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

**Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum*
analisada através de *fingerprinting* da região telomérica**

Gislaine Vicente dos Reis

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

**Piracicaba
2012**

Gislaine Vicente dos Reis
Engenheiro Agrônomo

**Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de
fingerprinting da região telomérica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Reis, Gislaine Vicente dos

Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de *fingerprinting* da região telomérica / Gislaine Vicente dos Reis.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

82 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cana-de-açúcar 2. Carvão (Doença de planta) 3. Diversidade genética
4. Fungos fitopatogênicos 5. Marcador molecular 6. Telômero 7. Variabilidade
I. Título

CDD 632.427
R376d

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

*À DEUS, pelo dom da vida
aos meus pais, Jandira e Osvaldo,
à minha irmã, Márcia,
e a todos meus amigos que sempre me incentivaram.
Com muito carinho dedico este trabalho*

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, particularmente ao Programa de Microbiologia Agrícola, pela possibilidade de realizar o curso de Mestrado.

À minha orientadora Cláudia Barros Monteiro-Vitorello pela confiança em meu trabalho, motivação e pela oportunidade de aprendizagem.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, pelas amostras cedidas para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. João Lúcio de Azevedo e Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pelo exemplo profissional e de vida.

À professora Dra. Maria Lúcia Carneiro Vieira, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas – ESALQ, pela disponibilização do laboratório e colaboração na realização dos trabalhos de AFLP.

Ao professor Dr. Francisco André Ossamu Tanaka (NAP-MEPA), pelos ensinamentos e pela disponibilização de equipamentos.

À minha amiga Alessandra Palhares pela ajuda com os experimentos de AFLP e pelos conselhos valiosos.

Aos técnicos, Ana, Beto, Zezo e Carlinhos. Obrigada pelo auxílio, força e amizade.

Aos meus amigos Dra. Maria Carolina Quecine e Ms. Leonardo Castelo Branco que tiveram uma participação especial neste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Genética de Microrganismos Nathália, Suzane, Tatiane, Daniel, Pillar, Fabiana, Filipe, Jaqueline, Thalita, Lucas, Mariana, Alessandro, Maria Carolina, Maria Letícia, Bruna, Sarina, Joelma e Giulia, pela socialização do conhecimento e pelos momentos de alegria.

À minha família que sempre acreditaram em mim, em especial meus avós Maria e Geraldo, minha sobrinha Tamires, meu cunhado Renato e meu namorado Vinícios.

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

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 A doença carvão	21
2.2 O fungo <i>Sporisorium scitamineum</i>	22
2.3 Diversidade entre isolados de <i>S. scitamineum</i>	28
2.4 Diversidade das regiões teloméricas	29
2.5 Marcadores Moleculares	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Linhagens e condições de crescimento.....	35
3.2 Isolamento do fungo	35
3.3 <i>Mating type</i> dos derivados haplóides	36
3.4 Armazenamento dos isolados de <i>Sporisorium scitamineum</i>	37
3.5 Extração de DNA	37
3.6 PCR para confirmação da identidade do patógeno.....	38
3.7 Purificação de produtos amplificados por PCR e sequenciamento	39
3.8 Mini preparação da sonda telomérica pTEL13	39
3.9 Microscopia eletrônica de varredura	40
3.9.1 Teliósporos	40
3.9.2 Teliósporos germinando	40
3.9.3 Fase micelial.....	41
3.9.4 Fase leveduriforme	41
3.10 RFLP da região telomérica – <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	42
3.10.1 Digestão do DNA Genômico.....	42
3.10.2 Gel de Agarose	42
3.10.3 Transferência Alcalina.....	42
3.10.4 Pré- Hibridização da membrana de DNA Genômico	43
3.10.5 Preparo e Marcação das sondas	43
3.10.6 Hibridização	43
3.10.7 Exposição e Revelação	43

