de montagem do genoma.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ/USP, por ceder a infraestrutura para a realização das etapas de seleção de BACs por q-PCR.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP, pela contribuição no sequenciamento dos BACs selecionados.

Ao mestrando Lucas Mitsuo Taniguti, pelo apoio e contribuição indispensável na etapa de análise de bioinformática e montagem dos genes.

A Pós-Doutoranda Giselle de Carvalho pelos ensinamentos e atenção especial a mim concedida nas etapas de extração do DNA e Hibridização.

Ao doutorando Danilo Augusto Sforça, pelo apoio e contribuição indispensável na etapa da construção da Biblioteca Genômica tipo BAC.

Ao Doutorando Gustavo Gasparin, pelo apoio no sequenciamento de DNA dos BACs e do genoma do fungo.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Microorganismos Prof. João Lúcio de Azevedo, grupo Genomics: Nathália, Suzane, Tatiane, Taisi, Leila, Gicka, Pilar, Patrícia, Juliana, Mariana, Maria Carolina, Gislâine, Lucas, Daniel, Filipe, Leandro, Leonardo, Ramon e Gustavo pelo aprendizado mútuo, compreensão, companheirismo e amizade.

Aos técnicos de laboratório Zezo, Ana e Marcos pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial ao meu filho Luca, pelo seu amor incondicional, compreensão pela distância, e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu namorado Leonardo, que sempre me transmitiu confiança, compreensão, amor e por me manter forte, mesmo nas horas que eu mesma já não acreditava mais.

Aos meus amigos, os quais sempre me proporcionaram momentos de alegria e descontração, em especial Bruna, Milena, Nínive, Raquel e Mayara por todo o apoio nos momentos mais críticos.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

"Saber sacrificar tudo a um dever é a principal e mais difícil ciência que nós temos de aprender na vida."

Júlio Dinis

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 FUNGOS CAUSADORES DE CARVÃO	23
2.2 O CARVÃO NA CANA-DE-AÇÚCAR	24
2.3 Fungo sporisorium scitamineum	27
2.4 MATING TYPE EM OUTROS FUNGOS CAUSADORES DE CARVÃO	29
2.5 BIBLIOTECAS GENÔMICAS CONSTRUÍDAS EM BACS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS HAPLOIDES COM TIPO DE RELAÇÃO SEXUAL COMPATÍVEL	35
3.2 BIBLIOTECA GENÔMICA EM VETORES DO TIPO BAC (<i>BACTERIA ARTIFICIAL CHROMOSC</i> DE <i>S. SCITAMINEUM</i>) <i>ме)</i> 35
3.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA DE ALTO PESO MOLECULAR	35
3.2.2 TESTES PARA OBTENÇÃO DO PADRÃO DE DIGESTÃO DO DNA COM HINDIII	36
3.2.3 DIGESTÃO E SELEÇÃO DO TAMANHO DOS FRAGMENTOS	37
3.2.4 Extração do dna do gel por eletroeluição	38
3.2.5 LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO	39
3.2.6 ESTIMATIVA DO TAMANHO DOS INSERTOS - MINIPREPARAÇÃO DE BACS POR MARCHEREY-NAGEL 740618.24	кіт 40
3.2.7 SELEÇÃO DAS COLÔNIAS RECOMBINANTES E ESTOQUE DA BIBLIOTECA	41
3.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONHECIDA DOS <i>LOCI</i> A E B	42
3.3.1 Extração do dna total	42
3.3.2 Amplificação do <i>locus</i> a	43
3.3.3 Amplificação do <i>locus</i> b	44
3.4 Seleção dos bacs	44
3.4.1 POOL DE PLACAS	44
3.4.2 Amplificação com enzima phi 29	45
3.4.3 Seleção dos bacs	45
3.4.4 INDUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS CLONES EM BAC SELECIONADOS	46
3.5 HIBRIDIZAÇÃO: CONFIRMAÇÃO DO SISTEMA BIPOLAR DE MATING TYPE	48
3.5.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL E SEPARAÇÃO DOS CROMOSSOMOS	48
3.5.2 PREPARO DA MEMBRANA – TRANSFERÊNCIA ALCALINA	48

3.5.3 OBTENÇÃO DO DNA PARA PREPARO DAS SONDAS	. 49
3.5.4 PREPARO DAS SONDAS	. 49
3.5.5 PREPARO DAS MEMBRANAS, PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO	. 50
3.6 SEQUENCIAMENTO	. 50
3.6.1 SEQUENCIAMENTO DAS EXTREMIDADES DO INSERTO CLONADO EM BAC	. 50
3.6.2 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DO FUNGO SPORISORIUM SCITAMINEUM.	51
3.6.3 PRÉ-PROCESSAMENTO MONTAGEM DAS SEQUÊNCIAS	. 51
3.6.4 Anotação	. 52
3.6.5 ANALISES COMPARATIVAS ENTRE OS GENES DE <i>MATING TYPE</i> DE <i>S. SCITAMINEU</i> DEMAIS FUNGOS CAUSADORES DE CARVÃO EM GRAMÍNEAS	<i>м</i> е . 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA EM VETORES DO TIPO BAC	55
4.1.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR	55
4.1.2 DIGESTÃO DO DNA COM HINDIII E SELEÇÃO DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE	. 57
4.1.3 ESTIMATIVA DO TAMANHO DOS INSERTOS E SELEÇÃO DOS RECOMBINANTES	61
4.1.4 Seleção dos bacs	. 64
4.2 HIBRIDIZAÇÃO: CONFIRMAÇÃO DO SISTEMA BIPOLAR DE MATING TYPE	. 70
4.3 ANOTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES ASSOCIADOS AO MATING TYPE	.73
4.3.1 LIMPEZA E MONTAGEM DOS CONTIGS DAS SEQUÊNCIAS RESULTANTES DAS PONTOS BACS SEQUENCIADOS	таs . 73
4.3.2 LIMPEZA E MONTAGEM DOS <i>CONTIGS</i> DAS SEQUÊNCIAS RESULTANTES SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO <i>S. SCITAMINEUM</i>	DO .74
4.3.3 ANOTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DO <i>MATING TYPE</i> DO <i>LOCUS</i> A DE SCITAMINEUM E COMPARAÇÃO COM DEMAIS FUNGOS CAUSADORES DE CARVÃO GRAMÍNEAS	: S. EM . 75
4.3.4 ANOTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DO <i>MATING TYPE</i> DO <i>LOCUS</i> B DE <i>SCITAMINEUM</i> E COMPARAÇÃO COM DEMAIS FUNGOS CAUSADORES DE CARVÃO GRAMÍNEAS	: S. EM . 81
5 CONCLUSÕES	. 85
REFERÊNCIAS	. 87

RESUMO

Caracterização de genes associados ao tipo de reação sexual em Sporisorium scitamineum, agente causador do carvão da cana-de-açúcar

Sporisorium scitamineum é um fungo basidiomiceto causador do carvão da canade-açúcar, uma doença com impacto negativo no cultivo da cana-de-açúcar, e com ocorrência em todos os países produtores. A manifestação da doença na cultura da cana depende da formação de uma hifa dicariótica a partir da anastomose de duas hifas haplóides compatíveis com relação ao tipo de reação sexual (mating-type). O controle do cruzamento sexuado (mating) é realizado pela expressão de um conjunto de genes presentes em dois loci, a e b. O locus a codifica um lipopeptídeo com função de feromônio e um receptor de feromônio, responsáveis pelo reconhecimento de células compatíveis e fusão de hifas, enquanto o locus b codifica fatores de transcrição que controlam a expressão de genes responsáveis pela manutenção das hifas dicarióticas durante o processo de infecção e crescimento do fungo dentro da planta. Apesar de desempenharem função essencial no processo de infecção e manutenção da doença em cana-deaçúcar, o conhecimento a respeito da organização genômica ou da função dos demais genes presentes nos loci a e b em S. scitamineum e em outros fungos causadores de carvão é ainda incipiente. Desta forma, o objetivo geral do presente trabalho foi isolar as regiões genômicas relacionadas aos genes de cruzamento em S. scitamineum e analisar comparativamente com regiões similares já descritas e depositadas em bancos de dados públicos. Para o isolamento destas regiões, foi construída uma biblioteca genômica em BAC de uma linhagem haplóide de S. scitamineum, a Ssc39 (+), isolada de uma variedade de cana-de-açúcar com sintomas de alta susceptibilidade. Foram selecionados 11 clones por PCR. Os insertos foram sequenciados e utilizados para confirmação da montagem dos loci no sequenciamento do genoma do fungo. Apesar do fungo S. scitamineum apresentar sistema bipolar de reação sexual assim como o fungo U. hordei, as análises comparativas de ambos os locus indicaram que S. scitamineum apresenta maior similaridade com o fungo S. reilianum principalmente com o alelo a1, no qual apresenta sistema tetrapolar de reação sexual. A anotação e caracterização dos genes do tipo de reação sexual (mating type) possibilitaram a comparação e melhor entendimento sobre esses genes de grande importância na patogenicidade e no ciclo de vida do fungo.

Palavras-chave: Biblioteca em BACs; *Mating type*; Basidiomicetos; Genes homólogos, *Sporisorium scitamineum*

ABSTRACT

Characterization of mating type loci of *Sporisorium scitamineum*, the causal agent of sugarcane smut

Sporisorium scitamineum is a basidiomycete fungus causing the smut disease in sugarcane, with a negative impact on the cultivation of sugarcane, and occurring in all producing countries. The manifestation of the disease in sugarcane crop depends on the formation of a dikaryotic hyphae originated of the anastomosis of two haploid mating type compatible cells. The control of the sexual crossing (mating) is performed by expression of a set of genes present in two loci, a and b. The locus a encodes a lipopeptide with the function of pheromone and pheromone membrane receptor responsible for cell recognition and compatible hyphal fusion, whereas the locus b encodes transcription factors that control the expression of genes responsible for the maintenance of the dikaryotic hyphal growth in plant. Although they play an essential role in the maintenance of infection and disease in sugarcane process. knowledge about the genomic organization and function of other genes in these two loci of S. scitamineum and other smut fungi is still incipient. Thus, the overall goal of this work was to isolate genomic regions related to the mating type in S. scitamineum and to perform a comparative analyze with similar regions described and deposited in public databases. For the isolation of these regions, we constructed a genomic BAC library of a haploid strain of S. scitamineum, the Ssc39 (+), isolated from a variety of sugarcane with symptoms of high susceptibility. Eleven clones were selected by PCR. The inserts were sequenced and used to confirm the assembly of both *loci* in the genome sequencing of the fungus. Although *S. scitamineum* belongs to the class of bipolar system of sexual response as well as the fungus U. hordei, the comparative analysis of both loci indicated that S. scitamineum shows greater similarity to the S. reilianum mainly with A1 allele, which has a tetrapolar system sexual response. The annotation of the genes and characterization mating type genes enabled the comparison and better understanding of the importance of these genes in the life cycle of the fungus.

Keywords: BAC-Library; *Mating type*; Basidiomycets; Homologous genes, *Sporisorium scitamineum*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3 Sintomas e estrutura da missão de chicote do fungo *S. scitamineum,* em cana-de-açúcar contendo teliósporos (SUNDAR, 2012).......26

- Figura 7 Fluxograma das etapas de processamento de pré-anotação e anotação de genes de *mating type* em *S. scitamineum......*52
- Figura 8 Plugs de agarose contendo o DNA de alto peso molecular......57
- Figura 9 Foto do DNA de alto peso molecular de *S. scitamineum* (linha 2) em gel de agarose 1% e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h. Coluna 1, Marcador de peso molecular 225 2200 Kpb (Sigma)......57
- Figura 10 Foto do DNA de alto peso molecular digerido parcialmente com enzima HindIII em gel de agarose 1% e eletroforese de campo pulsado nas

1 INTRODUÇÃO

Com uma produção estimada de 652 milhões de toneladas na safra de 2013/2014 e com um aumento de 10,7% em relação à safra anterior, o Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) do mundo, seguido pela Índia, China e Tailândia. Essa cultura compreende 8,7 milhões de hectares de área plantada, com destaque para o Estado de São Paulo, que representa 51,31% da área total cultivada (CONAB 2013).

Entre os fatores importantes que influenciam na produção da cana-de-açúcar e consequentemente resultam na redução de biomassa e dos seus subprodutos está a severidade de algumas doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus, nematoides e micoplasmas (SANGUINO, 1998). Para a cana-de-açúcar foram descritas mais de 216 doenças, destas, pelo menos 58 foram encontradas no Brasil (ROSSETO, SANTIAGO, 1994).

Na cultura da cana-de-açúcar, quatro doenças são consideradas como mais importantes: o carvão da cana, raquitismo das soqueiras, escaldadura das folhas e mosaico da cana-de-açúcar. Entre as doenças fúngicas que trazem preocupações e podem trazer prejuízos no setor canavieiro do Brasil destacam-se a ferrugem e o carvão (SANTOS, 2003).

A doença do carvão na cana-de-açúcar é causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum*. A planta é mais vulnerável à doença em seu estágio inicial de crescimento. As condições de manejo da cana-de-açúcar e o fato destas permanecerem por alguns anos no campo, com ciclos de corte e rebrota, tornam a presença dos esporos um problema durante toda a estação de cultivo (FIGUEIREDO, 2008).

Em espécies de fungo causadoras de carvão, o cruzamento sexuado é controlado por dois *loci, a* e *b* (BAKKEREN et al., 2008). O *locus a* apresenta dois genes que codificam um feromônio (Mfa1 e Mfa2) e um receptor de feromônio (Pra). O feromônio é responsável pelo reconhecimento mútuo das hifas de conjugação haplóides. O reconhecimento ocorre pelo produto do gene que codifica uma proteína transmembrana receptora (BAKKEREN et al., 2008; BÖLKER, 2001). O *locus b* apresenta dois genes regulatórios, bE (bEast) e bW (bWest) que são transcritos em orientação divergente. Eles codificam duas subunidades de um fator de transcrição com homeodomínios (HD1 e HD2). Os homeodomínios são segmentos de DNA

constituidos por 180 pares de base (pb) que codificam 60 aminoácidos altamente conservados durante a evolução, presentes em genes *homeobox* (genes conhecidos como controladores do desenvolvimento e considerados importantes na evolução dos organismos). Proteínas com homeodomínios funcionam como fatores de transcrição por meio da ligação do mesmo com o DNA em uma sequencia específica, interagindo com genes-alvo e promovendo sua possível ativação, repressão ou mesmo modulação (ABATE-SHEN, 2002; NUNES et al.. 2003).

Sabe-se que a estrutura genômica para os dois *loci* (*a* e *b*) em Ustilago maydis, Ustilago hordei e Sporisorium reilianum já estão bem caracterizadas (KELLNER et al., 2011), porém em S. scitamineum há uma necessidade de maiores estudos dessa caracterização e análise, principalmente, do *locus a*.

Uma estratégia que auxilia na análise e caracterização desses genes é a utilização de sequências de BAC-*ends*. Os BACs (*Bacterial Artificial Chromossome*) são vetores, inseridos em bactérias, que carregam insertos de aproximadamente 100 a 150 kbp, constituindo bibliotecas genômicas (SHIZUTA et al., 1992) A partir da biblioteca genômica é possível selecionar e isolar um inserto que contenha uma sequência de interesse utilizando *primers* específicos.

Considerando o papel chave dos genes associados ao tipo de reação sexual (*mating-type*) em patogenicidade, e ainda o discreto conhecimento a respeito da organização genômica assim como a função dos genes presentes nos loci *a* e *b* de fungos causadores de carvão em gramíneas, o presente trabalho objetivou num contexto geral analisar comparativamente sequências que compreende essa região genômica em *S. scitamineum*.

Mais detalhadamente, visou-se atingir os seguintes objetivos específicos: (*i*) Construir uma biblioteca genômica de *S. scitamineum* inserida em vetores BACs (*ii*) Identificar e selecionar, via PCR, clones da biblioteca que contivessem genes associados à determinação do *mating-type*; (*iii*) Sequenciar completamente o inserto dos clones selecionados com cobertura da região dos dois *loci* através de sequências de BAC-*ends* e do sequenciamento do genoma do fungo; (*iv*) Montar, anotar e analisar comparativamente as sequências obtidas com aquelas sequências equivalentes já determinadas para outras espécies de fungos e depositadas em bancos de dados públicos e (*v*) Analisar comparativamente em diferentes linhagens de *S. scitamineum* os genes chaves dos *loci a e b*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos causadores de carvão

O termo fungos do carvão é usado para descrever um grupo de mais de 1.000 espécies de fungos que infectam de maneira geral a florescência das plantas, resultando em sintomas característicos, onde ocorre a substituição de órgãos da planta por uma massa negra de teliósporos semelhantes à fuligem (DEACON, 2005), e podem causar perdas consideráveis nas plantas cultivadas (VANKY, 1987).

Os fungos basidiomicetos causadores de carvão em gramíneas, parasitas biotróficos de plantas, compreendem um grupo de espécies da família Ustilaginaceae e contém mais de 50 gêneros que são capazes de infectar mais de 4.000 espécies de plantas. O mais notável entre estas espécies de plantas é o da família das Gramineae (atual Poaceae), ou seja, gramíneas (DEACON, 2005). Quase todas as gramíneas são atacadas por fungos causadores de carvão, mas cada fungo tem uma gama de hospedeiros muito restrita. Uma espécie raramente infecta mais do que três plantas hospedeiras diferentes (BAUER et al., 2001). São fungos biotróficos e dependentes de suas hospedeiras para completar a sua vida ciclo (STOLL et al., 2005). Entre os gêneros mais comuns estão *Ustilago, Tilletia* e *Sporisorium* (BAUER et al., 2001).

Pesquisas sobre espécies modelo como *U. maydis, U. hordei e S. reilianum* revelaram os primeiros conhecimentos da diversificação e complexidade da biologia do cruzamento sexual desses fungos (STOLL et al., 2005; SCHIRAWSKI et al., 2005, URBAN et al., 1996). *U. maydis* é considerado um bom modelo nos estudos da genética do tipo de relação sexual e da fisiologia da sinalização de ferormônio (KÄMPER et al., 2006; VOLLMEISTER et al., 2011).

Como todo fungo estritamente biotrófico, os fungos do carvão não utilizam de estratégias agressivas durante a interação e consequentemente não matam o seu hospedeiro. Várias fases com relação ao tipo celular que compõe a sua estrutura podem ser monocarióticos haplóides e diplóides e dicarióticos – durante o seu ciclo de vida. Todas as espécies de fungo que causam carvão induzem o ciclo sexual para formar hifas dicarióticas antes de infectar a planta hospedeira. O dicário infeccioso necessita do hospedeiro para proliferar e produzir os esporos diplóides sexuados e de resistência. Esses esporos quando maduros germinam, sofrem

meiose produzindo esporídios haplóides que se fundem formando o dicário infecciosoe estabelecem apressórios para invadir os tecidos da planta hospedeira e iniciar o processo infeccioso (STOLL et al., 2005). As células haplóides crescem por brotação e vivem saprofiticamente e não são capazes de causar a doença. O contato próximo e de dependência do fungo com o hospedeiro os torna um grupo de patógenos bastante especializados.

2.2 O carvão na cana-de-açúcar

O carvão da cana-de-açúcar, tendo como agente causal o fungo *S. scitamineum*, foi primeiro relatado na África do Sul em 1877, na cidade de Natal (LUTHRA, 1940) o segundo relato foi nas Américas na província de Tucumán na Argentina (SUNDAR, 2011), e expandiu para o Paraguai em 1944 (JAMES, 1978) e depois para o Brasil em 1946 (VEIGA, 1972). O carvão foi descrito ocorrendo em todas as áreas de cultivo comercial de cana com exceção, até o momento de Fiji e Papua Nova Guiné que são consideradas regiões do centro de origem da cana (COMSTOCK e LENTINI, 2005). Desde então o carvão tem se expandido pelos campos de cana (Figura 1).



Figura 1- Distribuição do fungo *S. scitamineum* em todos os países produtores de cana-de-açúcar ao redor do mundo (PLANTWISE, 2013)

No Brasil a primeira ocorrência registrada em 1946 foi no engenho de Tarumã no município de Assis, Estado de São Paulo. No levantamento fitossanitário realizado na época, o município de Assis, revelou ser o maior foco da doença, mas touceiras atacadas também foram encontradas em Cândido Mota, Palmital e Macaraí. No município de Piracicaba, a doença foi identificada em 1951, na Usina Monte Alegre. Poucos anos mais tarde o carvão da cana-de-açúcar já se encontrava em diversos estados brasileiros, como Rio grande do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, no sul de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Em 1985 o patógeno chegou até a região Nordeste, no município de Cascavel, Ceará. No ano seguinte, novas regiões foram atingidas pelo fungo, tendo à doença alcançada a região central de Goiás e Bahia (COPERSUCAR, 1987).

A doença é considerada uma das mais importantes no cultivo da cana-deaçúcar e a diminuição na produtividade é provocada por um conjunto de fatores, que incluem redução do diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução no número de perfilho industrializável, e perdas no conteúdo de açúcar devido a um aumento de tecido fibroso (LEE-LOVICK, 1978; FERREIRA; COMSTOCK, 1989; CASAGRANDE, 1998), deixando-os em condições inadequadas para o processo de industrialização atualmente utilizado, assim reduzindo a biomassa e a produção de açúcar e etanol.

Os danos causados pelo fungo *S. scitamineum*, são variáveis, mas podem causar perdas de até 100% em variedades suscetíveis (TOKESHI, 1997). COMSTOCK e LENTINI (2005) afirmaram que certas regiões canavieiras podem permanecer por muitos anos sem relatos de carvão, entretanto, a doença pode reaparecer e devastar rapidamente áreas com variedades suscetíveis. Os danos causados pelo fungo incidem tanto na redução da produção como na perda de qualidade do caldo. (BERGAMIN FILHO et al., 1987).

A designação de carvão se refere à formação massiva de esporos escuros com aparência de "cinzas de carvão" espalhados pela planta. Na década de 80 ocorreu a maior epifitia registrada no Brasil causando grandes prejuízos sobre a variedade NA56-79, que ocupava cerca de 50% da área canavieira, registrando incidências de até 80% nas áreas comerciais (BERGAMIN, et al., 1987; CASAGRANDE 1998).

Antes de emitirem o chicote, as plantas doentes, apresentam um ângulo de inserção das folhas mais agudo, limbo foliar estreito e curto, colmos mais finos que o normal e touceiras com superbrotamento (TOKESHI, 1997, Figura 2). Os chicotes surgem geralmente em plantas com 2-4 meses de idade, ocorrendo também em plantas com 6-7 meses de idade. Nessas estruturas são encontrados milhões de

teliósporos (Figura 3) que podem se dispersar rapidamente com o vento por toda a cultura (COMSTOCK; LENTINI, 2005; TOKESHI, 1997).



Figura 2- Sintomas em touceiras de cana-de-açúcar infectadas pelo fungo *S. scitamineum.* Sintomas característicos de limbo foliar estreito e curto, colmos mais finos que o normal e touceiras com superbrotamento em comparação com a planta saudável (SUNDAR, 2012)



Figura 3- Sintomas e estrutura da missão de chicote do fungo *S. scitamineum,* em cana-de-açúcar contendo teliósporos (SUNDAR, 2012)

Diferenças quanto à suscetibilidade de variedades de cana-de-açúcar a diferentes isolados do fungo já foram detectadas (COMSTOCK; HEINZ, 1977). Taxas e padrões de colonização diferem também entre variedades suscetíveis e resistentes (LLOYD; PILLAY, 1980; RAGO et al., 2009). Outra variável a doença

refere-se à evolução do patógeno. Solos contaminados com *S. scitamineum,* favorecem a hibridação entre variantes do fungo, permitindo a geração de novas linhagens virulentas (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002; SCHENCK, 2003; BRAITHWAITE et al., 2004; RABOIN et al., 2007).

2.3 Fungo Sporisorium scitamineum

Primeiramente, o patógeno do carvão, foi descrito e identificado em 1870 (MUNDKUR, 1939) como *Ustilago sacchari*, nome que foi originalmente atribuído a um fungo, no qual, atacava flores no Irã (GIGLIOTI, 1993). Sydow (1924) foi o primeiro a concluir que o agente causal do carvão da cana é completamente distinto de *U. sacchari. S. scitamineum* é um fungo do filo Basidiomycota, classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales e família Ustilaginaceae. A espécie *Sporisorium scitamineum* foi retirada do gênero *Ustilago (Ustilago scitaminea)* considerando resultados de duas análises independentes (PIEPENBRING et al., 2002; STOLL et al., 2005). Entre outros argumentos, a transferência foi corroborada por diferenças encontradas nas estruturas reprodutivas (esporângio) formadas durante o desenvolvimento do fungo na planta.

O S. scitamineum, como todas as espécies do gênero *Ustilago*, é um fungo basidiomiceto, biotrófico, parasita de tecidos meristemáticos. Sua penetração na planta é realizada por hifas dicarióticas através de tecidos não diferenciados da parte basal das gemas ou pela base das primeiras folhas emergentes (TOKESHI, 1985). É um fungo dimórfico, variando entre uma fase haplóide (leveduriforme) e uma fase dicariótica (micelial).

O ciclo sexuado só se completa durante a interação com a planta hospedeira, no entanto, a propagação vegetativa é rápida e facilmente obtida em meio de cultura artificial. A manifestação dos sintomas provocados por *S. scitamineum* na cultura da cana depende inicialmente da formação de uma hifa dicariótica a partir da junção de duas linhagens haplóides geneticamente distintas, porém compatíveis dependentes do tipo de reação sexual (*mating type*) (ALBERT e SCHENCK, 1996; KRONSTAD e LEONG, 1990) (Figura 4).

O desenvolvimento da doença culmina na interferência no metabolismo da planta, gerando um estrutura em forma de chicote (composto de tecido vegetal e tecido do fungo, (Figura 3) que abriga os teliósporos diplóides (2n). Os teliósporos

são esporos de resistência que passam por um período de dormência e quando germinam podem formar um pró-basidio. Os fungos de carvão não apresentam a formação de um basidiocarpo clássico. Os basidiósporos (n) são formados a partir do pró-basídio, no qual ocorre cariogamina e meiose (HIRSCHHORN, 1950). *S. scitamineum* é um fungo heterotálico de forma que, os basidiósporos compatíveis (produtos da meiose), ou seja, com tipos de reação sexual diferentes, quando germinam, promovem anastomose de hifas, que são dicarióticas e infecciosas, iniciando novamente o ciclo sexuado. Somente essa fase micelial dicariótica é infecciosa. Neste sentido, patogenicidade está diretamente associada aos eventos que levam a fusão de hifas compatíveis.



Figura 4- Distribuição Características do desenvolvimento do fungo *S. scitamineum* e aspectos da interação com a cana-de-açúcar. 1: Emissão do chicote e formação dos teliósporos, 2: Germinação dos teliósporos e emissão de probasídio e esporídios produto da meiose, 3: Reação sexual, 4: Fusão dos esporídios e formação da hifa dicariótica infectiva, 5: Esporídios na forma leveduriforme (REIS, 2012)

Os fungos basidiomicetos, são na sua maioria heterotálicos, ou seja, exigem um tipo diferente de *mating* para entrar na fase sexual. Os genes *mating type* garantem que apenas os núcleos geneticamente distintos irão se fundir e passar por meiose antes da formação dos esporídios. Além do sistema de acasalamento tetrapolar (onde os *loci* do tipos de acasalamento sexual não estão fisicamente ligados no mesmo cromossomo), fungos basidiomicetos heterotálicos apresentam também um sistema bipolar (onde os *loci* do tipos de acasalamento sexual estão contidos no mesmo cromossomo em um sitema único de *MAT*) (KRONSTAD e STABEN, 1997).

Albert (1996) desenhou *primers*, com base na sequência dos genes regulatórios codificados pelo *locus b*, bE e bW (Figura 5) de *U.maydis*, e avaliou a sua utilização na detecção de *S. scitamineum in planta*. O produto amplificado foi sequenciado e apresenta cerca de 70% de identidade a regiões homólogas de *U. maydis* e *U. hordei.* Dois alelos foram identificados no genoma de *S. scitamineum* para esse gene na população analisada.



Figura 5- Esquema representando o posicionamento do *primers* utilizados para amplificar uma região específica do *locus b* que determina o tipo de reação sexual como descrito por Albert e Schenck (1996)

Até o momento, existem 74 sequências de *S. scitamineum* codificando 14 proteínas depositadas na base de dados *GenBank*, sendo 9 delas da região que contém o *locus* b para *mating type*.

2.4 Mating type em outros fungos causadores de carvão

Estudos em *U. maydis,* assim como em espécies causadoras de carvão, revelam que para a realização do ciclo sexual, as células do fungo precisam ser compatíveis, ou seja, precisam apresentar tipos de reação sexual compatíveis (*mating type*). O tipo de reação sexual é controlado por dois *loci, a* e *b* (BAKKEREN et al., 2008: BAKKEREN et al., 1992; ALBERT e SCHENCK, 1996). O *locus a* apresenta dois genes os quais codificam um lipopeptídeo com função de feromônio e um receptor de feromônio. O feromônio é responsável pelo reconhecimento mútuo das hifas haplóides. O reconhecimento acontece pelo produto do gene que codifica uma proteína transmembrana receptora. Os feromônios lipopeptídeos Mfa1 e Mfa2 secretados por esporídios cujo alelos sejam de reação sexual diferente são detectados reciprocamente através de receptores transmembrana de feromônios

(Pra). Após a detecção do sinal emitido pelo feromônio, através de uma sinalização intracelular que envolve proteínas-G e uma cascata de MAP-cinases, as células respondem com a formação de hifas de conjugação que crescem uma em direção à outra e se fundem em suas pontas (BAKKEREN, et al., 2008; BÖLKER, 2001). O *locus b* é multialélico e codifica fatores de transcrição da família de reguladores do desenvolvimento que contêm homeodomíneos (SINGH et al., 2004; BÖLKER, 2001). A fusão de células compatíveis, decisiva ao processo de infecção e o estabelecimento da doença em *U. maydis,* é regulada por um par de fatores de transcrição (BAKKEREN et al., 2008). Durante o processo de infecção, sinais do ambiente e outros específicos ao hospedeiro são percebidos e transmitidos utilizando vias de sinalização intracelular. Se componentes dessas vias são interrompidos, a virulência pode ser reduzida (BAKKEREN et al., 2008; BÖLKER, 2001).

A estrutura genômica completa do *locus a* foi determinada para os dois alelos descritos em *U. maydis* (ANDERSON, et al., 1999; BAKKEREN e KRONSTAD, 1996) e para os três alelos descritos em *U. hordei* (SCHIRAWSKI et al., 2005). Para as duas espécies a sequência dos genes que codificam os feromônios e os receptores variam entre os alelos, assim como a região adjacente. Existem pelo menos outros quatro genes com função ainda desconhecidas na região do locus *a*, e outros, como os genes *rga*2 e *lga*2 com função em potencial na herança mitocondrial uniparental (BORTFELD et al., 2004).

Ainda em U.maydis, após a fusão dos esporídios, o dicário filamentoso é formado e apenas mantido se ambos os núcleos possuam diferentes alelos no locus b, que existe em pelo menos 23 alelos. O locus b apresenta dois genes regulatórios, bE (bEast) e bW (bWest) que são transcritos em orientação divergente. Eles codificam duas subunidades de um mesmo fator de transcrição com homeodomínios, cada qual contém homeodomínios de classes diferentes: HD1 e HD2. O N-terminal dessas subunidades protéicas contém o maior grau de variação quando alelos diferentes são comparados (região variável), e por isso foram utilizados para diferenciar molecularmente os alelos. A porção C-terminal das proteínas, onde se encontram os homeodomínios, é altamente conservada. Para que ocorra a continuidade do crescimento dicariótico filamentoso in planta, é necessário a formação de um fator de transcrição heterodimérico funcional, formado pelo produto de alelos diferentes.

Os loci *a* e *b* em *U. maydis* estão localizados em cromossomos diferentes fazendo com que a segregação desses *loci* seja independente (BAKKEREN et al., 2008). Esse tipo de distribuição independente dos *loci a* e *b* nos cromossomos é denominado sistema tretrapolar de *mating-type*. O *mating-type* em *S. reilianum*, causador de carvão em milho e cevada, é também do tipo tetrapolar. O sistema é dito bipolar quando os *loci a* e *b* estão fisicamente ligados no genoma segregando como um único *locus*. Entre os fungos causadores de carvão em gramíneas, o sistema bipolar foi descrito em *U. hordei* e *S. scitamineum* (BAKKEREN e KRONSTAD, 1994; BAKKEREN e KRONSTAD, 1993; BAKKEREN et al. 2008). Para *U. hordei* foram descritos dois alelos diferentes para o locus *b* (BAKKEREN e KRONSTAD, 1994). *S. scitamineum* apresenta sistema bipolar de reação sexuada onde foram descritos dois alelos para o *locus b* (+ e -) (ALBERT e SCHENCK, 1986). Em estudos realizados pelo *Genomics Group* ESALQ/USP em uma população de isolados obtidos de diferentes regiões canavieiras do Brasil está sendo investigado a presença de outros alelos para *S. Scitamineum*.

Na estrutura genômica conhecida para o *locus b* em *U.maydis, S.reilianum* e *U. hordei* MAT-1, os genes encontram-se na mesma orientação, ordem e com o mesmo contexo genômico. Já para o *locus* MAT-2 de *U. hordei,* os genes estão localizados de maneira invertida considerando o contexto descrito anteriormente.

No sequenciamento completo das 20,5 milhões de bases do genoma de *U. maydis,* foram preditos 6.902 genes. Como era esperado, frente à natureza da interação com o hospedeiro, não foram encontrados em abundância genes de patogenicidade como aqueles comumente descritos em fitopatógenos necrotróficos. No entanto, genes que codificam enzimas de degradação da parede celular estão presentes no genoma de *U. maydis* (KRONSTAD, 2008). Experimentos onde foi interrompida uma cópia do gene para endoglucanase não surtiram efeito na redução de virulência (SCHAUWECKER et al, 1995). Ainda, a partir do sequenciamento do genoma foi possível detectar um agrupamento de genes que codificam proteínas secretadas previamente descritas como de função desconhecida. Em experimentos funcionais foi comprovada a participação de tais proteínas na patogenicidade do fungo (KÄMPER et al., 2006), no entanto até o momento ainda é desconhecida a função específica dessas proteínas durante a interação com o hospedeiro.

Seguindo o desenvolvimento das novas tecnologias de sequenciamento em grande escala, as iniciativas de sequenciamento completo de genomas

apresentaram um avanço com relação aos fungos. Alguns dos patógenos de plantas mais importantes já apresentam disponíveis as sequências completas do genoma (SOANES et al., 2007; XU et al., 2006). Além dos genomas completamente sequenciados de *U. maydis*, e *S. reilianum* (SCHIRAWSKI et al., 2010), que causa carvão em milho esforços de sequenciamento estão em progresso para *U. hordei* que causa carvão em cevada (BAKKEREN et al., 2008). A análise molecular, bem como conhecimentos sobre o mecanismo de ação e compatibilidade existente entre os alelos dos dois *loci* envolvidos no processo de reação sexual é importante para o entendimento desse patossistema.

2.5 Bibliotecas genômicas construídas em BACs

O estudo dos genomas de organismos eucariotos sofreu um grande avanço nos anos 80 com o advento das chamadas bibliotecas genômicas. Resumidamente, essas bibliotecas, são uma coleção de clones que representam o genoma de um organismo em sua totalidade. A construção consiste na ligação de fragmentos do genoma em estudo em algum tipo de vetor, que por sua vez, são inseridos em um organismo hospedeiro, sendo geralmente bactérias ou leveduras (QUAIL et al., 2011).

Bibliotecas de grandes insertos de DNA têm sido ferramentas muito importantes no mapeamento físico, clonagem de genes e análise da estrutura e função gênica de vários organismos (LAHAYE et al., 1998; SHIRASU et al., 1999; FRARY et al., 2000). Com o aumento do uso dessa técnica, uma série de vetores foram desenvolvidos, cada um com sua especificidade, vantagens e desvantagens. Dentre esses vetores, destacam-se os Cromossomos artificiais de leveduras - YACs (BURKE et al., 1987), Cromossomos artificiais de bactérias - BACs (SHIZUIA et al., 1992), PACs (IAONNOU et al., 1994), fosmídeos (KIM et al., 1992). A tecnologia que envolve a obtenção de DNA de alto peso molecular (*High Molecular Weight* – HMW) tem ganhado atenção especial nos últimos anos, e vem sendo desenvolvida e utilizada em pesquisas genômicas modernas, principalmente em construções de bibliotecas de grandes insertos de DNA.

A utilização de vetores YACs e BACs, para construção de bibliotecas genômicas de grandes insertos de DNA é muito mais frequente quando comparada aos demais vetores (CENCI et al., 2003), pois com um número reduzido de clones

necessários é capaz de representar e produzir uma ampla cobertura do genoma de um dado organismo (ZHANG et al., 2012). Recentemente, os BACs tem se tornado o vetor mais escolhido para a construção destas bibliotecas devido à facilidade do manuseio e isolamento, propagação dos clones, relativa alta estabilidade e baixo nível de quimerismo quando comparada aos vetores YACs (NOIR et al., 2004, KELLEY et al., 1999).

BACs não são vetores criados a partir de cromossomos artificiais *per se*. Ao contrário do que o nome descreve, mas são fatores bacterianos do tipo *F* modificados. Apesar de serem capazes de carregar insertos de até 500 Kpb, o tamanho típico de um fragmento clonado em BAC é de 80 a 200 Kpb (PETERSON et al., 2000). A maioria dos vetores BAC contém as características de seleção comuns a maioria dos vetores, como resistência a antibióticos e um sítio de clonagem múltipla associado a um gene repórter (o que possibilita a inativação por inserção de fragmento). A estabilidade de clones BAC é em parte devido à presença do fator F que impede que mais de um BAC habite simultaneamente uma mesma bactéria (YUKSEL e PATERSON, 2005).