3.11 AFLP - Amplified fragment length polymorphism	44
3.11.1 Restrição do DNA.....	44
3.11.2 Preparo de adaptadores	44
3.11.3 Ligação de Adaptadores.....	45
3.11.4 Reações de amplificação.....	45
3.11.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	46
3.12 Marcadores moleculares e análises biométricas	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Isolamento de teliósporos	51
4.2 Confirmação da identidade dos isolados através de PCR - <i>primer</i> específico	51
4.3 Separação de linhas haplóides a partir das colônias miceliais dicarióticas	52
4.4 Análise morfológica das várias fases do desenvolvimento <i>S. scitamineum</i>	54
4.5 Definição da metodologia de RFLP da região telomérica para <i>S. scitamineum</i>	55
4.5.1 Digestão das amostras do patógeno e eletroforese em gel de agarose.....	55
4.5.2 Fragmentos polimórficos gerados pelo RFLP	57
4.6 Testes e escolha de combinações de <i>primers</i> seletivos – AFLP	63
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de *fingerprinting* da região telomérica

No presente trabalho, foi utilizada uma coleção de 14 isolados de *Sporisorium scitamineum* coletados em diferentes regiões canavieiras, para estudar a diversidade genética por RFLP da região telomérica de maneira comparativa a marcadores AFLP. Os teliósporos, esporos de resistência do fungo, foram coletados a partir do sintoma mais característico da planta infectada que é formação do chicote. Os teliósporos são diplóides e quando germinam dão origem ao probasídio, onde, por meiose formam-se os esporídios haplóides. Estes quando compatíveis sexualmente voltam a se fundir formando um micélio dicariótico infectivo. A fase do ciclo de vida escolhida para as análises foram os derivados haplóides de cada linhagem dicariótica obtida a partir dos teliósporos. Na técnica de AFLP foram encontrados 40 *loci* polimórficos (3%) entre 1311 analisados obtidos a partir de 2 enzimas de corte raro, 1 de corte frequente e 19 combinações de *primers*. A técnica de RFLP da região telomérica foi comparativamente mais eficiente, no qual foram utilizadas três enzimas de restrição que geraram 102 *loci*, sendo 36 polimórficos (34,3%). O agrupamento com base nos coeficientes de similaridade e os resultados de atribuição pelo programa *Structure* revelaram dois grupos genotípicos homogêneos, tanto quando os marcadores foram analisados separadamente como na análise conjunta. Não houve agrupamento por localidade, mas ficou claro que o fluxo desses isolados é baixo. Os derivados haplóides de tipos de reação sexual opostos de cada linhagem dicariótica (teliósporo) permaneceram dentro do mesmo grupo, com exceção de uma única linhagem. Desta forma, de maneira geral na natureza, a fusão entre os esporídios deve acontecer entre aqueles que estão mais próximos. Uma análise molecular de diversidade genética em isolados obtidos em diferentes regiões do mundo por outros autores revelou uma alta homogeneidade entre eles, de forma que somente em localidades da Ásia foi possível revelar, com os marcadores utilizados, alguma diversidade genética. Nossos resultados indicam que a escolha do marcador foi fundamental para revelar diversidade entre os isolados de *S. scitamineum*, sendo que o RFLP-tel revelou um *fingerprinting* de DNA quase que específico para cada isolado, sendo assim mais apropriado do que os descritos anteriormente. A quantidade de *loci* AFLP necessária para revelar polimorfismo foi mais alta do que para RFLP-tel. Uma segunda contribuição deste trabalho foi a detecção de heterozigotos quando consideramos a análise conjunta de derivados haplóides por teliósporo. Um alto grau de homozigosidade foi detectado quando as análises foram realizadas considerando o comportamento dicariótico como diplóide, no entanto, *loci* heterozigotos puderam ser encontrados. Esta é a primeira vez que um estudo desta natureza foi realizado com isolados de *Sporisorium scitamineum* do Brasil.

Palavras-chaves: RFLP; AFLP; Variabilidade; Cana-de-açúcar; Telômero; Carvão

ABSTRACT

Genetic diversity of isolates of the fungus *Sporisorium scitamineum* analyzed by fingerprinting the telomeric region

The genetic diversity of *Sporisorium scitamineum*, the sugarcane smut agent, was characterized in a 14 isolates collection. The isolates were obtained from various sugarcane growing areas and RFLP of the telomeric region was used as molecular marker, compared with AFLP. Teliospores were collected from the whip of infected plants. Teliospores are diploids and germinate producing a probasidium where meiosis takes place originating four haploid cells. These cells if sexually compatible can fuse and a dikaryotic mycelium is formed. The haploid phase, derived from each dikaryotic line obtained from teliósporos, was used to perform the analysis. Our results showed that 40 polymorphic loci (3%) were described among 1,311 analyzed. These were obtained with two rare-cutter restriction enzymes, one frequent-cutter restriction enzyme and 19 primers combinations. The RFLP markers were more efficient when compared to AFLP to reveal polymorphisms. Three restriction enzymes produced 102 loci, from which 36 were polymorphic (34.3%). Clustering using similarity coefficients and results obtained by Structure software revealed two genotypic groups. The analyses were performed with individual markers and combining RFLP and AFLP markers. Locations were not responsible for clustering, and low flux of isolates was evident. The opposite sexual types haploid derivatives originated from the same teliospore were clustered together, with only one exception. This implies that sporideos that are located close together are more likely to fuse. Our data suggest that choosing RFLP as markers were the key for unrevealing diversity among isolates of *S. scitamineum*. RFLP-tel revealed almost unique DNA fingerprintings to various isolates. A second contribution of this work was that heterozygous were detected when considering a combined analyses of haploids derivatives from the same teliospore. This is the first time a study of this nature was organized with Brazilian isolates of *S. scitamineum*.

Keywords: RFLP; AFLP; Variability; Sugarcane; Telomere; Smut

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Características do desenvolvimento do fungo *Sporisorium 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. Imagens realizadas por membros do Grupo de Genômica do Laboratório de Genética de Microrganismos Prof. João Lúcio de Azevedo 24
- Figura 2 - Adaptado do Bakkeren; Kämper; Schirawski, (2008). Organização genética do locus *b* de *Ustilago maydis*, *S. reilianum*, *U. hordei*. Os genes estão representados com setas indicando a orientação da transcrição. Genes homólogos aparecem com a mesma cor e determina a presença das duas classes de homodomínios. Setas pretas indicam o posicionamento dos *primers* desenhados por Albert e Schenck (1996) para diferenciar alelos em *S. scitamineum*.....28
- Figura 3 - Mapa do Brasil com a localização, representada pelos pinos verdes, os isolados obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 1. A. Barreiras-BA, B. Frutal-MG, C. Jaboticabal-SP, D. Macatuba-SP, E. Paranaíba-MS, F. Serra Azul-SP, G. Vista Alegre do Alto-SP, H. Limeira D'Oeste-MG, I. Valparaíso-SP, J. Guaira-SP, K. Ribeirão Preto-SP, L. Araçatuba-SP, M. Conchal-SP 51
- Figura 4 - Esquema representando o posicionamento de *primers* utilizados para amplificar uma região do locus *b* que determina o tipo de reação sexual 52
- Figura 5 - Foto de um gel de agarose 1% em 0,5X TBE dos produtos de PCR amplificados a partir dos *primers* bE4 e bE8. Canaletas: 1- Marcador *1 Kb plus ladder* (Invitrogen), 2 - isolado SSC11A - isolado SC17B- isolado SSC18A e 5- isolado SSC31A 52
- Figura 6 - Resultado do *plate mating* entre 5 unidades formadoras de colônia obtidas a partir de teliósporo coletado na variedade SSC 11. Os números brancos no canto das imagens indicam a UFC que foi colocada em todos os sítios de combinação daquela placa de Petri. Os números pretos indicam as amostras que foram testadas. Fonte: Daniel Prezotto Longatto 53
- Figura 7 - Resultado do *plate mating* entre os dois tipos sexuais diferentes envolvidos na reação sexual das unidades formadoras de colônia obtidas de teliósporos coletados das amostras SSC 11 e SSC 31. Os números brancos no canto das imagens indicam o tipo sexual que foi colocado em todos os sítios de combinação daquela placa de Petri. Os números pretos indicam as amostras teste. Fonte: Daniel Prezotto Longatto 53