Bibliotecas BAC em que cada clone é armazenado individualmente tem se tornado uma ferramenta central na pesquisa genética. Estas bibliotecas já foram feitas para diferentes organismos de diferentes taxa e tem sido empregadas em diversas áreas da genômica como para o sequenciamento completo de genomas (VENTER et al., 1996; ZHANG et al., 2001; SATO et al., 2011), isolamento de genes (COYNE et al., 2007; PAIVA-JORGE et al., 2012; JANG et al., 2006), análises comparativas de estrutura gênica e sintenia (ILIC et al., 2003; WANG et al., 2005; MA et al., 2010), integração de mapas de ligação e cromossômico (FUCHS et al., 1998; PEDROSA et al., 2002; WAI et al., 2010), análise do genoma funcional em larga escala (CHANG et al., 2011; JOHNSON et al., 2011), prospecção de SNPs (OLLITRAULT et al., 2012), investigação da estrutura genômica por meio de hibridizações (CHENG et al., 2002) e clonagem posicional (PATOCCHI et al., 1999; JANDER et al., 2002; MONNA et al., 2002; ZHANG et al., 2007), entre outras.

A facilidade de sequenciamento dos clones de BAC possibilitou o desenvolvimento da estratégia de BAC-*end Sequencing* (VENTER et al., 1998), que possibilitam uma primeira visão sobre a composição de um genoma, pela análise das sequências das pontas dos insertos e o mapeamento de genes de cópia simples (PETERSON et al., 2000).

A utilização das bibliotecas genômicas em BAC possibilitou a condução de experimentos como desenvolvimento de mapas físicos para grandes genomas e o sequenciamento completo de genomas, nos quais, eram difíceis de serem realizados usando bibliotecas convencionais, além de demandar um custo muito inferior ao realizado sem auxílio de bibliotecas em vetores do tipo BAC (ZHANG ET al., 2012)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das linhagens haploides com tipo de relação sexual compatível

Uma linhagem de *S. scitamineum*, Ssc39, isolada de uma variedade altamente susceptível (IAC982053) ao carvão foi à linhagem de referência utilizada neste projeto e foi obtida na estação experimental do programa de melhoramento do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana, Instituto Agronômico, Ribeirão Preto em colaboração com a Dra. Silvana Creste. O crescimento do estado haplóide do fungo (leveduriforme) foi obtido anteriormente e mantido em meio sólido ou líquido YM (composto de 0,3% de extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% de peptona de soja, 1% de glicose) a temperatura de 28° C, como descrito em Singh et al. (2005). O estoque foi realizado a -80°C das fases leveduriformes em glicerol 15%.

O teste de compatibilidade para tipos de reação sexual *(plating mating)* foi realizado para cada cultura oriunda de teliósporos. Foram isoladas cinco colônias leveduriformes (haplóides) da seguinte forma: o teliósporo cultivado em meio sólido foi inoculado em meio líquido sob agitação por 24 horas a 28 °C. Diluições seriadas foram plaqueadas em meio de cultura sólido para obtenção de colônias monospóricas. As colônias isoladas foram testadas quanto à compatibilidade em placas de *mating* segundo Bölker (1992). Células de cada colônia isolada foram suspensas em solução salina e 20 µL adicionadas a uma placa contendo meio sólido. Em cada gota foi adicionada uma segunda suspensão de células de outra colônia para obtenção das hifas aéreas cada vez que a reação fosse compatível.

3.2 Biblioteca genômica em vetores do tipo BAC (*Bacteria Artificial Chromosome*) de S. scitamineum

3.2.1 Extração do DNA de alto peso molecular

Estratégias de rotina em laboratório de biologia molecular foram realizadas seguindo protocolos descritos em Sambrook et al. (1989). Para obtenção do DNA de alto peso molecular foram utilizados protoplastos em adaptação de Harju *et* al (2004). Utilizou-se como inóculos colônias leveduriformes (haplóides), da linhagem
ssc39 positiva, crescidas em meio líquido YEDP (1% de extrato de levedura, 1% de peptona de soja, 2% de glicose), em incubadora sob agitação de 300 rpm, a 28 °C, por 24 h. As células leveduriformes crescidas foram transferidas para um tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugado por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao centrifugado adicionado 10 mL de EDTA 10 mM. A amostra foi cuidadosamente homogeneizada com utilização de pipeta. Em seguida foi centrifugada por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 4,5 mL de solução McClustey (1M Sorbitol, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaHPO₄, pH 5,8), descrita por McClustey e Mills (1990) com 8 mg/mL de Glucanex (Sigma L1412). A homogeneização da amostra foi centrifugada por 15 min a 1.000 rpm, o sobrenadante descartado e adicionado 100 μL de 25 mM – Tris, 1M Sorbitol e 25 mM de EDTA. A amostra foi homogeneizada com a utilização de ponteiras com as pontas cortadas e transferida para microtubos de 1,5 mL.

Os moldes de *plugs* de agarose (BioRad) foram lavados, limpos com álcool 70% e esterilizados sob luz UV. A parte inferior dos moldes foi selada com fita crepe adesiva. Os tubos contendo o DNA de alto peso molecular foram incubados em estufa a 45°C durante 10 min.

Foram homogeneizados 100 µL da amostra com 100 µL de agarose com baixo ponto de fusão (*LMP- low melting point*), 2,5% e transferidos imediatamente para o molde de *plug* previamente montado. Após a secagem dos *plugs*, foram transferidos para microtubos de 2 mL e acrescido 1,5 mL de solução com protease (SDS 1%, EDTA 0,5 M, protease Sigma[®] 1 mg/mL), mantidas a -4°C por 24h. Após 24h foi adicionado 100 µL de EDTA.

3.2.2 Testes para obtenção do padrão de digestão do DNA com HindIII

O procedimento foi realizado segundo Peterson, *et al* (2002), modificado. Foi realizada a tríplice lavagem dos *plugs* previamente preparados em tubos tipo Falcon de 50 mL utilizando-se 20 mL de T₁₀E₁. As duas primeiras lavagens foram realizadas por 1h sem agitação, a terceira lavagem foi realizada por 1h sob leve agitação. A solução foi trocada a cada lavagem. Em seguida a solução foi descartada e os *plugs* transferidos para microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se o tampão da enzima *Hind*III

(50 µL de Buffer, 450 µL de H₂O mili-Q). Os *plugs* com tampão ficaram incubados, *overnight* a 4°C. Em seguida, foram preparados 6 microtubos contendo em três dos tubos 5 µL da enzima *Hind*III (10 unidades/ µL) e três 10 µL da enzima *Hind*III. Foram mantidos por 30 min no gelo e seguidamente os *plugs* foram adicionados em cada um dos microtubos mantidos por mais 1h no gelo. Para o teste de digestão as amostras dos microtubo foram submetidas ao banho seco à 37°C por 2 min, 10 min e 15 min. Em seguida foi adicionado 100 µL de EDTA em cada amostra e agitados gentilmente para promover o contato entre a agarose e o EDTA (Tabela 1).

Tubos	Quantidade de enzima (Unidade)	Tempo de incubação a 37ºC (min)
А	50	2
В	50	10
С	50	15
D	100	2
Е	100	10
F	100	15

Tabela 1 – Concentrações de *Hind*III e tempo de incubação utilizados no teste de digestão da enzima de restrição

Para a visualização dos padrões de digestão foi preparado um gel de agarose 1% (140 ml TBE 0,5 x, 1,4 g de agarose). O gel correu em eletroforese de campo pulsado (Biorad CHEF-DR III) utilizando os seguintes parâmetros: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h e corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.2.3 Digestão e seleção do tamanho dos fragmentos

Para a digestão parcial do DNA foi utilizado o padrão de digestão contendo 10 µL da enzima *Hin*dIII e submetido ao banho seco à 37°C por 2 min conforme o teste descrito no item 3.2.2. Após determinar a concentração ótima da enzima, temperatura e tempo de digestão ideal para produzir fragmentos entre 100 a 300 kpb, foi realizada a digestão dos *plugs* de agarose. Em seguida, o DNA foi separado em dois géis de agarose 0,8% (140 ml TBE 0,5 x, 1,12 g de agarose) de eletroforese em campo pulsado sucessivos, Seleção I e Seleção II, para verificar e selecionar os fragmentos de tamanho adequado para a construção da biblioteca. Na Seleção I, o

DNA parcialmente digerido foi aplicado em uma canaleta resultante da junção dos poços na porção mediana do gel, e separado em eletroforese de campo pulsado utilizando os seguintes parâmetros: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h. A região contendo fragmentos entre 50 a 300 kpb foi excisada do gel e dividida em três blocos iguais (a, b e c). Para a Seleção II, os três blocos foram colocados em um novo gel de agarose 0,8% contendo a fração do meio em agarose LMP 0,8% e separados por eletroforese de campo pulsado utilizando os seguintes parâmetros: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h. Após o término da segunda seleção, os pedaços de gel (a, b e c) com fragmentos de aproximadamente 100 - 250 kpb foram excisados e armazenados em TBE 0,5x a 4°C (PETERSON et al .2002).

3.2.4 Extração do DNA do gel por eletroeluição

O isolamento do DNA por eletroeluição foi realizado segundo Peterson, *et al* (1999). Primeiramente todos os componentes do Eletroporador foram tratados com NaOH por 15 min, seguidos de banho em água destilada por mais 15 min, para eliminação de possíveis resíduos moleculares. A fração contendo fragmentos entre 100 a 250 kpb foi recortada do gel e dividida três blocos iguais (a, b e c) como citado anteriormente. Os blocos de agarose foram lavados em TAE 1x (96,8g de Tris base, 22,84ml de Ácido Acético Glacial, 14,88 ml de EDTA 0.5 M, pH 8,0) por 1 h 30 min, sendo trocado a cada meia hora. Após a lavagem, os blocos foram submetidos a corrida em eletroeluidor por 2h (30 mA, 80-100 V), ao final os eletrodos foram invertidos por 90 s. Foram recuperados os volumes em A 73 μ L, em B 75 μ L e em C 108 μ L. O conteúdo foi transferido para microtubos de 0,6 mL e mantidos no gelo.

Para a quantificação do DNA foi utilizado um gel de agarose 0,8%, em TAE 1x. Foram adicionados 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ng/µL de lambda DNA (Invitrogen) e 5 µL de DNA eletroeluído adicionado de 2 µL de tampão da amostra (Azul de Bromofenol: 30% de glicerol, 70% de $T_{10}E_{10}$, bromofenol). As amostras foram levadas a eletroforese juntamente com os marcadores a 45 mA por 1 h. corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE). Durante todo o procedimento foram utilizadas ponteiras de 200 µL com pontas cortadas, para minimizar a quebra mecânica do DNA.

3.2.5 Ligação e Transformação

Após a quantificação do DNA, foram misturados o volume contendo o inserto e vetor na razão de 1:5 em ng de DNA de acordo com o protocolo do KIT CopyControlTM BAC Cloning Epicentre – Biotechnologies. O vetor utilizado para a clonagem foi pCC1BACTM (*Epicentre*®) (Figura 6). Todas as soluções e reagentes utilizadas foram fornecidas pelo kit. A mistura inserto/vetor foi transferida para microtubos de 0,6 mL, incubados a 55°C por 10 min, seguidos de incubação a temperatura ambiente por 15 min. O volume final foi de 87 µL. Foram adicionados a enzima ligase 5U/µL (2 µL), tampão da ligase 10x (10 µL) e ATP (1 µL) obtendo-se volume final de 100 µL. A ligação foi incubada a 16 °C, overnight. A enzima foi desnaturada a 65°C por 15 min. Procedeu-se a dessanilização dos 100 µL de ligação em solução de agarose 1%-100 mM sacarose por 1 h 30 min. O produto da ligação foi armazenado a -20°C.

Para o processo de transformação foram utilizados 2 µL de ligação (b) para 50 µL de uma solução de células competentes fornecidas pelo Kit CopyControl[™] BAC Cloning Epicentre – Biotechnologies, de acordo com Peterson, *et al* (2000), modificado. A figura 3 apresenta o mapa do vetor utilizado. Os parâmetros utilizados foram: Voltagem 330 v, Low 100, High Infinito, Capacitância 25 µF. Para cada cubeta de transformação foram adicionados 1 mL de SOC (20 g triptona, 5 g de extrato de levedura, 0.5 g de NaCl, 950 mL de H₂O destilada). A reação foi incubada por 1h a 37°C sob leve agitação. Fez-se o plaqueamento de 100 µL de amostra em meio CG (Circle Grow, MP Biomedicals, LLC) (40 g CG, 1 L H₂O destilada) acrescido de IPTG (2 mL de IPTG, 8 mL de H₂O destilada) e XGAL (20 mg/mL) e antibiótico cloranfenicol (50 mg/mL - 1,25 µL em 5 mL de meio CG). Para o inserto controle foram utilizadas placas contendo somente meio CG. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após o plaqueamento e crescimento das colônias de bactéria, foi realizada a seleção das colônias azuis (sem inserto) e brancas (com inserto).



Figura 6- A. Mapa do velor poor poor boor m dunzado na dionagem dos magmentos. D. Representação dos múltiplos sítios de restrição do vetor. O sítio de restrição *Hin*dIII foi utilizado para a construção da biblioteca genômica

3.2.6 Estimativa do tamanho dos insertos - Minipreparação de BACs por Kit Marcherey-Nagel 740618.24

Para esta etapa foi adicionado 1,2 mL de meio de cultura Circle Grow (4 g de CG em 100 mL de água destilada), em cada poço, das placas de cultura fornecidas pelo kit. O repique das colônias foi realizado com auxilio de um carimbo repicador (para placas de 96 poços). Para o crescimento, a placa foi incubada a 37°C, sob agitação de 240 rpm por 18h. Posteriormente submetida à centrifugação por 20 min a 2200 rpm. O sobrenadante foi descartado, a placa invertida sobre papel absorvente para retirada de resíduos de meio e incubada a -20°C por 20min. Adicionou-se 300 µL da solução F1 (fornecida pelo kit), e homogeneizou sob agitação de 650 rpm. Foi adicionado 300 µL da solução F2, a placa foi selada, invertida 6x para homogeneizar e incubada a temperatura ambiente por 4 min. Após a incubação foi adicionado 300 µL da solução F3, a placa foi novamente selada e invertida 6x. Todo o volume da reação foi adicionado a placa filtro e submetido à

centrifugação por 4 min a 1000 rpm. Seguidamente foi adicionado 630 μ L de isopropanol, a placa foi selada, invertida 8x e centrifugada por 1h a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou 500 μ L de etanol gelado (4°C), novamente a placa foi selada e centrifugada por 20 min a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e a placa foi incubada a 37°C por 1h para secagem. Após a secagem foi adicionado 35 μ L de água mili-Q, a placa foi incubada por 30min a temperatura ambiente.

Após a miniprep foi realizado a reação de digestão com enzima *Not*l, no qual o vetor utilizado apresenta sítio de restrição (Figura 4) . Em uma placa de Elisa foi adicionado 15 µL de miniprep e 5 µL do mix de digestão calculado de acordo com o manual do kit (240 µL de tampão10x, 24 µL de BSA 100x, 14 µL de *Not*l, 323 µL de água mili-Q). a placa foi selada e incubada a 37°C por 5h. Para a quantificação do DNA foi preparado um gel de agarose 0,8%, em TBE (0,5x). Foram adicionados 15 µL de digestão juntamente com 5 µL de tampão da amostra. Foi utilizado marcador molecular MindiRange PFG Marker (BioRad) nas extremidades do gel. O DNA foi separado em eletroforese de campo pulsado a 6v/cm por 16h, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.2.7 Seleção das colônias recombinantes e estoque da biblioteca

Após o plaqueamento, crescimento das colônias e estimativa do tamanho dos insertos foi realizado a repicagem dos clones em placas de 96 poços fundos contendo 1 mL de meio CG (40 g CG, 1 L H₂O destilada) e antibiótico cloranfenicol (12,5 μg/mL). Em cada placa foram repicadas 96 colônias brancas, com auxilio de palitos estéreis. As placas foram incubadas overnight, a 37°C, e posteriormente estocadas a 4°C(PETERSON et al.; 2002), por 24h para a confirmação das colônias selecionadas. Algumas colônias apresentam a coloração azul tardiamente.

Seguidamente, com auxilio de uma micropipeta multicanal, foi adicionado 115 μ L da colônia crescida em meio CG com antibiótico, *overnight*, juntamente com 85 μ L de Glicerol 60% em placa de estoque. A placa foi selada e estocada a -80°C. Foi realizada duplicata de cada placa para estoque. Cada placa é dividida em colunas

identificadas por números (1 a 12) e linhas identificadas por letras (A-H), com isso, cada clone é facilmente identificado e isolado.

3.3 Amplificação da região conhecida dos loci a e b

3.3.1 Extração do DNA Total

Foram utilizados como inóculos, as colônias leveduriformes (haplóides) separadas para os dois tipos sexuais do sistema de incompatibilidade sexual do mating type, crescidas em meio líquido YEDP (1% de extrato de levedura, 1% de peptona de soja, 2% de glicose), em incubadora sob agitação de 300 rpm, a 28 °C, por 24 h. As células leveduriformes crescidas foram transferidas para um tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugado por 15 min a 8500 rpm (3x, totalizando 150 ml por Falcon). O sobrenadante foi descartado, o pellet incubado a -80 °C por 2h e liofilizado por 24h. Após a liofilização o pellet foi pesado e em seguida foi macerado em cadinho com auxílio de pistilo. Foi adicionado 15 mL de solução de lise previamente preparada (0,06 M de EDTA 0,5 M, 400mM de Tris-HCl 1 M, 1% de SDS a 10%, 1 M de NaCl a 5 M, H₂O mili-Q) e homogeneizado com auxílio do pistilo, em seguida foi acrescido 2 mL de 2-mercaptoetanol e novamente homogeneizado. Todo conteúdo do cadinho foi transferido para um tubo tipo Falcon, acrescido de 1 volume de fenol saturado, pH 6,6/7,6 (AMRESCO), homogeneizado e centrifugado por 8500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi recuperado em um novo tubo tipo Falcon, acrescido de 1 volume de clorofórmio absoluto, homogeneizado e novamente centrifugado por 15 min a 8500 rpm. O sobrenadante foi recuperado em um novo tubo Falcon, acrescido 1/2 volume de fenol, 1/2 volume de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado por 15 min a 8500 rpm. Novamente a fração superior foi recuperada em um novo tubo tipo Falcon, e adicionado 1 volume de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi recuperado, acrescido de 2,5 volumes de etanol absoluto a 4 ºC e centrifugado por 6 min a 8500 rpm. O sobrenadante foi descartado, acrescido 5 mL de etanol 70% gelado, centrifugar por 4 min a 8500 rpm. O sobrenadante novamente foi descartado e o centrifugado incubado a temperatura ambiente para secagem por 1h 30min. O pellet foi ressuspendido em 300 µL de TE. Para o tratamento com RNAse foi adicionado 4 µL

da enzima e incubado a 37 °C overnight, seguido de 15 min a 45 °C. A quantificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 2h a 50 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

Para a purificação do DNA extraído foi realizado a limpeza com CTAB (*hexadecyltrimethylammonium bromide*), no qual 300 μ L de produto da extração foi adicionado 150 μ L de NaCl 5M, 120 μ L de CTAB 10% em NaCl 1M, homogeneizado por inversão e incubado por 10 min a 65 °C. Foi acrescido 900 μ L de clorofórmio, centrifugado por 5 min a 1200 rpm. O sobrenadante foi recuperado, adicionado 1 volume de isopropanol absoluto gelado e centrifugado por 10 min a 12000 rpm. O pellet foi lavado duas vezes com 500 mL de etanol 70% gelado, centrifugado por 5 min a 12000 rpm e ressuspendido em 80 μ L de TE. A quantificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 2h a 50 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.3.2 Amplificação do locus a