- Figura 8 - A: Micélio dicariótico crescidos em meio YM sólido; B: Células leveduriformes haplóides crescidas em meio YM líquido e detalhes do brotamento; C: teliósporos (2n), D: Teliósporos germinando em meio YM líquido. Microscopia eletrônica de varredura - LEO 435 VP 54
- Figura 9 - A: Membrana prateada que envolve o chicote, protegendo os teliósporos; B: Detalhe dos teliósporos fixados na membrana prateada e C: Visão geral da membrana prateada. 55
- Figura 10 - Foto de um gel de agarose 0,6% em TBE 0,5X dos produtos de digestão com a endonuclease *Pst*I. Linhas: 1- Marcador *1Kb ladder* (Fermentas), derivados haplóides em duplicata, 2- 36A, 3- 36B, 4-38A, 5- 38B, 6- 39A, 7- 39B, 8- 40A, 9 - 40B, 10 - 41A, 11- 41B 56
- Figura 11- Esquema do sequenciamento do inserto contendo a região telomérica de *B. cinerea*. A imagem foi obtida a partir do cromatograma, resultado da sequência obtida do vetor pTel13 a partir do iniciador M13R e utilizando o programa *CLC genomics workbench* (CLCbio) 56
- Figura 12 - Do lado direito gel de eletroforese 0,6%, em uma corrida de 40 V, por 12 h. Cada canaleta apresenta o DNA dos haplóides com tipo de reação sexual A, tratadas com a enzima de restrição *Hind*III que foram transferidas para membrana de náilon e em seguida hibridizadas com a sonda da região telomérica, como consta na Figura do lado esquerdo. As amostras estão identificadas pelo nome da cidade de onde foram coletadas e as setas indicam bandas polimórficas. Todas as amostras são apresentadas em duplicatas. A última canaleta do gel de eletroforese apresenta uma amostra não digerida. Marcador *1 Kb ladder* 57
- Figura 13 - Dendograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 derivados haplóides de *S. scitamineum* utilizando *loci* polimórficos de RFLP-tel. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA. A cada ramo são apresentados em vermelho os valores AU e em verde os valores BP. Em cinza, os ramos são numerados 59
- Figura 14 - Gráfico resultante do teste de atribuição, realizado pelo programa *Structure* 2.2. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor um agrupamento. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (*Q*) de um isolado no agrupamento. Os isolados aparecem na coordenada X 60
- Figura 15 - Autoradiografia resultado da hibridização apresentando as linhagens haplóides com DNA digerido com a enzima *Eco*RI, ressaltando que bandas polimórficas aparecem entre linhagens com tipos de reação sexual opostos obtidas do mesmo teliósporo. Na ampliação são apresentados os dois haplóides do isolado SSC05, onde a seta aponta para um *loci* heterozigoto. Para SS04, todos os *loci* foram homozigotos..... 60