O DNA extraído foi utilizado como molde na reação de PCR, para a amplificação da região conhecida do locus a. Os primers utilizados foram desenhados com auxilio da plataforma CLC Genomic Workbench v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, Dinamarca), (SSC39A "foward" 5'-AGATCGGGAAGAAAATG-AGC-3 e SSC39A "reverse" 5'- TTGTATCATCGTGGGTCTCTGG-3') O PCR foi realizado em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) e consistia em 2,5 µL de Buffer Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,5 µL de solução de 10 mM contendo uma mistura de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2 µL de solução a 25mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1 µL de solução de cada primers a 10 µM, 0,3 µL equivalente a 1 unidade de Taq polimerase (Fermentas), 48 ng de DNA extraído e 13,7 µL de água livre de nuclease. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C/ 30s, 45 ciclos de anelamento à 55°C/30s, 45 ciclos de extensão a 72°C/45s e um ciclo final de 72º/7min. A visualização foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 90 min a 40 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.3.3 Amplificação do locus b

O DNA extraído foi utilizado como molde na reação de PCR, para a amplificação da região conhecida do locus b. Os primers utilizados foram desenhados por Daniel Prezotto Longatto processo FAPESP, 2010/19119-0 (IC), com base na sequência amplificada pelos primers descritos por Albert e Schenck (1996). (Usi bE "foward" 5'-GCTGGTCCAACATTCTCC-3' e Usi bE "reverse" 5'-CGCTTGCTCTCTGCTTAG-3'). O PCR foi realizado em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) e consistia em 2,5 µL de Buffer Tag DNA polimerase (Fermentas), 0,5 µL de solução de 10 mM contendo uma mistura de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2 µL de solução a 25mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1 µL de solução de cada primers a 10 µM, 0,3 µL equilavelente a 1 unidade de Taq polimerase (Fermentas), 48 ng de DNA extraído e 13,7 µL de água livre de nuclease. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C/ 30s, 45 ciclos de anelamento à 55°C/30s, 45 ciclos de extensão a 72°C/45s e um ciclo final de 72º/7min. A visualização foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 90 min a 40 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.4 Seleção dos BACs

3.4.1 Pool de Placas

Para a seleção dos BACs que contém os genes de interesse, primeiramente foi realizado um pool de placas, onde foi adicionado em placas recipientes 20 ml de meio GC (40 g CG, 1 L H₂O destilada), Glicerol 6% com acréscimo de cloranfenicol (12,5 µg/mL). Com o auxílio de um repicador estéril, as colônias da placa de origem foram repicadas nas placas recipientes. Foi feito um pool para cada placa da biblioteca genômica do fungo. As placas seladas foram incubadas por 22h a 37 °C sobre agitação constante de 40 rpm. Para o estoque em -80°C, as placas foram centrifugadas por 2 min a 900 rpm, a amostra crescida em meio homogeneizada com auxílio de uma pipeta, e transferidos 2 ml para tubos criogênicos devidamente identificados.

3.4.2 Amplificação com enzima Phi 29

A amplificação com a enzima Phi 29 (GenomiPhi®, Amersham Biosciences), foi realizada em uma placa de 96 poços, onde adicionou-se 9 µL de *sample buffer* acrescidos de 1 µL de cultura (Pool). Nos poços controles o positivo foi adicionado 9µL de buffer mais o 1 µL controle, o negativo foi adicionado somente 9 µL de buffer. Após a selagem da placa, foi realizada a desnaturação das amostras em termociclador Veriti 96-Well Cyrcle (Applied Biosystems) a 95 °C por 5 min, e seguidamente incubadas em gelo. A placa foi centrifugada por 10 s a 1500 rpm e adicionou-se em todos os poços (incluindo os controles) 9 µL de *reaction buffer* acrescido de 1 µL de enzima Phi 29. Uma nova centrifugação foi realizada por 1 min a 1500 rpm seguida de incubação em termociclador por 2h a 37 °C. A inativação da enzima foi feita por incubação em termociclador por 10 min a 65 °C. Para a verificação do produto da amplificação foi separado por eletroforese, onde foi aplicado 1µL de amostra em gel de agarose 1% em TAE 1x, por 2 h a 30 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.4.3 Seleção dos BACs

Primeiramente, foram selecionadas as placas que continham os BACs de interesse. As reações de qPCR em tempo real foram realizadas em termociclador 7500 FAST (Applied Biosystems) usando o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante. Os primers utilizados foram desenhados para o locus b por Daniel Prezotto Longatto processo FAPESP, 2010/19119-0 (IC), com base na sequência amplificada pelos primers descritos Albert Schenck (1996). (Usi bE "foward" 5'por е GCTGGTCCAACATTCTCC-3' e Usi bE "reverse" 5'- CGCTTGCTCTGCTTAG-3') e os primers desenhados para o locus a com auxilio da plataforma CLC Genomic Dinamarca), (SSC39A "foward" 5'-Workbench v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, AGATCGGGAAGAAAATG-AGC-3 SSC39A 5'е "reverse" TTGTATCATCGTGGGTCTCTGG-3'). As reações consistiram de 6,25 µL de tampão de amplificação SuperMix, 0,5 µL de solução de 10 µM de cada primer, 0,25 µL de solução de 25 µM da referência interna de fluorescência ROX, 4 µL de água livre de nuclease e 1 µL de DNA diluído na proporção de 1/400. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de desnaturação à 95°C/ 20s, 45 ciclos de anelamento à 55°C/15s e 45 ciclos de extensão a 72°C/30s. A curva de dissociação foi calculada de acordo com os parâmetros default do equipamento. Para confirmação da identidade dos fragmentos gerados nas reações de qPCR, os produtos do qPCr foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 5 h a 60 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

Após a seleção da placa, foram realizadas as reações de PCR para cada um dos 96 BAC contidos nas placas selecionadas tanto para o *locus* a quanto para o *locus* b. As reações foram feitas em termociclador Veriti 96-Well Cyrcle (Applied Biosystems), e consistiram em 2,5 μ L de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), 0,5 μ L de solução de 10 mM contendo uma mistura de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2 μ L de solução a 25mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) , 1 μ L de solução de cada *primer (loci a e b)* a 10 μ M, 0,3 μ L equilavelente a 1 unidade de *Taq* polimerase (Fermentas), 1 μ L do BAC de cada BAC e 17,7 μ L de água livre de nuclease. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial a 94°C por 8 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94°C/30s, 45 ciclos de anelamento à 55°C/30s, 45 ciclos de extensão a 72°C/45s e um ciclo final de 72°/7min. Para confirmação da identidade dos fragmentos gerados nas reações de PCR, os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 5 h a 60 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.4.4 Indução e Purificação dos clones em BAC selecionados

Após selecionado os BACs de interesse, foi realizada a indução, ou seja, acionar a replicação do BAC recombinante na célula hospedeira, seguindo protocolo do kit CopyControl[™] BAC Cloning (Epicentre-Biotechnologies). Para essa etapa as placas selecionadas foram parcialmente descongeladas e com auxilio de uma alça de platina, os BACs de interesse,dos dois lócus a e b, foram estriados em placas de petri contendo meio sólido CG (40g/L) acrescido de antibiótico Cloranfenicol (12,5 µg/mL).As placas foram incubadas por 20h a 37°C. Após o crescimento, uma colônia de cada BAC selecionado, foi inoculada em 5mL de meio CG líquido acrescido de

cloranfenicol, com auxílio de palito estéril. Em seguida, novamente incubada por 16h a 37°C sobre 200 rpm de agitação constante. 5 mL da cultura crescida foi adicionada em 45 mL de meio de cultura líquido CG com cloranfenicol e acrescidos 50 µL de Solução de indução do kit (CopyControl Induction Solution). A amostra foi incubada por 5h a 37°C sobre agitação constante de 200rpm.

Para a purificação do DNA foi utilizado o kit BACMAXTM DNA Purification (Epicentre-Biotechnologies). Em tubos tipo Falcon (50mL), foi transferido 40 mL de cada cultura induzida. As células foram centrifugadas a 900 g por 40 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 6 mL de solução 1 do kit, sob agitação (vortex) até a ressuspensão total do centrifugado. Em seguida foi acrescido 6 mL de solução 2 do Kit, e homogeneizado gentilmente por inversão 3x. Foi adicionado 4,5 mL da solução 3 do Kit e novamente foi homogeneizado por inversão 3x e incubado em gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 8500 g por 40 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo Falcon. Para a precipitação do DNA foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, homogeneizado por inversão de 6x, centrifugado a 8.500 g por 40 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os pellets foram secos a temperatura ambiente por 5 min e ressuspendidos em 500 µL de TE Buffer do kit. Foi adicionado 18 µL de RiboShredder RNAse Blend, incubado a 37 °C por 30 min e acrescido mais 500 µL de TE Buffer. Foi adicionado 1 mL de solução 4 do Kit, homogeneizado e incubado em gelo por 15 min, seguido de centrifugação por 40 min a 8.500 g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon, acrescido 4 mL de etanol absoluto gelado e homogeneizado por inversão 6x. Novamente foi centrifugado por 40 min a 8.500 g a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os pellets foram secos a temperatura ambiente por 5 min, ressuspendidos em 200 µL de TE Buffer do kit e incubados overnight a 4 °C. A quantificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5x, por 2 h a 50 mA, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.5 Hibridização: confirmação do sistema bipolar de mating type

3.5.1 Extração do DNA Genômico total e separação dos cromossomos

Foram extraídas amostras de DNA genômico de alto peso molecular dos isolados Ssc11, Ssc31 e Ssc39 a partir de culturas leveduriformes haplóides como descrito no item 3.2.1. Os *plugs* obtidos foram submetidos à corrida em gel de agarose 0,8% (140 ml TBE 0,5 x, 1,12 g de agarose) em eletroforese de campo pulsado (Biorad CHEF-DR III) para separação dos cromossomos, utilizando os seguintes parâmetros: foram cinco blocos totais, seguidos, de corrida a 12 °C, Bloco1, voltagem 1,5 v/cm, P_{inicial} 3600s, P_{final} 3600s e tempo de corrida 24h; Bloco 2, voltagem 1,8 v/cm, P_{inicial} 1900s, P_{final} 900s e tempo de corrida 28h; Bloco 3, voltagem 3,7 v/cm, P_{inicial} 1900s, P_{final} 900s e tempo de corrida 28h; Bloco 4, voltagem 3 v/cm, P_{inicial} 900s, P_{final} 480s e tempo de corrida 24h; Bloco 5, voltagem 3 v/cm, P_{inicial} 420s e tempo de corrida 23h (NUNES, et al, 2011). O gel foi corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.5.2 Preparo da Membrana – Transferência Alcalina

O gel de agarose do cariótipo eletroforético dos isolados de *S. scitamineum*, conforme descrito no item anterior, foi submetido à depurinação por incubação em 400 mL de solução (HCI 0,25M) por 10 min, sob agitação. Seguidamente, foi realizada a desnaturação com solução desnaturante (NaCl 1M, NaOH 0,5M) por 15 min, sob agitação 2x, e neutralizada (Tris - HCI 0,5 M; NaCl 1,5M, pH 7,5), por 15 min sob agitação 2x. A membrana de náilon foi imersa em solução SSC 5X (20X - NaCl 3M, Citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0). A transferência foi preparada colocando-se o gel em uma placa de vidro. Sobre o gel foi colocada à membrana de náilon umificada (HYBOND- N+ - Amersham) e papéis de filtro. A transferência transcorreu por um período de 12 h. Imediatamente o DNA foi fixado à membrana com UV-crosslinker (Hoefer UVC 500) e armazenado a temperatura ambiente.

3.5.3 Obtenção do DNA para preparo das sondas

O DNA total utilizado no preparo das sondas foi extraído do isolado Ssc39, conforme descrito no item 3.3.1. Isolaram-se sequências dos *locus* a e b (via PCR) que apresentaram um padrão claro de amplificação, bastante DNA e bandas únicas. Para tal, uma amostra do DNA total foi utilizada como template para amplificação dos fragmentos específicos para cada par de primers. As reações continham cerca de 100 ng de DNA genômico, 1x de tampão de PCR; 1,5 mM MgCl₂: 10 mM de cada dNTPS; 0,4 µM de cada primers; 1 U de Taq DNA polimerase e água ultra-pura para o volume final de 12,5 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Apllied Biosystems), utilizando-se o seguinte programa: um ciclo inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 s, 35 ciclos de anelamento à 55 °C por 30 s, 35 ciclos de extensão a 72 °C por 45 s e um ciclo final de 72 °C por 7 min. As amostras foram purificadas utilizando os procedimentos do kit QIAquick 96 PCR Purification KIT (Qiagen). A visualização das amplificações foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x, por 90 min a 30 v, corado em brometo de etídeo e fotografado sob ação de luz UV em fotodocumentador ImageQuant 300 (GE).

3.5.4 Preparo das sondas

As marcações das sondas foram realizadas segundo o protocolo do kit Gene Images[™] AlkPhos Direct[™] Labelling and Detection System (GE Healthcare). Foi utilizado 10 ng de DNA para cada sonda. Inicialmente o DNA foi desnaturado durante 10min. A 95°C e resfriado imediatamente em gelo por 5min, e em seguida, centrifugado brevemente. Ao tubo que contém o DNA foi adicionado 10 µL do buffer de reação, 2 µL do reagente da sonda e 10 µL da solução de trabalho do *cross-linker* e homogeneizado gentilmente. A reação foi incubada por 30 min. A 37°C e em seguida colocada em gelo.

3.5.5 Preparo das membranas, pré-hibridização e hibridização

Antes do inicio da hibridização, as membranas foram incubadas, em garrafas de hibridização, contendo 50 µL da solução de pré-hibridização (0,5 M NaCl, 4% (w/v) reagente bloqueador e tampão de hibridização) por cm² de membrana e levada ao forno a 55 °C, em rotação por período 2 h. Seguindo o protocolo do kit AlkPhos Direct Labelling Reagents - Amersham, (GE Healthcare). As hibridizações foram realizadas, overnight, sob-rotação, em forno de hibridização a 55º. As membranas foram lavadas 2x, por 10min, a 55^aC com primeiro tampão de lavagem (2 M Uréia, 0,1 % SDS, 50 mM Fosfato de Sódio, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2% Blocking reagente) seguida de duas lavagem a temperatura ambiente por 5 min., com segundo tampão de lavagem (1M tris-base, 2M NaCl). Finalmente as membranas foram envoltas em filme plástico e colocadas em cassete de exposição, juntamente com um filme de revelação (Kodak). Este filme ficou exposto sob a membrana pelo tempo de 4 h para sua impressão. A revelação do filme foi feita em suporte de revelação em sala escura, utilizando-se revelador e fixador (Kodak). Para isso, o filme foi mantido no revelador por 3 min, na água por 2 min para lavagem, no fixador por 5 min e novamente na água por 2 min. O filme foi finalmente colocado para secar.

3.6 Sequenciamento

3.6.1 Sequenciamento das extremidades do inserto clonado em BAC

Os BACs purificados foram enviados para sequenciamento das extremidades no Departamento de Botânica, laboratório GaTE-LBMP, Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, USP/SP, pelo método *Sanger*, utilizando o equipamento ABI3300 (Applied Biosystems) e o *primer* específico para o vetor utilizado na construção da biblioteca genômica (Foward 5' GGATGTGCTGCAAGG CGATTAAGTTGG 3' e Reverse 5' CTCGTATGTTGTGTGGGAATTGTGAGC 3').

3.6.2 Sequenciamento completo do genoma do fungo Sporisorium scitamineum

O sequenciamento do genoma do fungo *S. scitamineum* foi realizado em um equipamento Illimina HiScan, no Departamento de Zootecnia, Laboratório de Biotecnologia Animal, Prof. Dr Luiz Lehmann Coutinho da ESALQ/USP.

As amostras a serem sequenciadas foram preparadas utilizando o DNA total extraído do isolado ssc39 leveduriforme negativo e pré-preparado de acordo com o protocolo do kit Nextera DNA Sample Preparation Workflow.

3.6.3 Pré-processamento montagem das sequências

Todas as sequências obtidas no presente trabalho foram submetidas a um processo de limpeza visando avaliar a qualidade das sequências, mascarar vetores e *primers*, aparar pontas de baixa qualidade, e realizar uma filtragem por tamanho e por contaminantes.

O processamento das sequências oriundas do sequenciamento dos BACs foi realizada utilizando a plataforma *CLC Genomic Workbench* v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, Dinamarca). Primeiramente foi realizado o processamento das sequências, visando avaliar a qualidade das bases. O pré-processamento também eliminou as sequencias de vetores contidos nos BACs.

O pré processamento do sequenciamento do genoma completo do fungo foi realizado com a contribuição com o Genomics Group, coordenado pela Profa. Claudia Barros Monteiro Vitorello, e em parceria com o Dr^o João Paulo Kitajima, diretor de Bioinformática da Mendelics Analise Genomica.

Para a montagem preliminar do genoma, os *reads* obtidos foram pareados (*paired-end*), 100 pb de cada lado do fragmento sequenciado. Estas sequências foram então alinhadas contra a mitocôndria do genoma do fungo *S. reilianum* e removidos do conjunto inicial. Essa etapa foi necessária para que o programa utilizado para a montagem, no caso o *SOAP-deNovo*, tivesse os melhores resultados considerando número de *scaffolds* e valor de N50 da montagem.

3.6.4 Anotação

Por anotação, entende-se ser um processo múltiplo, pelo qual uma ou mais sequências brutas de DNA ou de aminoácidos são analisadas visando à atribuição de informações biológicas, ou seja, suas funções (STEIN, 2001).

Para a identificação e anotação das sequências visou a busca de genes do tipo de relação sexual, para tal foi utilizado o programa *Augustus* com o modelo para a predição dos genes descritos para *U. maydis* (Figura 7).



Figura 7- Fluxograma das etapas de processamento de pré-anotação e anotação de genes de mating type em S. scitamineum

3.6.5 Analises comparativas entre os genes de *mating type* de *S. scitamineum* e demais fungos causadores de carvão em gramíneas

As análises comparativas entre a posição dos genes de *mating type* dos *locus* a e b de *S. scitamineum* foram realizadas utilizando as sequências dos genes do *mating type* dos fungos *U. maydis, U. hordei* e *S. reilianum*, depositadas no GenBank. As sequências foram e caracterizadas com auxilio do software GenePallet.

Para a comparação de similaridade foi realizada análise de filogenia específica dos genes de *mating type* comparando para o *locus* a o gene receptor de feromônio

(*pra*) e para o *locus* b os genes bE e bW. A análise foi realizada por Maximo verosemelhança com a utilização do software Mega v5.05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção da biblioteca genômica em vetores do tipo BAC

4.1.1 Extração de DNA de alto peso molecular

A construção das bibliotecas genômicas com fragmentos de alto peso molecular de DNA é fundamental, como suporte para projetos de sequenciamento, pesquisas em genômica estrutural, regulação e interação gênica, além da identificação de promotores, genes e clusters de genes de interesse. Vetores do tipo BAC têm sido a opção preferencial para construções destas bibliotecas, pois permitem a inserção e clonagem de fragmentos de DNA de 80 a 250 Kpb (ZHANG e WING, 1996; SHIZUYA et al., 1992). Os BACs apresentam uma série de vantagens, como a estabilidade dos clones, o baixo quimerismo e uma melhor eficiência de transformação (FRIJTERS et al., 1997).