- Figura 16- Autoradiografia resultado da hibridização apresentando as linhagens haplóides com DNA digerido com a enzima *Pst*I, ressaltando que bandas polimórficas aparecem entre linhagens com tipos de reação sexual opostos obtidas do mesmo teliósporo, Na ampliação são apresentados os dois haplóides do isolado SSC04, onde a seta aponta para um *loci* heterozigoto. Para SS05, todos os *loci* foram homozigotos 61
- Figura 17 - Teste com a enzima *Eco*RI com 24 combinações de *primers* seletivos, utilizando aleatoriamente 4 indivíduos. M: Marcador de massa molecular Ladder (Invitrogen) 100 + 25 pb. As amostras foram aplicadas em duplicatas 64
- Figura 18 - Gel de poliacrilamida mostrando uma reação de AFLP com a combinação E+ACC/M+CA, mistura dos marcadores de peso molecular 100 pb e 25 pb (Invitrogen). Cada indivíduo foi amplificado em duplicata. Canaletas: 1- isolado 04A; 2- isolado 05A; 3- isolado 11A; 4- isolado 17A1; 5- isolado 18A; 6- isolado 31A; 7- isolado 35A; 8- isolado 36A; 9- isolado 38A; 10- isolado 39A; 11- isolado 40A; 12- isolado 41A; 13- isolado 04B; 14- isolado 05B; 15- isolado 11B; 16- isolado 17B; 17- isolado 17A1B; 18- isolado 31B; 19- isolado 33B; 20- isolado 35B; 21- isolado 36B; 22- isolado 38B; 23- isolado 39B; 24- isolado 40B e 25- isolado 41B 65
- Figura 19 - Dendograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 linhagens haplóides de *S. scitamineum* utilizando AFLP. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA.....67
- Figura 20 - Gráfico resultante do teste de atribuição, realizado pelo programa *Structure* 2.2. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor um agrupamento. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (*Q*) de um isolado no agrupamento. Os isolados aparecem na coordenada X 68
- Figura 21- Dendograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 linhagens haplóides de *S. scitamineum* utilizando uma análise conjunta dos dados de AFLP e RFLP-tel. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Amostras isoladas a partir dos chicotes retirados de plantas infectadas de cana-de-açúcar, com a identificação dada no laboratório para o isolado, localidade e variedade da planta infectada.....	36
Tabela 2- <i>Primers</i> utilizados na confirmação da identidade do patógeno.....	39
Tabela 3- Sítios de restrição, sequências de adaptadores e de iniciadores usados para as análises de AFLP	45
Tabela 4 - Quantificação da similaridade/dissimilaridade entre os genótipos <i>i</i> e <i>j</i>	48
Tabela 5 - Número total de bandas com a sonda telomérica para os diferentes isolados e o número de bandas polimórficas	58
Tabela 6 - Número de bandas geradas pela hibridação utilizando a sonda telomérica.....	62
Tabela 7- Porcentagem de <i>loci</i> polimórficos analisados no RFLP-tel dentro de linhagens haplóides originadas de uma mesma colônia micelial dicariótica crescida a partir de um único teliósporo.....	63
Tabela 8 – Combinações de <i>primers</i> AFLP selecionados para genotipagem dos indivíduos .	66
Tabela 9 - Tabela de bandas diferentes geradas no AFLP para os derivados haplóides de cada linhagem dicariótica.....	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e continua em plena expansão. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, seguido por Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul, Alagoas e Pernambuco (CONAB, 2012).

Entre os fatores importantes que ameaçam a produção de cana-de-açúcar e consequentemente resultam na redução dos subprodutos, está a incidência de algumas doenças. No Brasil já foram detectadas 40 das 177 doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus, fitoplasmas e nematóides encontradas no mundo (SANGUINO, 1998). Além da ferrugem alaranjada recentemente relatada na cultura do Brasil, outras doenças podem provocar redução significativa na produção de cana-de-açúcar: carvão, raquitismo da soqueira, mosaico e escaldadura das folhas (SANTOS, 2003). O carvão da cana-de-açúcar ocorre praticamente em todos os países produtores (COMSTOCK; LENTINI, 2005).

A planta é mais vulnerável à doença em seu estágio inicial. No entanto, os esporos permanecem no solo e as plantas se infectam novamente ao rebrotarem. 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.

Fatores ambientais e a interação com o acúmulo de inóculo do fungo afetam a resistência das variedades. Embora a maioria das variedades disponíveis tenha certo nível de resistência, a ocorrência da doença, em maior ou menor incidência depende da interação da variedade com o ambiente. Condições ambientais como, por exemplo, a fertilidade do solo e a umidade, influenciam nos danos provocado pela doença. O potencial de perdas é variável, mas dependendo da variedade e da incidência da infestação, o dano na produção pode chegar a 80% (TOKESHI, 1997; FIGUEIREDO, 2008).

Pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos moleculares da interação com a planta durante o estabelecimento, desenvolvimento e rápida disseminação deste patógeno oportunista. Durante o ciclo de vida do fungo, a interação com a planta é essencial para o seu desenvolvimento. O chicote é composto por do tecido da planta e do fungo, onde, ocorre a formação dos teliósporos.

Existem trabalhos que divulgam a baixa diversidade genética, o número reduzido de raças e o alto índice de homozigosidade entre os isolados encontrados nas diversas áreas canavieiras no mundo. No Brasil, a diversidade genética, se existente ainda não foi estudada de maneira consistente. A proposta de explorar a variabilidade genética de *Sporisorium*

scitamineum é um primeiro passo para contribuir para estudos em biologia molecular deste fungo, com vistas a uma melhor compreensão da interação com a cana-de-açúcar. Neste sentido, conhecendo as informações disponíveis sobre as ferramentas de análise e os dados na literatura, optamos por utilizar uma técnica que poderia concentrar a maior variabilidade molecular no genoma: a região subtelomérica dos cromossomos.