Um dos desafios da construção desse tipo de biblioteca é a o isolamento de DNA de alto peso molecular (HWM – *Hight Molecular Weigh DNA*). Protocolos convencionais de extração de DNA promovem quebras no DNA em pequenos fragmentos, tornando inviável sua utilização considerando a capacidade dos vetores BACs carregarem grandes insertos.

Um dos principais problemas encontrados na tentativa de se isolar o DNA nuclear de fungos, consiste na remoção da parede celular, por ação de enzimas líticas, para a formação de protoplastos, um processo que evita a quebra do DNA em pequenos fragmentos. A protoplastização é um procedimento bem estabelecido em fungos filamentosos e leveduriformes (PEBERDY et al., 1989). Os protoplastos, células artificialmente desprovidas de parede, foram inicialmente explorados em estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos além de constituir ferramentas biológicas importantes para a manipulação genética de fungos. Eles são requeridos para a fusão somática de indivíduos pertencentes a gêneros ou espécies distintas, para a determinação do núcleo e/ou tamanho de cromossomos e para a localização de genes específicos em cromossomos por meio de PFGE, eletroforese de campo pulsado (PEBERDY et al., 1989), além disso os protoplastos tem grande importância em métodos de transformação genética (SCHIESTL et al., 1991).

Usualmente, a remoção da parede celular ocorre pela ação de enzimas líticas,

em meio osmoticamente balanceado. Além da espécie fúngica e do tipo de células utilizadas, a formação de protoplastos depende de fatores como, composição do meio nutritivo, estado fisiológico da cultura, tipo e concentração da enzima lítica, tempo de digestão, pH e temperatura do sistema. Após o isolamento, quando em meio nutritivo apropriado, os protoplastos são capazes de regenerar a parece celular. Contudo, as taxas de regeneração e reversão variam de organismo para organismo, geralmente não atingindo 100% (AGUIAR, 1991).

Para a extração do DNA de alto peso molecular foi necessária à utilização de um protocolo adequado para evitar a quebra do DNA em pequenos fragmentos. O DNA foi isolado de células recém-crescidas, que consistem de uma parede celular menos vigorosa, e foi mantido em *plugs* de agarose. Os *plugs* foram incubados em tampão contendo proteinase para a digestão de proteínas e lipídeos presentes. Todo o protocolo foi realizado utilizando ponteiras com pontas cortadas a fim de minimizar a quebra mecânica ao longo da sua manipulação. O resultado obtido foram *plugs* contendo DNA de alto peso molecular e de qualidade conforme observado nas figuras 8 e 9.

A ampliação da variabilidade genética para a grande maioria dos seres vivos ocorre através da reprodução sexual (CARLILE *et al.*, 2001). Em áreas de encontro das colônias, de um mesmo isolado ou entre diferentes isolados, podem ser verificadas a ocorrência de compatibilidade sexual (reprodução sexual) e compatibilidade ou incompatibilidade vegetativa (GLASS *et al.*, 2000). Anastomoses de hifas permitem a troca do conteúdo celular entre indivíduos diferentes, sendo este evento requerido nas reações de compatibilidade, início da reprodução sexual e formação de heterocarions (GLASS *et al.*, 2000; HICKEY *et al.*, 2002).

Pareamentos de colônias, entre isolados de *S. scitamineum* foram realizados por Longatto, et al (2013) e entre os diferentes isolados foram determinados os recombinantes, sendo estabelecida a nomenclatura de positivo (+) e negativo (-) para cada tipo de compatibilidade sexual dentro de cada um dos diferentes isolados. Para a extração do DNA de alto peso molecular para a construção da biblioteca genômica foi utilizado o isolado Ssc39 do tipo de compatibilidade positivo.



Figura 8- Plugs de agarose contendo o DNA de alto peso molecular



Figura 9- Foto do DNA de alto peso molecular de S. scitamineum (linha 2) em gel de agarose 1% e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12ºC, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h. Coluna 1, Marcador de peso molecular 225 – 2200 Kpb (Sigma)

4.1.2 Digestão do DNA com HindIII e seleção dos fragmentos de interesse

Após a extração do DNA, a construção da biblioteca de BACs requer a clivagem do DNA em fragmentos de elevado peso molecular por ação de enzimas de restrição. Nesta etapa foram selecionados fragmentos entre 100 a 250 Kpb e para sua obtenção, o DNA foi submetido à digestão parcial. Para a digestão, primeiramente os plugs foram submetidos a clivagem mecânica com auxílio de uma lamínula de vidro estéril, visando aumentar a superfície de contato do HMW com a enzima de restrição.

O padrão utilizado para a digestão parcial do DNA com a enzima *Hin*dIII que apresentou fragmentos de tamanho de interesse foi de10 U, submetido ao banho seco à 37°C por 2 min. Uma pequena degradação de DNA foi observada no *plug* controle (uncut – sem enzima de restrição) como podemos observar na Figura 10.



Figura 10- Foto do DNA de alto peso molecular digerido parcialmente com enzima *Hin*dIII em gel de agarose 1% e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h. Primeira e última coluna, marcadores moleculares 225-2200 Kpb e 200-0,1 Kpb. Na segunda coluna DNA de alto peso molecular sem tratamento com enzima. As demais colunas amostra de Ssc 39 tratadas com enzima. Coluna 1. 10 µL da enzima incubada a 2 min. Coluna 2. 10 µL da enzima incubada a 15 min. Coluna 4. 5 µL da enzima incubada a 10 min. Coluna 5. 5 µL da enzima incubada a 10 min. Coluna 6. 5 µL da enzima incubada a 15 min

Cada enzima reconhece sítios de restrição que são distribuídos em diferentes frequências nos genomas dos organismos, portanto o uso de uma enzima de restrição adequada, em concentrações ideais é um ponto chave na fragmentação do DNA para a seleção de fragmentos de interesse (LEWIN et al., 2007).

Uma vez estabelecido o padrão de digestão do DNA com *Hind*III, foi realizada a separação dos fragmentos em eletroforese de campo pulsado de 8 *plugs* contendo

DNA parcialmente digeridos, e a seleção dos fragmentos por tamanho. São recomendados dois ciclos de seleção para a obtenção dos fragmentos de tamanhos maiores, uma vez que o segundo ciclo de seleção elimina pequenos fragmentos que podem estar presentes entre os fragmentos da primeira seleção (NAKAMURA et al., 1997).

O resultado da primeira seleção foi satisfatório, eliminando grande quantidade de fragmentos de DNA menores que 100 kpb e maiores que 300kpb (Figura 11).



Figura 11- Foto do DNA de alto peso molecular digerido parcialmente com enzima *Hin*dIII em gel de agarose 1%, parcialmente reconstruído e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h para primeira seleção de tamanho dos fragmentos . Primeira e última coluna, marcadores moleculares 225-2200 Kpb e 200-0,1 Kpb. Na segunda coluna DNA de alto peso molecular sem tratamento com enzima. Colunas numeradas de 1 a 8, DNA parcialmente digerido nas condições 10 μL da enzima incubada a 2 min. A porção do gel não visível continha fragmentos de 100 a 300 kpb

Três blocos de agarose contendo o DNA de alto peso molecular de tamanho selecionado foram retirados do gel e então sujeitos a segunda seleção (Figura 12).



Figura 12- Foto do DNA de alto peso molecular digerido parcialmente com enzima *Hin*dIII em gel de agarose 1%, parcialmente reconstruído e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12°C, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 18h para segunda seleção de tamanho dos fragmentos. As colunas 1, 3, 5 e 7 marcadores moleculares 225-2200 Kpb e 200-0,1 Kpb. Nas colunas 2, 4 e 6 fragmentos da primeira seleção. A porção do gel não visível continha fragmentos de 100 a 300 kpb

Esses procedimentos permitiram a otimização da seleção de fragmentos grandes (entre 100-300kpb) para a construção de uma biblioteca de grandes insertos.

A divisão do bloco retirado da primeira seleção foi feita verticalmente, gerando três blocos idênticos (100-300 kpb). Segundo Peterson (2002), para melhor seleção dos tamanhos dos fragmentos de DNA de alto peso molecular, essa divisão deve ser realizada horizontalmente, resultando em três blocos com tamanhos dos fragmentos diferentes (Bloco I, fragmentos menores, Bloco II, fragmentos medianos, Bloco III fragmentos maiores). A influência desse procedimento na construção da biblioteca será discutida nos próximos itens.

A opção pela extração do DNA com utilização da técnica de eletroeluição resultou em boas concentrações nos isolamento das amostras B e C (2 ng/µL e 1 ng/µL), e baixa concentração no isolamento do bloco A (0,5 ng/µL) (Figura 13). Esta baixa concentração observada pode ser resultado de possíveis erros durante a recuperação do DNA de alto peso molecular, uma vez que havia alta concentração de DNA nesse bloco, como observado nas figuras anteriores.



Figura 13- Foto em gel de agarose 0,8% da quantificação do DNA eluido (A, B, C) por comparação com marcador lambda (Colunas 1 a 8 e 12 com respectivamente 5,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 50 ng/µL) e corrido em eletroforese nas seguintes condições: 45 mA por 1 h. A seta vermelha indica a quantificação da amostra, eluída do bloco B, utilizada nas etapas subsequentes da construção da biblioteca

4.1.3 Estimativa do tamanho dos insertos e seleção dos recombinantes

Posteriormente as etapas de extração e quantificação do DNA, foram realizadas a ligação e a transformação. As amostras B e C apresentaram alta eficiência de transformação. As placas que continham o inserto controle cresceram conforme o esperado (acima de 95% de eficiência de acordo com o protocolo Epicentre – Biotechnologies). A baixa quantidade de DNA de alto peso molecular observada no bloco A resultou em uma baixa eficiência de transformação, o que acarretou a não utilização desse DNA nas etapas subsequentes da construção da biblioteca. Os blocos B e C, apesar de ambos apresentarem alta eficiência de transformação, quando comparados, B apresentou maior eficiência que C, portanto esse DNA foi utilizado nas etapas subsequentes da construção da biblioteca.

Mesmo quando a ligação resulta em uma boa quantificação de clones recombinantes, não necessariamente indica que houve uma ligação de boa qualidade para a construção da biblioteca de BACs. Uma biblioteca de boa qualidade necessita ter grandes insertos, com representação adequada do genoma alvo, e uma baixa quantidade de clones "vazios", ou seja, clones de coloração branca, mas que não possuem insertos (ZHANG et al., 2012). Sendo assim, foi essencial a determinação o tamanho dos insertos e a porcentagem de clones "vazios", já que na ligação obtivemos uma alta qualidade de clone com coloração branca.

Foram analisada a estimativa da presença e o tamanho de insertos de 86 clones selecionados aleatoriamente da biblioteca, por restrição com a enzima *Not*l. Nessa amostra o número de clones sem inserto ou amostras sem vetor+inserto foi igual a 5 (5,8%) (Figura 14). A maior parte das bibliotecas de BACs publicadas possui uma frequência de clones "vazios" menores que 5%, embora existam relatos de bibliotecas com frequências de 10% (COYNE et al., 2007)



Figura 14- Foto da estimativa do tamanho do inserto em BAC da biblioteca em gel de agarose 0,8% e eletroforese de campo pulsado nas seguintes condições: 12ºC, voltagem 6v/cm, P_{inicial} 1s, P_{final} 40s e tempo de corrida 16h. Nas extremidades do gel, marcadores moleculares MindiRange PFG Marker (BioRad). Nas demais colunas, BACs após a digestão com enzima *Not*I, para visualização do tamanho dos insertos. As setas indicam os clones sem insertos ou ausência dos mesmos

A distribuição do tamanho dos insertos mostraram que 50% dos clones apresentaram insertos de tamanho maior que 90 Kpb, e que 12,8% dos clones apresentaram insertos de tamanho menor que 50 Kb (Figura 15). O valor médio dos insertos foi de 90 kb, sendo o valor apresentado dentro do esperado, porém os fragmentos mostraram-se bem heterogênios (15 – 165 Kb), devido ao modo de divisão do bloco da seleção I, porém essa heterogeneidade dos fragmentos não compromete o desenvolvimento do presente trabalho, indicando que os cuidados tomados ao longo da construção de uma biblioteca de *S. scitamineum* para evitar a quebra do DNA de alto peso molecular e seleção dos fragmentos foram eficientes.



Figura 15- Distribuição do tamanho dos insertos na biblioteca genômica em vetor tipo BAC de S. scitamineum

O tamanho do genoma do fungo *S. scitamineum* foi estimado por Filipe Rafael Salvetti Nunes processo FAPESP, 2011/03865-7 (TT1), 19° SIICUSP (2011), em, aproximadamente, 20 Mpb distribuídos em 20 cromossomos, variando de menos de 100 a mais de 2200 Kpb. Observando essa estimativa seriam necessários 223 clones, com inserto de tamanho igual a 90 Kpb, para a clonagem de todo o genoma. Consideram a média de insertos em BACs (90 Kpb), foram selecionadas e repicadas 2880 colônias dispostas em 30 placas de 96 poços (um clone por poço), individualmente identificadas, totalizando uma cobertura de mais de 10x o genoma do fungo.

4.1.4 Seleção dos BACs

Para a identificação e amplificação da região do mating type de S. scitamineum 5'-Usi bE foram utilizados os primers para 0 locus b "foward" GCTGGTCCAACATTCTCC-3' e Usi bE "reverse" 5'- CGCTTGCTCTCTGCTTAG-3', e para o locus a (SSC39A "foward" 5'-AGATCGGGAAGAAAATG-AGC-3´ e SSC39A "reverse" 5'-TTGTATCATCGTGGGTCTCTGG-3') conforme descritos na metodologia nos item 3.3.2 e 3.3.3. Os primers estão posicionados como mostra a figura 16, e permitem a amplificação da região das regiões de interesse. A figura 17 representa a foto de eletroforese em gel de agarose 0,8% feita com o DNA total extraído resultante das amplificações (PCR).



Figura 16- Posição dos *primers* (indicados pelas setas vermelhas). A. locus a SSC39A(+) "foward" 5'-AGATCGGGAAGAAAATG-AGC-3' e SSC39A(+) "reverse" 5'- TTGTATCATCGTGGGTCT CTGG-3' no gene pra1 (representado na seta azul) do *mating type* do *locus* a e B. Usi bE "foward" 5'-GCTGGTCCAACATTCTCC-3' e Usi bE "reverse" 5'- CGCTTGCTCTCTGCT TAG-3' no gene bE (representado na seta azul) do *mating type* do *locus* b de S. *scitamineum*



Figura 17- Eletroforese em gel de agarose 0,8% da reação de amplificação do DNA total extraído com os primers A. Primers para o locus a SSC39A "foward" 5'-AGATCGGGAAGAAAATG-AGC-3' e SSC39A "reverse" 5'- TTGTATCATCGTGGGTCTCTGG-3' e em B. Usi bE "foward" 5'-GCTGGTCCAACATTCTCC-3' e Usi bE "reverse" 5'- CGCTTGCTCTCTGC TTAG-3' nas seguintes condições: 1h30h a 80v

O par de *primers* utilizado para a amplificação do *locus* b foi desenhado por Daniel Prezotto Longatto processo FAPESP, 2010/19119-0 (IC), com base na sequência amplificada pelos *primers* descritos por *Albert e Schenck* (1996). O par de *primers* utilizado para a amplificação do *locus* a foi desenhado com base no gene PR, gene com função conhecida de receptor de ferormônio, pois segundo Kellner, et al (2011) há um elevado grau de sintênia entre o gene receptor de feromônio PR de espécies diferentes em relação aos genes de feromônios Mfa, bem como o sítio PRe (resposta ao elemento feromônio). Já a organização dos genes que flanqueiam as bordas do locus PR, como exemplo os genes Rba e PanC é menos conservada (será discutido a seguir).

Para a seleção dos BACs de interesse por PCR de pools de placas, foi necessário um agrupamento da biblioteca, envolvendo combinação dos BACs das placas. Essa combinação foi feita de forma que um mínimo de reações de amplificação sejam realizadas para a identificação de um clone específico dentro da biblioteca (GREEN e OLSEN, 1990). A técnica de PCR e o agrupamento dos clones da biblioteca, através dos pools, proporcionaram uma forma rápida de seleção e caracterização da biblioteca, sendo possível encontrar uma única sequência alvo (GARDINER, et al, 2004). O método de seleção dos BACs, através do pool de placas consistiu em duas etapas, primeiramente foi realizado um pool dos BACs de

cada placa, totalizando 30 pools com 96 clones cada, que foram amplificados com a enzima Phi 29 (Figura 18). A enzima Phi29 que faz parte de um kit comercial (genomicPhi®, Amersham Biosciences) é capaz de usar *primers* hexâmeros e suporta a síntese por deslocamento de fita. A atividade de correção de erros da exonuclease 3'→ 5' resulta em DNA amplificado com maior fidelidade quando comparada a Taq DNA polimerase. A Phi 29 também permite a amplificação representativa de todo o genoma (AZEVEDO et al., 2004). A segunda etapa consiste na abertura do pool selecionado, possibilitando através de PCR a identificação do clone de interesse.



1KB1 2 3 4 5 6 7 8 91011 12131415161718192021222324252627282930- C

Figura 18- Eletroforese em gel de agarose 1% nas seguintes condições: por 2h a 30mA, dos 30 *pools* de placas amplificados com a enzima Phi 29. A primiera coluna, marcador molecular 1Kpb, e as duas ultimas colunas as amostra controle (negativo/- e positivo/C)

Para a seleção das placas contendo insertos de interesse optamos pelo qPCR dos pools. Nesta etapa foram selecionadas 5 placas que continham BACs com os insertos de interesse do *locus* a e 6 placas que continham BACs com os insertos de interesse do *locus* b (Figura 19).



Figura 19- Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação por qPCR realizado com os 30 pools de placas nas seguintes condições: por 5h a 60mA. As colunas das extremidades são marcadores moleculares 1 Kpb. Em A. Foram 5 pools amplificados referentes a seleção de insertos de interesse do locus a (Placas 06, 11, 16, 26 e 28) B. Em A. Foram 6 pools amplificados referentes a seleção de insertos de interesse do locus b (Placas, 01, 06, 07,13, 16 e 17)

Após a seleção das placas, o *pool* foi aberto, foram realizados 96 PCR, por placa selecionada, respectivos de cada clone da placa. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1%.

Para o *locus* a foram encontradas 5 clones positivos, amplificados, contendo os insertos de interesse: C-2 (Linha C, Coluna 2) da placa P06; B-3 (Linha B, Coluna 3) da placa P11; D-9 (Linha D, Coluna 9) da placa P16; C-2 (Linha C, Coluna 2) da placa P26; D-9 (Linha D, Coluna 9) da placa P28 (figura 20).



Figura 20- Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação por PCR realizado com os 96 BACs das placas selecionadas da biblioteca genômica em vetor do tipo BAC de S. scitamineum, nas seguintes condições: por 5h a 60mA. As colunas das extremidades são marcadores moleculares 1 Kpb. As primeiras setas de cada imagem em vermelho indicam o clone amplificado contendo o gene do mating type em cada uma das placas submetidas a PCR. A segunda seta em vermelho indica a amplificação do controle (DNA total extraído) A. C-2 (Linha C, Coluna 2) da P06; B. B-3 (Linha B, Coluna 3) da P11; C. D-9 (Linha D, Coluna 9) da P16; D. C-2 (Linha C, Coluna 2) da P26; E. D-9 (Linha D, Coluna 9) da P28

Para o *locus* b foram encontrados 6 clones positivos, amplificados, contendo os insertos de interesse: G-4 (Linha G, Coluna 4) da placa P01; A-8 (Linha A, Coluna 8) da placa P06; D-4 (Linha D, Coluna 4) da placa P07; A-3 (Linha A, Coluna 3) da placa P13; D-9 (Linha D, Coluna 9) da placa P16; D-1 (LinhaD, Coluna 1) da placa P17 (Figura 21).



Figura 21- Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação por PCR realizado com os 96 BACs das placas selecionadas da biblioteca genômica em vetor do tipo BAC de S. scitamineum, nas seguintes condições: por 5h a 60mA. As colunas das extremidades são marcadores moleculares 1 Kpb. As primeiras setas de cada imagem em vermelho indicam o clone amplificado contendo o gene do mating type em cada uma das placas submetidas a PCR. A segunda seta em vermelho indica a amplificação do controle (DNA total extraído) A. G-4 (Linha G, Coluna 4) da P01; B. A-8 (Linha A, Coluna 8) da P06; C. D-4 (Linha D, Coluna 4) da P07; D. A-3 (Linha A, Coluna 3) da P13; E. D-9 (Linha D, Coluna 9) da P16; F. D-1 (Linha D, Coluna 1) da P17

A visualização das demais bandas amplificadas com coloração de baixa intensidade podem representar anelamento inespecífico dos *primers*.

A extração dos insertos dos BACs é feita de forma semelhante à extração de DNA plasmidial, técnica conhecida como *miniprep*, entretanto esse tipo de extração, em geral, é mais difícil pelo fato de apenas uma cópia do BAc estar presente por célula, sendo o rendimento muito menor. Portanto, a utilização de kits comerciais para esse tipo de *miniprep* é bastante conveniente.

Os clones selecionados foram crescidos em meio indutor para a replicação do DNA recombinante e posteriormente para a purificação. O produto foi enviado para sequenciamento das extremidades do inserto (BAC-*ends*).

4.2 Hibridização: confirmação do sistema bipolar de mating type

Em S. scitamineum, a separação dos cromossomos do fungo foi realizada por Nunes, et al (2011), conforme descrito no item 5.5.1, com o uso da técnica de PFGE. A invenção das técnicas de PFGE ("Pulsed Field Gel Electrophoresis"; SCHWARTZ e CANTOR, 1984), OFAGE ("Orthogonal-Field-Alternation Gel Electrophoresis"; CARLE e OLSON, 1984), e variações destes sistemas, nomeadamente CHEF -"Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Gel Electrophoresis" (CHU *ET AL.*, 1986), TAFE ("Transverse Alternating Field Electrophoresis"; CARLE *et al.*, 1986), permitiu a separação de cromossomos de fungos em gel de agarose e as análises do cariótipo electroforético de diversas espécies de fungos (DEWAR *et al.*, 1996).

Assim foi possível estimar 20 cromossomos, com variação de tamanho entre 100 kpb e 2.200 kpb, representando um genoma de aproximadamente 20 Mpb (Figura 22). O tamanho estimado do genoma de *S. scitamineum* é similar aos já descritos para outras espécies causadoras de carvão em gramíneas (KÄMPER et al., 2006)



Figura 22- Detalhes das 20 bandas do cariótipo eletroforético de *S. scitamineum* para derivados haploides A e B dos isolados Ssc11 e Ssc39. Em destaque a estimativa dos comprimentos cromossomais de Ssc39 A (Nunes et al., 2011)

A tecnologia de hibridização (técnica de amplificação de sinal) foi introduzida primeiramente por Southern em 1975, e utiliza sondas de DNA com homologia à sequência do DNA-alvo em estudo. (ATKINS e CLARK, 2004). Com a utilização dessa técnica, e das sondas para os genes de ambos os *locus* (a e b), obteve-se a confirmação do sistema bipolar do *mating type* no fungo *S. scitamineum* (Figura 23), isto é que o fungo apresenta os dois *loci* fisicamente ligados em um mesmo cromossomo. As duas sondas (*locus* a e b) hibridizaram no mesmo cromossomo, porém a sonda para o *locus* a hibridizou em ambos os tipos de reação sexual somente do isolado Ssc11, possivelmente indicando um polimorfismo entre os demais isolados Ssc31 e Ssc 39. Já a sonda para o *locus* b hibridizou em ambos os tipos de reação sexual dos isolados Ssc11 e Ssc31. Uma possível hipótese da não hibridização de ambas as sondas tanto no *locus* a quanto no *locus* b no isolado Ssc39, é a baixa intensidade da banda marcada na membrana.


Figura 23- Localização e confirmação do sistema bipolar de mating type dos locus a e b por Southern blot. A. Gel de PFGE da separação dos cromossomos corado com brometo de etídio. B. Hibridização com a sonda Ptel13 (região telomérica). C. Hibridização com sonda do gene bE (locus b). D. Hibridização com sonda do gene pra (locus a)

Os tipos de sistema de *mating type* em fungos causadores de carvão como *S. reilianum, U. maydis e U. hordei* já estão bem caracterizados. Os fungos *U. maydis e S. reilianum* apresentam um sistema de reação sexual tetrapolar, onde os *locis* a e b estão localizados em cromossomos diferentes e, por conseguinte, segregam independentemente durante a meiose (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008).

Em contraste *U.hordei* apresenta um sistema bipolar de reação sexual (LEE et al., 1999), onde ambos os *loci* a e b estão fisicamente ligados no mesmo cromossomo, segregando como um único *locus*, mesmo tipo observado em *S. scitamineum* (BAKKEREN e KRONSTAND, 1993; 1994) e confirmado no presente trabalho. Esse sistema bipolar em *U. hordei* é controlado por um *loci* de *mating type* denominado "MAT", no qual possui dois alelos, MAT-1 e MAT-2. Esse *loci* (MAT) está localizado no maior cromossomo do genoma de *U. hordei* (LEE et al., 1999), e contém ambos os genes equilalentes em. *U. maydis*. Para os *loci* a e b (BAKKEREN e KRONSTAND, 1993). O resultado da hibridização revela que os genes do *mating type* se localizam em um dos maiores cromossomos do genoma do fungo *S. scitamineum*, de acordo com a separação em PFGE, inferindo uma possível similaridade entre ambos, dado que será analisado e discutido nos próximos itens.

4.3 Anotação e caracterização dos genes associados ao mating type

4.3.1 Limpeza e montagem dos *contigs* das sequências resultantes das pontas dos BACs sequenciados

Foram sequenciados 11 BACs pelo método de *Sanger* selecionados como descrito no item 4.1.4, sendo 5 para o *locus* a e 6 para o *locus* b.

Após o sequenciamento das pontas dos BACs (BAC-*ends*), o primeiro passo, é fazer uma "limpeza" (*trimming*) das sequências. O sequenciamento frequentemente gera alguns trechos de má qualidade, em geral, no inicio e no final do fragmento, onde algumas bases não puderam ser determinadas ou não foram sequenciadas com muita precisão. Estes trechos devem ser removidos para não interferir nas etapas seguintes. Além disso, frequentemente, há sequências de adaptadores e/ou do vetor utilizados. Estes trechos também devem ser removidos para que no final desta etapa haja apenas a sequência do inserto com um nível de qualidade aceitável. O *trimming* das sequencias dos BACs foi realizado utilizando a plataforma *CLC Genomic Workbench* v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, Dinamarca) conforme exemplificado na Figura 24.



Figura 24- Perfil de qualidade de bases e exemplo de "limpeza" (*trimming*) realizado nas sequências resultantes do sequenciamento da ponta dos BACs, por *Sanger*. As setas superiores indicam as regiões eliminadas contendo sequência de baixa qualidade. As setas inferiores indicam as regiões eliminadas correspondentes ao vetor

Após a retirada das regiões de baixa qualidade e os trechos pertencentes ao vetor de clonagem, com as sequências "limpas" prossegue-se então para a fase de montagem dos fragmentos. Inicialmente foi adotado o método de alinhamento de sequências por sobreposição. As técnicas de sobreposição identificam a semelhança, correspondência de bases, entre um *read* e outro. Os 11 BACs foram sequenciados em ambas as direções, *foward* e *reverse*, e o tamanho das sequências variou entre 250 pb e 800 pb, sendo que 50% apresentaram valores

menores que 400 pb, o que é considerado relativamente baixo para essa técnica. Assim, os *reads* (sequências geradas pelo sequenciamento) foram sobrepostos para a montagem dos *contigs* (sequências consenso).

Porém, visto que o sequenciamento gerou uma baixa quantidade de pares de base no sequenciamento das pontas dos BACs, que o procedimento de extração dos BACs tem rendimento limitado, que os custos pela metodologia de *Sanger* são relativamente elevados (Santos, 2013) e devido ao pouco número de clones na biblioteca contendo os insertos de interesse (*locus* a e b), não foi possível a realização da montagem completa dos genes do *mating type* somente com essa estratégia. Como será discutido, as sequências das extremidades foram importantes para a confirmação dos *scaffolds* e *contigs* na montagem desta região utilizando o sequenciamento *shotgun* do genoma.

Além do mais, a construção de uma bliblioteca genômica em vetor tipo BAC poderá ser utilizada em diversas áreas da genômica e está disponível para futuros estudos do genoma do fungo *S. scitamineum.*

4.3.2 Limpeza e montagem dos *contigs* das sequências resultantes do sequenciamento do genoma do *S. Scitamineum*

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho surgiu a oportunidade do sequenciamento completo do genoma do fungo *S. scitamineum* pelo método de sequenciamento Illumina.

O sequenciamento do genoma gerou cerca de 70M de pares de *reads* no qual foram pareados e montados conforme descrito no item 3.6.3. Essa montagem preliminar gerou 5799 *contigs* e até o momento obteve-se 252 *scaffolds* com tamanho médio de 76428 pb. A limpeza das sequências também foi realizada nessa etapa visando à remoção de bases de má qualidade.

Existem duas principais estratégias para se montar um genoma: uma montagem baseada em sobreposição de leituras e outra que utiliza fragmentação de cada leitura em porções menores, denominadas kmers, que podem então ser sobrepostos aos kmers de outras leituras em assim formar contigs. A determinação do tamanho ótimo de kmer para a montagem de um genoma varia, sendo necessária a realização de testes para encontrar os melhores resultados. No geral, valores baixos de kmer aumentam a sensibilidade da montagem, identificando mais sequências que se sobrepõem entre os reads, porém diminui a especificidade, tornando mais frequente a sobreposição de regiões repetitivas (http://soap.genomics.org.cn/soapdenovo.html).

Para a execução da montagem pelo programa SOAP-denovo foram testados vários valores de kmer, sendo que o valor de 63 foi o que apresentou melhores resultados. Além disso, diferentes quantidades de leituras foram testadas como *input* para esse programa, sendo que com cerca de 40 M de pares de *reads*, cerca de 400x de cobertura do genoma, o tamanho estimado do genoma está próximo de 19.5 Mb.

A montagem do genoma completo do fungo *S. scitamineum*, está em andamento, atualmente encontra-se na categoria "*draft*", ou seja, a montagem ainda contém um número elevado de *scaffolds*. Porém foi possível identificar os *scaffolds* que contêm os genes do *mating type* de ambos os *locus* a e b como discutido a seguir. As sequências das pontas dos BACs foram utilizadas para confirmar a anotação desses genes de interesse na montagem preliminar do genoma.

4.3.3 Anotação e caracterização dos genes do mating type do locus a de S. scitamineum e comparação com demais fungos causadores de carvão em gramíneas

Os genes de tipo de reação sexual (*mating type*) desempenham um papel chave na formação e manutenção da célula infecciosa, assim como, na patogenicidade. Por isso, é de grande importância entender a estrutura e função dos genes responsáveis. Até o momento nenhuma caracterização molecular dos genes do *mating type*, de *S. scitamineum* foi publicado.

Os genes do *locus a* de *S. scitamineum* foram identificados no *scaffold* 181, da montagem do genoma realizada em contribuição com o Genomics Group e Dr^o João Paulo Kitajima. Com a anotação da sequência, determinou-se o tamanho total de 8,9 kpb de comprimento, levando em consideração toda a porção compreendida entre os genes da borda (Figura 25). Com a predição realizada com o auxilio do software *Augustus* foi determinada a presença de 6 genes, um gene que codifica uma proteína de membrana receptora de feromônio denominado *pra*, dois gene de feromônio denominados *mfa* 1.2 e *mfa* 1.3, e três genes de função ainda

desconhecida, porém também descrito na região equivalente em fungos causadores de carvão, denominados *Iba* (borda esquerda), *rba* e *panC* (borda direita). A figura 26 representa a anotação e caracterização das regiões codantes do *locus* a contendo os detalhes dos *exons* e *introns* dos genes.



Figura 26- Anotação e caracterização das regiões codantes do *locus* a contendo os detalhes do sentido, do tamanho e dos *exons* e *introns* de cada um dos genes. O gene *lba* possui o tamanho de 1.336 pb, os genes de feromônio *mfa1.2,* 511 pb e *mfa1.3,* 268 pb, o gene receptor de feromônio *pra* contém 1.259 pb, o gene *rba,* 762 pb e *panC,* 1,227 pb

O banco de dados GenBank é um repositório de dados públicos de sequências de nucleotídeos anotados, onde estão incluídas sequências de cDNA obtidas a partir de mRNA, segmentos de DNA genômico com um ou vários genes e clusters de genes RNA ribossomais (BENSON et al., 2007). Utilizando as sequências dos genes do *mating type* dos fungos *U. maydis, U. hordei* e *S. reilianum*, depositadas no GenBank, anotadas com auxilio do software GenePallet, foi realizada a comparação dessas sequências com a anotação dos genes contidos no *locus* a de *S. scitamineum*. Foram comparados a sequências do *locus* a de *S. scitamineum*, com três alelos do *S. reilianum* (a1, a2 e a3), um alelo do *U. maydis* (a1) e do MAT-1 de *U. hordei* (Figura 27).

A comparação dos genes do *locus* a de *S. scitamineum*, com o do MAT-1 de *U. hordei*, observou-se que o gene para o receptor de feromônio, *pra*, esta presente em ambos e dispostos na mesma orientação. Esse gene em *S. scitamineum*, encontrase entre o gene *rba* (gene de função desconhecida, lado esquerdo) e um dos genes de feromônio, *mfa1.3* (lado direito). Em *U. hordei*, esse gene receptor de feromônio encontra-se ao lado do gene *rba* (lado direito) e a esquerda do gene *pra* não há a

presença de genes, porém isso não infere na não existência de genes nessa localização no MAT-1, pois os genes de *mating type* nesse fungo ainda não foram bem determinados e caracterizados, assim como ocorre com o gene *lba*, presente somente em *S. scitamineum*. Ainda em *S. scitamineum* são observados dois genes de feromônio, *mfa1.2* e *mfa1.3*, e um outro gene *panC* de função desconhecida no qual esse último também se encontra na sequência de *U. hordei*, disposto na mesma direção em ambos os fungos, e ao lado do gene *rba1*. Não há a presença do gene *aro4* na sequência de *S. scitamineum* somente em *U. hordei*. As experiências indicam que o *locus* MAT de *U. hordei* é surpreendentemente grande em comparação com o sequências de tipo de acasalamento caracterizada em outros fungos (KRONTAD, 1997).

O locus a de S. scitamineum quando comparados com os o alelo a1 de U. maydis, revelam uma baixa similaridade entre a organização dos genes nesse locus. Ambos apresentam o gene receptor de feromônio, pra, dispostos na mesma orientação, porém em S. scitamineum, o gene está localizado entre os genes mfa1.3 (a direita) e rba(a esquerda), já em U. maydis o lado esquerdo entre os genes pra1 e rba1, há a presença dos genes lga1 e rga1 (genes de função desconhecida), quais não são presentes em S. scitamineum, e do gene mfa1, único gene de feromônio presente no locus, respectivamente nessa ordem de organização. Em S. scitamineum há a presença de dois genes de feromônio mfa1.2 e mfa1.3, ambos localizados a esquerda do gene gene receptor de feromônio, pra.

Para a análise comparativa da organização dos genes presentes no *locus* a entre o fungo *S. scitamineum* e os alelos a1, a2 e a3 de *S. reilianum*, primeiramente descreveremos a comparação entre o alelo a2 por apresentar uma baixa similaridade entre a organização dos genes no *locus*, e uma alta similaridade com a organização dos genes quando comparado com o alelo a1 de *U. maydis*. Como discorrido no parágrafo anterior. Ambas as sequências apresentam o gene receptor de feromônio, *pra*, dispostos na mesma orientação, porém em *S. scitamineum*, o gene está localizado entre os genes *mfa1.3* (a direita) e *rba1(a esquerda)*, já no alelo a2 de *S. reilianum* o o gene *pra2* localiza-se entre os genes *mfa2.3* (a esquerda) e *lga2* (a direta). Após o gene *lga2* há a presença dos genes *e rga2*, *mfa2.1*, *rba1* e *panC*, respectivamente dispostos nessa ordem. Os genes *lga2* e *rga2* não estão presentes em *S. scitamineum*. Diferentememte de *U. maydis*, o *locus* a em *S. reilianum* dispõe o gene mfa2.3 ao lado esquerdo do gene *pra*. Assim como em *S.*

scitamineum, a sequência de S. reilianum apresenta dois genes de feromônio mfa1.2 e mfa1.3, porém a diferença é que em S. scitamineum ambos estão localizados a esquerda do gene gene receptor de feromônio, pra. As comparações foram realizadas mantendo a orientação do gene de referência pra.

Na comparação entre a organização dos genes presentes no *locus* a de *S. scitamineum* e o alelo a3 de *S. reilianum*, pode-se observar uma grande similaridade entre as sequências. Ambas apresentam o mesmo complexo gênico, diferenciando-se apenas na orientação do gene *pra3* de *S. reilianum*, que se encontra divergente a direção do *pra* em *S. scitamineum*. A posição dos dois genes de feromônio, em *S. reilianum*, apresentam-se flanqueando o gene *pra3*, onde a esquerda há o gene *mfa3.2* e a direita o gene *mfa3.1*, já em *S. scitamineum*, ambos os genes *mfa1.2* e *mfa1.3* estão localizados a esquerda do gene *pra* como já discutido nos parágrafos anteriores.

O alelo a1 de S. *reilianum*, na comparação da organização dos genes presentes no *locus a* entre o fungo S. *scitamineum*, apresentou uma alta similaridade em comparação com os demais complexos genes discutidos anteriormente. Ambos os *locus* a dos dois fungos apresentam a mesma organização e mesmos genes, sendo compostos por *lba*, *mfa1.2*, *mfa1.3*, *pra*,*rba* e *panC* em S. *scitamineum* e *lba1*, *mfa1.2*, *mfa1.3*, *pra1,rba1* e *panC* em S. *reilianum*, dispostos respectivamente nessa ordem. Apenas foi observada uma diferença, que a sequência de S. *reilianum* apresenta o gene *aro4*, gene não contido na sequência do *locus a* de S. *scitamineum*.