Os telômeros são complexos de DNA-proteína encontrados nas terminações dos cromossomos de eucariotos. A unidade básica de repetição telomérica no DNA para a maioria dos fungos é o hexâmero TTAGGG. Os telômeros são essenciais para a estabilidade do genoma e o seu encurtamento pode levar a instabilidade cromossômica, senescência replicativa, e apoptose (LIU et al., 2004), enquanto que a sua perda pode ativar o sistema de reparo do DNA (SLIJEPCEVIC; AL-WAHIBY, 2005), provocar parada no ciclo celular (GIRE, 2004), e fusão de cromossomos como em translocações não recíprocas (CAPPER et al., 2007). Além disso, altas taxas de recombinação são frequentes próximo ao telômero (McEZCHERN; LYER, 2001).

Devido à natureza repetitiva, a região telomérica serve ao propósito de avaliar a diversidade dentro de espécies. Vários trabalhos constataram polimorfismo em diferentes isolados, entre os exemplos, estão *Ustilago maydis* (SÁNCHEZ-ALONSO et al., 1996), *Beauveria bassiana* (PADMAVATHI et al., 2008), *Magnaporthe oryzae* (REHMEYER et al., 2006), *Rosellinia necatrix* (AIMI et al., 2002); *Glomus intraradices* (HIJRI; NICULITA; SANDERS, 2007), *Alternaria alternata* (AKAGI et al., 2009), *Metarhizium flavoviride* (INGLIS; MAGALHÃES; VALADARES-INGLIS, 1999). Assim, criamos a seguinte hipótese: a região genômica subtelomérica de *S. scitamineum* pode trazer novas perspectivas que auxiliem nos estudos da biologia do fungo, no que se refere à diversidade genética e agrupamento de indivíduos similares.

Para validar esta hipótese os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Estabelecer uma coleção de isolados de *S. scitamineum* caracterizadas morfológica e molecularmente, provenientes de diferentes regiões canavieiras de alguns estados brasileiros;
2. Adaptar a técnica de RFLP da região telomérica, na escolha da fase do ciclo de vida do fungo a ser analisado;
3. Utilizar a técnica de AFLP, previamente descrita, para comparar a viabilidade do uso de RFLP para *S. scitamineum* em estudos de diversidade

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A doença carvão

O carvão da cana-de-açúcar foi primeiro relatado na África do Sul em 1877, na cidade de Natal e desde então já foi descrito em todas as áreas de cultivo comercial de cana, com exceção, até o momento, de Fiji e Papua Nova Guiné que são consideradas o centro de origem de *Saccharum officinarum* (COMSTOCK; LENTINI, 2005). O carvão chegou ao Brasil em 1946, no engenho de Tarumã, município de Assis, Estado São Paulo. A doença só atingiu o Nordeste em 1985, no município de Cascavel, Ceará. (COPERSUCAR, 1987).

A doença caracteriza-se pela redução no diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução no número de perfilhos industrializáveis e perdas no conteúdo de sacarose devido a aumento de tecido fibroso. 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 epifítia registrada no país, 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 FILHO et al., 1987; CASAGRANDE, 1998). Além dos danos diretos à produção, o carvão acarretou a restrição do uso de variedades sensíveis altamente produtivas. Instituições brasileiras de pesquisa privadas, estaduais e federais têm ao longo dos anos, trabalhado na pesquisa, desenvolvimento e melhoramento de variedades de cana-de-açúcar. Algumas das variedades IAC, CTC, RB e SP resultantes desses programas de melhoramento, apresentam níveis de resistência e suscetibilidade variáveis com relação ao carvão e são recomendadas e plantadas em diferentes regiões do Brasil.