Análises em organismos modelo revelaram que os genes de reação sexual e a sinalização dos genes dependentes do *mating* são conservados mesmo considerando grandes distâncias filogenéticas. No entanto, a estrutura genética de ambas as regiões determinantes de sexo é notavelmente diversa, resultando em sistemas bipolares e tetrapolar com dois ou múltiplos alelos de *mating type* (RAUDOSKOSKI et al., 2010). O *locus* de *mating type* que codifica o sistema receptor de feromônio (PR) parece ter evoluído de ancestrais de tipos mais simples através de translocações individuais, duplicações de genes e fusões do segundo *locus* de *mating type* (CASSELTON et al, 2010)



Figura 27- Representação gráfica do alinhamento do complexo gênico do *locus* a do fungo S. scitamineum (Sc) com os *locu* a de um alelo de U. maydis (Um a1), o gene MAT-1 de U. hordei (Uh mat-1) e três alelos de S. reilianum (Sr a1, Sra2 e Sra3). Os retângulos cloridos indicam as regiões codantes dos genes ortologos e as linhas representam as regiões não codantes (*introns*). A organização dos genes apresentou perfeita sintenia entre as sequências de S. scitamineum e do alelo a1 de S. reilianum. Por outro lado observou baixa similaridade principalmente entre as sequências do alelo a1 de U. maydis e do alelo a3 de S. reilianum, no qual apresentam posição diferente dos genes de feromônio, além de dois genes a mais *Iga* e rga com função desconhecida

Estudos sobre os genes receptores de feromônio e de feromônio mostram que dois feromônios maduros, com a mesma especificidade apresentam alta similaridade em nível da sequência de aminoácidos. Experimentos funcionais conduzidos por Schirawski (2005), demonstram que os receptores de feromônios pra1 reconhecem especificamentes os ferormônios do gene mfa1.2 e mfa1.3, enquanto os genes receptores de feromônios pra2 reconhecem especificamente os feromônios do gene mfa2.1 e mfa2.3, assim como o pra3 reconhecem os feromônios do gene mfa3.1 e mfa3.2. Esta característica foi observada recentemente em fungos causadores de carvão como U. maydis e U.hordei, no qual apresentam genes de compatibilidade sexual bem específicos possibilitando a reação sexual com apenas um alelo compatível. Em S. reilianum a presença de três alelos contendo um gene receptor de feromônio feromônio e dois genes de feromônio, apresenta uma possibilidade de compatibilidade sexual maior, permitindo que a reação sexual ocorra também entre os diferentes alelos, apresentando uma menor especificidade entre os genes de compatibilidade sexual entre os diferentes alelos (SCHIRAWSKI, 2005). Apesar dos diferentes alelos do fungo S. scitamineum não estarem caracterizados, em estudos realizados por Longatto (2013), foi observado compatibilidade sexual em diferentes

isolados por testes de compatibilidade em placa. Assim podemos predizer que possivelmente, como descrito para *S. reilianum*, a compatibilidade sexual entre possíveis diferentes alelos de *S. scitamineum*, podem apresentar uma menor especificidade para a realização da reação sexual.

Para a análise se similaridade entre as sequêncidas do fungo *S. scitamineum* e demais fungos causadores de carvão em gramíneas, foi realizada uma análise filogenética, levando em consideração às sequências de proteínas, correspondentes as sequências de nucleotídeos, do gene receptor de feromônio, *pra*, por apresentar maior sintenia e sequência conservada como discutido anteriormente no item 4.1.4. Com a análise filogenética foi observada a formação de dois grupos, no qual é possível inferir que gene receptor de feromônio do fungo *S. scitamenuem* é mais similar aos genes receptores de feromônio dos alelos a1 de *U. maydis e S. reilianum*. Ou seja, é possível observar uma grande similaridade nos alelos a1 de fungos causadores de carvão com a exceção do fungo *U. hordei*, no qual apresentou grande similaridade principalmente com o alelo a2 de *S. reilianum* (Figura 28).



Figura 28- Filogenia específica do gene receptor de feromônio (pra) do *mating type*. Análise de Maxima verossimilhança das sequências de proteínas do gene receptor de feromônio. Os valores próximos ao braço indicam o bootstrap (1000 repetições)

A necessidade dos fungos, causadores de carvão, em realizar a reação sexual para conservar seu nicho parasita, bem como para assegurar a recombinação sexual impõe forte pressão de seleção para uma compatibilidade sexual bem-sucedido. Em geral, níveis de diversidade de genes reprodutivos, em muitos grupos taxonômicos, mostram uma rápida diversificação de genes relacionados com o sexo (SWANSON et al., 2002) . Embora a precisão seletiva, no qual, acarreta essa diversificação e suas consequências funcionais para a biologia do *mating type* serem mal compreendidos, evidências sugerem uma co-evolução no processo de adaptação como principal força motriz para a maior diversificação de genes reprodutivos (SWANSON et al., 2002, WIK et al., 2008). Consistentemente, os genes específicos de *mating type* do *locus a* como, *pra1* a *3*, *mfa1* a *3*, e rga2 lga2 revelam um aumento da diversidade interespecífica em comparação com outros *locus* de *mating type*. Um aspecto adicional que poderia promover a diversificação de genes do tipo de reação sexual é a plasticidade funcional e ampla especificidade do sistema PR. Pequenas mudanças dentro de genes codificadores de feromônio e receptores de feromônios não necessariamente levam à perda de função, mas sim favorecem sua rápida diversificação (KELLNER et al., 2011).

4.3.4 Anotação e caracterização dos genes do mating type do locus b de S. scitamineum e comparação com demais fungos causadores de carvão em gramíneas

Os genes do *locus b* de *S. scitamineum* foram identificados no *scaffold* 101, da montagem do genoma realizada em colaboração com o Genomics Group e com o Dr^o João Paulo Kitajima. Com a anotação da sequência, determinou-se o tamanho total de 13,6 kpb de comprimento, levando em consideração toda a porção compreendida de um gene ao outro (Figura 29). Com a predição realizada com o auxilio do software *Augustus* foi determinada a presença 4 genes, os genes bE e bW e dois genes de função ainda desconhecida. A figura 30 representa a anotação e caracterização das regiões codantes do *locus* b contendo os detalhes dos *exons* e *introns* dos genes.



Figura 29- Anotação dos genes do *locus* b preditos pelo software *Augustus* identificado *no scaffold* 101 da montagem preliminar do genoma do fungo *S. scitamineum* e determinação do tamanho do *locus*



Figura 30- Anotação e caracterização das regiões codantes do *locus* b contendo os detalhes do sentido, do tamanho e dos *exons* e *introns* de cada um dos genes.O gene *bW* possui o tamanho de 2.092 pb, o gene bE, 1.479 pb, o gene relacionado a IES, 2.622 pb e o gene relacionado a regulação nuclear possui 590 pb

Utilizando as sequências dos genes do *mating type* dos fungos *U. maydis, U. hordei* e *S. reilianum*, depositadas no GenBank, anotadas com auxilio do software GenePallet, foi realizada a comparação dessas sequências com a anotação dos genes contidos no *locus* b de *S. scitamineum*. Foram comparados a sequências do *locus* b de *S. scitamineum*, com três alelos do *S. reilianum* (b1, b2 e b3), um alelo do *U. maydis* (b1) e o alelo b1 do MAT-1 de *U. hordei*. Na comparação das sequências do *locus* b entre fungos causadores de carvão foi observada uma perfeita sintenia na ordem dos genes, orientação e posição dos *introns*. (Figura 31).



Figura 31- Representação gráfica do alinhamento do complexo gênico do *locus* b do fungo *S. scitamineum* (Sc) com os *locu* b de um alelo de *U. maydis* (Um b1), de um alelo de *U. hordei* (Uh b1) e três alelos de *S. reilianum* (Sr b1, Srb2 e Srb3). Os retângulos cloridos indicam as regiões codantes dos genes ortologos e as linhas representam as regiões não codantes (*introns*). A organização dos genes apresentou perfeita sintenia entre as sequências de *S. scitamineum* comparada com outros fungos causadores de carvão em gramíneas

Estudos realizados com 23 estipes diferentes de fungos Basidiomicetos, utilizando sondas para hibridização baseados no *locus b* de *U. maydis*, mostrou uma similaridade entre os genes dos fungos testados (BAKKEREN et al., 1992). Com base nesses dados foi realizada a comparação desses genes para fungos causadores de carvão no qual foi novamente observado genes ortólogos

principalmente entre os fungos de sistema de reação sexual bipolar (BAKKEREN e KRONSTAND, 1993). Essas evidências sugerem que durante o processo de adaptação ocorreu uma menos diversificação, sendo assim conservados ao longo do tempo através de um equilíbrio de seleção (RICHMAN, 2000), vale lembrar que a conservação está diretamente associada a função como será descrito a seguir.

Segundo Bakkeren e Kronstand (1993) a comparação entre os genes do *locus* b de S. *scitamineum* e fungos bipolar *U. hordei* e tetrapolar *U. maydis* e S. *reilianum* revelaram regiões de alta similaridade tanto de estrutura como em função. Sabe-se que o *locus b* controla o desenvolvimento e crescimento das hifas dicarióticas infectivas (FROELINGER, 1990; KRONSTAD, 1990), no qual, a conservação desses genes torna-se indispensável para o ciclo de vida desses fitopatógenos. O produto dos genes *bE* e *bW* apresentam homeodomíneos conservados ao longo do processo evolutivo. Esses são domínios reconhecidos em fatores de transcrição associados a processos de desenvolvimento e diferenciação celular. Para que o fator de transcrição seja funcional, duas subunidades diferentes devem compor o heterodímero funcional. Assim, provavelmente a maior conservação observada entre os genes desse *locus* quando comparado aos genes do *locus* a está diretamente associada à função do produto gênico.

Para a análise se similaridade entre as sequêncidas do fungo *S. scitamineum* e demais fungos causadores de carvão em gramíneas, foi realizada uma análise filogenética, levando em conta as sequências de proteínas, correspondentes as sequências de nucleotídeos, dos genes do *locus b*, *bE* e *bW*. Com a análise filogenética foi observada a formação de dois grupos, para o gene bE no qual é possível inferir que esse gene do fungo *S. scitamineum* apresenta alta similaridade aos genes do *locus b* e dos alelos de *S. reilianum*. Na comparação dos genes *bW* foi observado a formação de três grupos, no qual esse gene de *S. reilianum* apresenta alta similaridade aos genes do *locus b* com os alelos de *S. reilianum* (*bW1, bW2 e bW3*) e do gene *bW1* de *U. maydis,* apresentando menor similaridade somente entre o alelo *uh-bW1* de *U. hordei* apesar de ambos os fungos apresentarem sistema bipolar dos genes do *mating type* (Figura 32).



Figura 32- Filogenia específica do dos genes do *locus b* do *mating type*. Análise de Maxima verossimilhança das sequencias de proteínas dos genes bE e bW. Os valores próximos ao braço indicam o bootstrap (1000 repetições)

Como discutido anteriormente em *U. hordei,* os dois *loci* do *mating type* (a e b) estão localizados em um único cromossomo, apresentando assim o sistema bipolar. Segundo Kronstad (1997) o *locus* MAT em *U. hordei* maior que a região equivalente em outros fungos. Em outras palavras existe uma supressão da recombinação entre em *U. hordei* (LEE et al., 1999). A distância entre os dois *loci* de *mating type* nesse fungo foi determinada em sistemas com *MAT-1* como sendo de 500 kpb eem sistemas como *MAT-2* de 430 kpb (LEE et al., 1999).

Os esforços para fechar o genoma de *S. scitamineum* estão sendo trabalhados pelo Genomics Group em parceria com o Dr^o João Paulo Kitajima. Atualmente amostras extraídas de DNA do fungo foram enviadas para sequenciamento pelo método do PacBio RS II que é um sistema de sequenciamento de uma molécula única, em tempo real (SMRT ®). Esse sistema fornece maior precisão e maior faixa de leitura do que outra tecnologia de sequenciamento disponível atualmente. Com o fechamento do genoma será possível estimar a distancia entre os *loci a e b* do *mating type* para o fungo *S. scitamineum*, possibilitando assim, estudos mais aprofundados na anotação e caracterização desses genes.

5 CONCLUSÕES

A construção de uma biblioteca genômica de grandes insertos, realizada no presente trabalho, composta por 2880 clones de BACs (*Bacterial Artificial Chromossome*), com fragmentos médios de 100 kpb, correspondendo a uma alta cobertura do genoma do fungo *S. scitamineum*, foi realizada com sucesso e representa um avanço inédito e essencial para as pesquisas genômicas sobre o fungo.

Onze BACs contendo os insertos com os genes de interesse foram isolados e utilizados para a confirmação da montagem dos *loci a* e *b* durante o sequenciamento e montagem do genoma do fungo. A anotação e caracterização dos genes do tipo de reação sexual (*mating type*) possibilitaram a comparação e melhor entendimento sobre esses genes de grande importância no ciclo de vida do fungo assim como a sua patogenicidade.

Apesar do fungo *S. scitamineum* apresentar sistema bipolar de reação sexual assim como o fungo *U. hordei*, as análises comparativas de ambos os *locus* indicaram que *S. scitamineum* apresenta maior similaridade com o fungo *S. reilianum* principalmente com o alelo *a1*, no qual apresenta sistema tetrapolar de reação sexual.

Esforços para a caracterização da distância entre os *loci* associados ao tipo de reação sexual *de S. scitamineum*, estão em andamento e será de grande importância para o melhor conhecimento desse sistema.

REFERÊNCIAS

ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in câncer: cause or consequence? **Nature**, London, v. 777, p. 85-86, 2002.

AGUILAR, M.B.D. Atividade celulolítica e protoplastização em *Humicola* sp. e *Trhichoderma pseudokoningii* var. *rifai..* 1991., p. 79-81. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura" Luiz de Queiroz"; Universidade de São Paulo, Piracicaba1991.

ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the *b*E matingtype gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 1189-1192, 1996.

ANDERSON, C.M.; WILLITS, D.A.; KOSTED, P.J.; FORD, E.J.; MARTINEZ-ESPINOZA, A.D.; SHERWOOD, J.E. Molecular analysis of the pheromone and pheromone receptor genes of *Ustilago hordei*. **Gene**, Amsterdam, v. 240, p. 89-97, 1999.

ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Gene**, Amsterdam, v. 45, p. 3-15, 2004.

AZEVEDO, F.M.; MITNE, M.; MAGALHÄES, V.D. The use of a novel amplification tool for molecular diagnosis of challenging samples. **Eisntein**, São Paulo, v. 2, p. 20-22, 2004.

BAKKEREN, G.; GIBBARD, B.; YEE, A.; FROELIGER E.; LEONG, S.; KRONSTAD, J. The a and b loci of Ustilago maydis hybridize with DNA sequences from other smut fungi. **Molecular Plant-Microbe Interact**, St Paul, n. 5, p. 347-355, 1992.

BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Conservation of the b mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. **Plant Cell**, Rockville, n. 5, p. 123–136, 1993.

BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.91, p.7085-7089, 1994.

BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. The pheromone cell signaling components of the Ustilago a mating-type loci determine intercompatibility between species. **Genetics**, Austin, n. 143, p. 1601–1613, 1996.

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

BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, London, v.35, p. 21-25,2007.

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. **Boletim Técnico Copersucar (Edição especial)**, Piracicaba, p. 1-23, 1987.

BÖLKER, M. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the sutdy 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, v. 68, p. 441–450, 1992.

BORTFELD, M.; AUFFARTH, K.; KAHMANN, R.; BASSE, C.W. The Ustilago maydis a2 mating-type locus genes Iga2 and rga2 compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2233–2248, 2004.

BRAITHWAITE, K.S.; BAKKEREN, G.; CROFT, B.J.; BRUMBLEY, S.M. Genetic variation in a worldwide collection of the sugarcane smut fungus *Ustilago scitaminea*. **Australian society sugarcane technologist congress**, 2004, Mackay, v. 26, p. 224-232, 2004.

BURKE, D.T.; CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. **Science**, Washington, v. 236, p. 806-811, 1987.

CARLE, G.F.; OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research.** London, 12, n.14, p. 5647-5664, 1984

CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, Washington, v. 232, p. 65-68, 1986

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C.; GOODAY, G.W. **The fungi,** 2nd Ed.: San Diego:Academic Press, 2001. p. 397-403.

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

CASSELTON, L.A.; FELDBRÜGGE, M. Mating and sexual morphogenesis in basidiomycete fungi. In: BORKOVICH, K.; EBBOLE, D. (Ed.). **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**., Washington: ASM Press, 2010. p. 536–551,

CENCIL, A.; CHANTRET, N.; KONG, X.; GU, Y.; ANDERSON, O.D.; FAHIMA, T.; DISTELFELD, A.; DUBCOVSKY, J. Construction and characterization of a half million close BAC library of durum wheat (*Triticum turgidum ssp. durum*). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 107, p. 931-939, 2003.

CHANG, Y.L.; CHUANG, H.W.; MEKSEM, K.; WU, F.C.; CHANG, C.Y.; ZHANG, M.; ZHANG H-B. A plant-transformation-resdy large-insert BIBAC library of *Arabidopsis* and bombardment transformation and expression of its large-insert BIBACs in tobacco. **Genome**, Ottawa, v. 54, p. 437-447, 2011.

CHENG, Z.; BUELL, C.R.; WING, R.A.; JIANG, J. Resolutio of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosome, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. **Chromossome Research**, Dordrecht, v. 10, p. 379-387, 2002.

CHU, G.; VOLRATH, D.; DAVIS, R. Separation of large DNA molecules by contourclamped homogeneous electric fields. **Science**, Washington, v. 236, p. 1448-1453, 1986.

COYNE, C.J.; MCCLENDON, M.T.; WALLING, J.G.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G. M.; MURRAY, S.; MEKSEN, K.; LIGHTFOOT, D.A.; SHULTZ, J.L.; KELLER, K.E.; MARTIN, R.R.; INGLIS, D.A.; RAJESH, P.N.; MCPHEE, K.E.; WEEDEN, N.F.; GRUSAK, M.A.; LI, C. –M.; STORLIE, E.W. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of pea (*Pisum sativum* L.) for the isolation of economically important genes. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 871-875, 2007.

COMSTOCK, J.C.; HEINZ, D.J. A new race of Culmicolous smut of sugarcane in Hawaii. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, n. 19, p. 24-25, 1977.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. Sugarcane smut disease. **Florida sugarcane disease**, Florida, 2005. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu/sc008/. Acesso: 30 out. 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_ cana_portugues_-_abril_2013_10_lev.pdf. Acesso em: 10 out. 2013.

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 36-87, p. 23, 1987.

COYNE, C.J.; MCCLENDON, M.T.; WALLING, J.G.; TIMMERMAN-VAUGHAN, G. M.; MURRAY, S.; MEKSEN, K.; LIGHTFOOT, D.A.; SHULTZ, J.L.; KELLER, K.E.; MARTIN, R.R.; INGLIS, D.A.; RAJESH, P.N.; MCPHEE, K.E.; WEEDEN, N.F.; GRUSAK, M.A.; LI, C. –M.; STORLIE, E.W. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of pea (*Pisum sativum* L.) for the isolation of economically important genes. **Genome**, Ottawa, v. 50, p. 871-875, 2007.

DEACON, J. **Fungal Biology - A Textbook.** New York: Blackwell Publishing, 2005. 384p.

DEWAR, K..; BERNIER, L.; LEVESQUE, R.C.. Electrophoretic karyotyping in fungi. In: BIRREN, B.;E. LAI (Ed.). **Nonmammalian genomic analysis**: a practical guide. New York: Academic Press,1996. , p.25- 60. FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, J.R.; HUGHES, C.G. (ED). **Diseases of Sugarcane – Major Diseases.** Amsterdam, v.38, p. 211-229, 1989.

FIGUEIREDO, P. Breve histórico da cana-de-açúcar e o papel do Instituto Agronômico no seu estabelecimento no Brasil. In: **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico. chap. 1, p. 31-34, 2008.

FROELINGER, E.H; KRONSTAD, J.W. Mating and pathogenesis in *Ustilago maydis*. **Developmental Biology**, Orlando, v. 1, p. 185-193, 1990.

FRARY A.; NESBITT, T.C.; GRANDILLO, S.; KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANSKLEY, S.D. Fw/2.2: a quantitative trait lócus key to the evolution of tomato final size. **Science**, Washington, v. 289, p. 85-88, 2000.

FRIJTERS, A.C.J.; ZHANG, Z.; DAMME, M.V.; WANG, G.L.; RONALD, P.C.; MICHELMORE, R.W. Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *Eco*RI and *Hin*dIII genomic fragments of lettuce. **Theoretical and Applied Genetcs**, New York, v. 94, p. 390-399, 1997.

FUCHS, J.; KUHNE, M.; SCHUBERT, I. Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. **Chromossoma**, New York, v. 107, p. 272-276, 1998.

GARDINER, K.; PATTERSON, D. Tranverse alternating field electrophoresis. **Nature**, London, v. 331, p. 371-372. 1988.

GARDINER, J.; SCHROEDER, S.; POLACCO, M.L.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; FANG, Z.; MORGANTE, M.; LANDEWE, T.; FENGLER, K.; USECHE, F.; HANAFEY, M. Anchoring 9,371 maize expressed sequence tagged inigenes to the bacterial artificial chromosome contig map by two-dimensional overgo hybridization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1317-1326, 2004.

GLASS, N.L.; JACOBSEN, D.;SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, p.165-186, 2000.

GIGLIOTI, E.A. **Caracterização da resistência de variedades de cana-de-açúcar para Ustilago scitamineum através do inoculo das mudas e da evolução da doença em cana-soca.** 1993. 167p. Dissertação (Mestrado na Área de Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

GREEN, E.D.; OLSEN, M.V. Systematic screening of yeast artificial-chromossome libraries by use to the polymerase chain reaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 1213-1217, 1990.

HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K.R. Rapid isolation of yeast genomic DNA. Bust n' Grab. **BMC Biotechnology**. London, 2004, v. 16, p. 4-8. PMID: 15102338, 2004.

HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through breeding. **Elsevier Press**, Amsterdam, v. 1, p. 455-502, 1987.

HICKEY, P.C.; JACOBSON, D.J.; READ, N.D. GLASS, N.L. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology,** Orlando, v. 37, p.109-119, 2002.

HIRSCHHORN, E. Caracteres del ciclo evolutivo del carbon de la caña de azucar. **Ministério da Agricultura Y Ganaderia**, Buenos Aires, n. 3, p. 317-324, 1950.

IAONNOU, I.; AMEMIYA, C.T.; GARNES, J.; KROISEL, P.M.; SHIZUYA, H.; CHEN, C.; BATZER, M.A.; JONG, P.J. A new bacteriophage P1-derived vector for propagation of larg human DNA fragments. **Nature Genetics**, New York, v. 6, p. 84-89, 1994.

ILIC, K.; SANMIGUEL, P.J.; BENNERZEN, J.L. A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum and rice genome. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 12265-12270, 2003.

JAMES, G. Smut spore germination on sugarcane internode surfaces. **Proceedings** of The South Africa Sugar Technologists Association, Veracruz, p. 179-180, 1973.

JANDER, G.; NORRIS, S.R.; ROUNSLEY, S.D.; BUSH, D.F.; LEVIN, I.M.; ROBERT, L.L. *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 440-450, 2002.

JANG, S.; ZHOU, F.; XIA, L.; ZHAO, W.; CHENG, H.; ZHOU, R. Construction of a BAC library and identification of *Dmrt*1 gene of the rice field eel, *Monopterus albus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 384, p.775-780, 2006.

JOHNSON, S.J.; WADE-MARTINS, R. A BACwards glance at neurodegeneration: molecular insights into diseases from LRRK2, SNCA and MAPT BAC-transgenic mice. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 39, p. 862-867, 2011.

KAMPER, J.; KAHMANN, R.; BOLKER, M.; MA, L.J.; BREFORT, T. *et al.* Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. **Nature**, London, v. 444, p. 97–101, 2006.

KELLEY, J.M.; FIELD, C.E.; CRAVEN, M.B.; BOCSKAI, D.; KIM, U.J.; ROUNSLEY, S.D.; ADAMS, M.D. High throughput direct end sequencing of BAC clones. **Nucleic Acids Research,** Oxford, v. 27, p. 1539-1546, 1999.

KELLNER, R.; VOLLMEISTER, E.; FELDBRÜGGE, M.; BEGEROW, D. Interespecific sex in grass smuts and genetic diversity of their pheromone-receptor system. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 7, p. 1-17, 2011.

KIM, U.J.; SHIZUYA, H.; JONG, P.J.; BIRREN, B.; SIMON, M.I. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in a F factor based vector. **Nucleic Acids Research,** London, v. 20, p. 1083-1085, 1992.

KRONSTAD, J.W.; LEONG, S.A. The b mating-type locus of Ustilago maydis contains variable and constant regions. **Genes**, Amsterdam, 4, p. 1384–1395, 1990.

KRONSTAD, J.W. ; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review Gene**, Washington, v. 31, p. 245-276, 1997.

LAHAYE, T.; SHIRASU, K.; SCHULZE-LEFERT. P. Chromosome landing at the barley *RAr* 1 locus. **Molecular Genetics and Genomics,** Heidelberg, v. 260, p. 92-101, 1998.

LEE-LOVICK, G. Smut of sugarcane – *Ustilago scitamineum*. **Review of Plant Pathology**, Wallingford, v, 57, p. 181-188, 1978.

LEE, N.; BAKKEREN, G.; WONG, K.; SHERWOOD, E.J.; KRONSTAD, J.W. the mating-type and pathogenicity locus of the fungus *Ustilago hordei* spans a 500-kb region. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 15026-15031, 1999.

LEWIN, B.; WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Genes VIII and molecular biology of the gene**. New Jersey: Pretendice Hall, 2007. 892p.

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

LONGATTO, D.P.; CARVALHO, G.; SOUZA, S.A.C.D.; CAMARGO, L.E.A.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. Evaluation of meiotic recombination in selfing and outcrossing biotrophic fungal phytopathogen Sporisorium scitamineum across sugarcane infection cycles. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 59.,2013. Aguas de Lindóia. **Anais...**, Águas de Lindóia, 2013. v. 1. p. 42-42.

LUTHRA, J.C.; SUTTAR, A.; SANDHU, S.S. Experiments on the control of smut of sugarcane. **Proceedings in Indian Academy of Sciencs,** Bangalore, v. 12, p. 118-128, 1940.

MA, L.; VU, G.T.H.; SCHUBERT, V.; WATANABE, K.; STEIN, N.; HOUBEN, A.; ACHUBERT, I. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH. **Chromossome Research**, Dordrecht, v. 7, p. 841-850, 2010.

MCCLUSTEY, K, ; MILLS, D. Identification and Characterization of Chromosome Lenght Polymorphisms Among Strains Representing Fourteen Races of Ustilago hordei. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 3, p.366-373, 1990.

MONNA, L.; LIN, H.X.; KOJIMA, S.; SASAKI, T.; YANO, M. genetic dissection of a genomic region for quantitative trait lócus, Hd3, into two loci, Hd3a and Hd3b, controlling heading date in Rice. **Theoretical and Applied Genetcs**, New York, v. 104, p. 772-778, 2002.

MUNDKUR, B.B. Taxonimy of the sugarcane smuts. **Kew Bulletin**, London, v.10, p. 525-533, 1939.

NAKAMURA, S.; ASAKAWA, S.; AHMIDO, N.; FUKUI, K.; SHIMIZO, N.; KAWASAKI, S. Construction of an 800-Kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene Pi- ta2 using a highly representative rice BAC library. **Molecular Genetics Genomics**, Dordrecht, v. 254, p. 611-620, 1997.

NCBI NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=mating+type+sporisorium+scitamineum. Acesso em: 30 out. 2013.

NOIR, S.; PATHEYRON, S.; COMBES, M.C.; LASHERMES, P.; CHALHOUB, B. Construction and characterisation of a BAC library for genome analysis of the allotetraploid coffee species (*Coffea arabica* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, Oxford, v. 122, p. 1604-1611, 2004.

NUNES, F.D.; ALMEIDA, F.C.S, TUCCI,R.; SOUZA,S.C. Homeobox genes: a molecularlink between development and câncer. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17. P. 8-94, 2003.

NUNES, F.R.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.Cariótipo Eletroforético de Sporisorium scitamineum, causador da doença do carvão na cana-de-açúcar. In: SIICUSP SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP,19., 2011, Piracicaba. Anais...Piracicaba:ESALQ, 2011.

OLLITRAULT, P.; TEROL, J.; GARCIA-LOR, A.; BÉRARD, A.; CHAUVEAU, A.; FROELICHER, Y.; BELZILE, C.; MORILLON, R.; NAVARRO, L.; BRUNEL, D.; TALON, M. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 12-13, 2012.

PAIVA-JORGE, A.P.; PRAT, E.; VAUTRIN, S.; SANTOS, M.D.; SAN-CLEMENTE, H.; BROMMONSCHENKEL, S.; FONSECA, P.G.S.; GRATTAPAGLIA, D.; SONG, X.; AMMIRAJU, J.S.S.; KUDRNA, D.; WING R.A.; FREITAS, A.T.; BERGES, H.; GRIMA-PETTENATI, J. Advancing *Eucalyptus* genomic: identification and sequencing of lignin biosynthesis genes from deep-coverage BAC libraries. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 137, 2012 PATOCCHI, A.; VINATZER, B.A.; GIANFRANCESCHI, L.; TARTARINI, S.; ZHANG, H-B.; SANSAVINI, S.; GESSLER, C. Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 262, p. 884-891, 1999.

PEBERDY, J.F. Presidential address: fungi without coats – protoplasts as tools for mycological research. **Mycological Research**, Madri, v.93, p.1-20, 1989.

PEDROSA, A.; SANDAL, N.; STOUGGARD, J.; SCHWEIZER, D.; BACHMAIR, A. Chromossomal map of model legume *Lotus japonicas*. **Genetics**, Bethesda, v. 161, p. 1661-1672, 2002.

PETERSON, D.G.; LAPITAN, N.L.V.; STACK, S.M. Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptonemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Genetics,** Austin, v. 152, p. 427-439, 1999.

PETERSON, D.G.; TOMKINS, J.P.; FRISCH, D.A.; WING, R.A.; PATERSON, A.H. Construction of plant artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide. **Journal of Agricultural Genomics,** Wallingford, v. 5, p. 1-3, 2000.

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

PLANTWISE. Pest Distribuition Map. Disponível em: http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx. Acesso em: 30 out. 2013.

QUAIL, M.A.; MATTHEWS, L.; SIMS, S.; LLOYD, C.; BEASLEY, H.; BAXTER, S.W. Genomic libraries: II. Subcloning, sequencing, and assembling large-insert genomic DNA clones. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 772, p. 59-81, 2001.

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.

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

RAUDASKOSKI, M.; KOTHE, E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. **Eukaryot Cell**, Washington, v.9, p.847-859, 2010.

REIS, G.V. **Diversidade Genética de isolados do fungo Sporisorium scitamineum analisada através de fingerprinting da região telomérica.** 2012. 26p. Dissertação (Mestrado em Agronomia (Microbiologia Agrícola)) - Universidade de São Paulo, 2012. RICHMAN, A. Evolution of balanced genetic polymorphism. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p.1953-1963, 2000.

ROSSETO, R.; SANTIAGO, A.D. Doenças da cana-de-açúcar e seu controle. **Encarte de informações agronômicas**, Piracicaba, n. 67, p 9-10, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York:Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. p. 76-85.

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

SANTOS, A.S. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar. 2003. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IX_RIFIB/santos1.PDF. Acesso em: 10 out. 2013.

SATO, K.; MOTOI, Y.; YAMAJI, N; YOSHIDA,H.454 sequencing of pooled BAC clones on chromossome 3H of barley. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 246, 2011.

SCHAUWECKER, F.; WANNER, G.; KAHMANN, R. Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, Berlin, v. 376, p. 617–625, 1995.

SCHENCK, S. New race of sugarcane smut on MAUI. **Hawaii Agriculture Research Center**, Aiea, v. 69, p. 1-4, 2003.

SCHIESTL, R.H.; PETES, T.D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, n.17, p.7585-7589, 1991.

SCHIRAWSKI, J.; HEINZE, B.; WAGENKNECHT, M.; KAHMANN, R. Mating type loci of Sporisorium reilianum: novel pattern with three a and multiple b specificities. **Eukaryot Cell**, Washington, v.4, p. 1317–1327, 2005.

SCHIRAWSKI, J.; MANNHAUPT, G.; MÜNCHA, K.; BREFORT, T.; SCHIPPER, K.; DOEHLEMANN, G.; DI STASIO, M.; RÖSSEL, N.; MENDOZO-MENDOZA, A.; PESTER, D.; MÜLLER, O.; WINTERBERG, B.; MEYER, E.; GHAREEB, H.; WOLLENBERG, T.; MÜNSTERKÖTTER, M.; WONG, P.; WALTER, M.; STUKENBROCK, E.; GÜLDERNER, U.; KAHMANN, R. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. **Science**, Washington, v. 330, p. 1546-1548, 2010.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v. 37, p. 67-75, 1984.

SHIRASU K.; LAHAYE, T.; TAN, M.W.; ZHOU, F.; AZEVEDO, C.; SCHULZE-LEFEN, P. A novel class of eukaryotic zinc- binding proteins is required for disease reistance signalling in barley and development in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v. 99, p. 355-366, 1999. SHIZUYA, H.; BIRREN, B.; UNG-JIN, KIM; MANCINO, V.; SLEPAK, T.; TACHIRI, Y.; SIMON, M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, p. 8794-8797, 1992.

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.

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.

SOANES, D.M.; RICHARDS, T.A.; TALBOT, N.J. Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? **Plant Cell,** Rockville, v. 19, p. 3318-3326, 2007.

SOAP. SHORT OLIGONUCLEOTIDE ANALYSIS PACKAGE. Disponível em: http://soap.genomics.org.cn/soapdenovo.html. Acesso em: 09 nov. 2013

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of Ustilago, Sporisorium, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences **Mycological Research**,Cambrige, v.109, p. 342–356, 2005.

STEIN, L. Genome annotation: From sequence to biology. **Nature Reviews-Genetics**, London, v.2, p. 49-503, 2001.

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisoruim scitamineum*. In: Tech, Croatia Mworia JK (ed) Botany., 2012. p. 109-128.

SWANSON, W.J.; VACQUIER, V.D. The rapid evolution of reproductive proteins. **Nature Genetics**, New York, v.3, p. 137–144, 2002.

SYDON, H. Notizen uber Ustilagigeen. **Annual Mycology,** Lexington, v.22, p. 277-291, 1924.

TANG, X.; DE BOER, J.M.; VAN ECK, H.J.; BACHEM, C.; VISSER, R.G.; JONG, H. Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosome by BAC-FISH technology. **Chromossome Research**, Oxford, v. 17, p. 899-915, 2009.

TOKESHI, H. Carvão da cana-de-açúcar: etiologia e medidas de controle. **Revista** da Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, Piracicaba: STAB, v. 4, p. 26-34, 1985.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: IMATI, H.;AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.

(Eds.). Manual de Fitopatologia. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2 p.207-225.

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

VANKY, K. Illustrated general of Smut Fungi.- A Textbook, Stuttgart, New York, 1987.p 159.

VEIGA, F.M. Smut in Brazil. Sugarcane Pathologists Newsletter, Louisiana, v. 9, p. 17-25, 1972.

VENTER, J.C.; SMITH, H.O.; HOOD L.A. A new strategy for genome sequencing. **Nature**, London, v. 381, p. 364-366, 1996.

VOLLMEISTER, E.; SCHIPPER. K.; BAUMANN, S.; HAAG, C.; POHLMANN, T. *et al.* Fungal development of the plant pathogen Ustilago maydis. **FEMS Microbiology Reviews**. Amsterdan. Rev;DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x. 2011.

WAI, C.M.; MING, R.; MOORE, P.H.; PAULL, R.E.; YU, Q. Development of chromosome-specific cytogenetic markers and merging of linkage fragments in papaya. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 3, p. 171-181, 2010.

WANG, W.; TANURDZIC, M.; LUO, M.; SISNEROS, N.; KIM, H.R.; WENG, J.K.; KUDRNA, D.; MUELLER, C.; ARUMUGANATHAN, K.; CARLSON, J.; CHAPPLE, C.; PAMPHILIS, C.; MANDOLI, D.;TOMKINS, J.; WING, R.A.; BANKS, J.A. Construction of a bacterial artificial chromosome library from the spikemoss *Selaginella moellendorffii*: a new resource for plant comparative genomics. **BMC Plant Biology**, London, v. 5, p.10, 2005.

WIK, L.; KARLSSON, M.; JOHANNESSON, H. The evolutionary trajectory of the mating-type (mat) genes in Neurospora relates to reproductive behavior of taxa. **BMC Evolutionary Biology,** London, v. 8, p. 109, 2008.

XU, J.-R.; PENG, Y.-L.; DICKMAN, M.B.; SHARON, A. The dawn of fungal pathogen genomics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 37-66, 2006.

YUKSEL, B.; PATERSON, A.H. Construction and characterization of a peanut Hind/// Bac library. **Theoretical and Applied Genetics**, Oxford, v, 111, p. 630-639, 2005.

ZHANG, H.B.; WOO, S.S.; WING, R.A. BAC, YAC and cosmid library construction. In: FOSTER, G.; TWELL, D. **Plant gene isolation:** principles and practice.Michigan: John Wiley, 1996. p. 75-99.

ZHANG, H.B.; CHOI, S.; WOO, S.S.; LI, Z.; WING, R.A. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, p. 11-24, 1996.

ZHANG, H-B.; WU, C.C. Bacs as tools for genome sequencing. **Plant Physiology** and **Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 195-209, 2001.

ZHANG, H-B. Map-based cloning of genes and quantitative trait loci. **Principles and practices of plant genomics**. New Hampshire:Science Publ, 2007. v. 1, p. 229-267.

ZHANG, H-B.; SCHEURING, C.F.; ZHANG, M.P.; ZHANG, Y.; WU, C-C.; DONG, J. J.; LI, Y. Construction of BIBAC and BAC libraries from a variety of organisms for advanced genomics research. **Nature Protocols**, London, v. 7, p.479-499, 2012.