As perdas econômicas devido ao carvão são altamente dependentes da localização geográfica (TOKESHI, 1997; FIGUEIREDO, 2008). As condições climáticas que definem uma determinada região, estão muitas vezes associadas ao reaparecimento da doença (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005). Existem relatos de variedades sob condições de estresse hídrico e calor como sendo mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença, mesmo quando consideradas resistentes. Neste sentido, o entendimento da biologia do patógeno e os mecanismos de interação com o hospedeiro são fundamentais para o manejo da doença, considerando prevenção e o desenvolvimento de novas variedades resistentes.

Plantas doentes, antes de emitirem o chicote, apresentam o ângulo de inserção das folhas mais agudo, limbo foliar estreito e curto, colmos mais finos que o normal e touceiras com superbrotamento (TOKESHI, 1997). Os chicotes surgem em plantas com 2-4 meses de

idade, com o máximo ocorrendo quando as plantas estão com 6-7 meses de idade. Dentro dessas estruturas são encontrados milhões de teliósporos que podem se dispersar rapidamente com o vento por toda a cultura (COMSTOCK; LENTINI, 2005; TOKESHI, 1997).

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). Vale lembrar que variedades comerciais de cana são híbridos poliplóides de várias espécies do gênero *Saccharum* e a resistência genética neste caso, não segue o padrão de resistência gene a gene como visto para outras interações planta-patógeno, fazendo com que a adição de genes de resistência em programas de melhoramento seja mais difícil (WU et al., 1992).

Outra variável adicionada ao manejo de carvão se refere 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). Alterações na patogenicidade de *S. scitamineum* podem acarretar mudanças nas reações das variedades ao carvão. Variabilidade entre raças foi já descrita no Havaí, Brasil, Paquistão, Filipinas, e Taiwan (FERREIRA; COMSTOCK, 1989; COMSTOCK, 2000). Como exemplo, a raça A encontrada inicialmente no Havaí não provocava sintomas de doença nas variedades H50-720 e H59-3775, que ocupavam 60% da área plantada naquela região. No ano de 1976, foi detectada a raça B que atacava estas duas variedades e após dois anos, o carvão tornou-se a doença mais ameaçadora para a indústria açucareira Havaiana (COMSTOCK et al., 1983).

2.2 O fungo *Sporisorium scitamineum*

S. scitamineum é um fungo do filo Basidiomycota, classe Ustilaginomycetes, ordem Ustilaginales e família Ustilaginaceae. Esse foi retirado do gênero *Ustilago* (*Ustilago scitaminea*) considerando resultados de duas análises independentes (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002; STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005). O primeiro estudo foi referente à morfologia, onde foi observada a presença de columela e peridia nos teliósporos (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002), já que espécies do gênero *Ustilago* não apresentam estas estruturas e a segunda constatação foi através da combinação de análises de dados moleculares ITS e LSU rDNA.

Em geral, os fungos causadores de carvão são patógenos hospedeiro-específicos às gramíneas, família Poaceae. Aproximadamente 1200 espécies de agentes de carvão infectam mais de 4000 espécies de plantas, estes agentes atacam culturas importantes como milho, trigo, cevada, aveia, sorgo, cana-de-açúcar e gramíneas forrageiras (BAKKAREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Cada espécie de fungo tem um ou poucos hospedeiros (ALEXANDER; SRINIVASAN, 1966). São classificados como biotróficos, pois dependem de tecidos vivos para a sua proliferação e desenvolvimento (STOLL; BEGEROW; OBERWINKLER, 2005), portanto, o fungo não utiliza de estratégias agressivas para colonizar seu hospedeiro.

S. scitamineum é dimórfico, apresentando duas fases distintas – monocariótica e dicariótica – 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 (Figura 1). As células haplóides crescem saprofiticamente e não são capazes de causar a doença. O contato próximo e de dependência (formação do chicote) do fungo com o hospedeiro os torna um grupo de patógenos muito especializados. A fase dicariótica é micelial, onde a hifa septada contém dois núcleos, um derivado de cada esporídio (basidiósporo) haplóide.

As gemas jovens representam o local de entrada da infecção do carvão, por onde o tecido meristemático é invadido (ALEXANDER; RAMAKRISHNAN, 1980; WALLER, 1969). O micélio prolifera neste tecido enquanto a planta cresce (TRIONE; STOCKWELL; AUSTIN, 1988; LEE-LOVICK, 1978). O fungo pode ser encontrado por toda a planta, mas principalmente nas células parenquimáticas. Antes da formação do chicote, ocorre um acúmulo de micélio do fungo no meristema apical, a planta alonga o internó e o meristema apical se transforma como parte do chicote (LEE-LOVICK, 1978). A fusão de núcleos em cada micélio aparentemente acontece nesse período, com a fragmentação da hifa dicariótica (TRIONE; STOCKWELL; AUSTIN, 1988). Ao redor do núcleo diplóide, a parede celular é reforçada e pigmentada para formar o teliósporo maduro. Estes esporos germinam para formar um probasídio e em seguida os quatro produtos da meiose, os esporídios ou basidiósporos. A descrição do ciclo sexuado do fungo foi dada por Alexander e Srinivasan (1966), que demonstraram o sistema bipolar de cruzamento (discutido a seguir), no qual a combinação de dois esporídios pertencendo a grupos de reação sexual opostos era necessária para uma infecção de sucesso. Além do mais, o grau de virulência variava com a combinação de haplóides.

Figura 1 - Características do desenvolvimento do fungo *Sporisorium 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 probasídios e esporídios produto da meiose, 3: Reação sexual, 4: Fusão dos esporídios e formação da hifa dicariótica infectiva, 5: Esporídios na forma leveduriforme. Imagens realizadas por membros do Grupo de Genômica do Laboratório de Genética de Microrganismos Prof. João Lúcio de Azevedo

As tétrades ordenadas dos basidiósporos podem ser micromanipuladas a partir do probasídio e isoladas em meio de cultura sintético. Os esporídios haplóides multiplicam-se por brotamento e formam colônias leveduriformes. A germinação dos teliósporos, o brotamento dos esporídios, a formação do dicário micelial podem ocorrer *in vitro*. No entanto, a fusão nuclear e a formação dos teliósporos parecem ser restritas a cana-de-açúcar, o que faz com que, para esta parte do ciclo de vida do fungo, ele seja considerado um parasita obrigatório (SUNDAR et al., 2012).

A resistência das variedades é potencialmente dada por dois mecanismos de proteção: resistência mecânica e resistência bioquímica. A resistência mecânica é referente à morfologia das gemas axiais e o nível de proteção que elas oferecem. É relatado que existe um aumento considerável da taxa de infecção com a retirada das escamas que protegem as gemas (WALLER, 1969; APPEZZATO et al., 1999), uma vez que as hifas não penetram nas células de gemas com escamas (SINGH; BUDHRAJA, 1964).

A resistência bioquímica é multifatorial, com uma série de compostos sendo produzidos pela planta. Alguns autores relatam que durante o processo de infecção existe principalmente um acúmulo *in planta* de várias glicoproteínas (LLYOD; PILLAY, 1980;

LLYOD; NAIDOO, 1983; MARTÍNEZ et al., 2000), que atuam na inibição da germinação dos teliósporos (LLYOD; PILLAY, 1980; LLYOD; NAIDOO, 1983). A germinação dos teliósporos diminui cerca de 50% na presença dessas proteínas (MARTÍNEZ et al., 2000). Para que os teliósporos germinem, uma polarização citoplasmática deve acontecer, para permitir a formação do tubo de germinação a partir de um ponto específico, com acúmulo das várias organelas. Nesta região, as extremidades dos filamentos de actina são protegidas por proteínas do tipo CP (*F-action capping proteins*) que impedem a perda de subunidades de actina para manter o crescimento do tubo germinativo. Essas proteínas são essenciais para alterar ou manter o formato celular e na movimentação de células em eucariotos (COOPER et al., 2008). O resultado da presença das glicoproteínas é a perda dessa polarização citoplasmática, resultando na inibição da germinação (FONTANIELLA et al., 2002; MILANES et al., 2005). As glicoproteínas contêm frutano como grupo funcional e são sintetizadas naturalmente a partir de sacarose. A concentração dessas glicoproteínas claramente aumenta após a inoculação das plantas com teliósporos.

Diferenças foram também encontradas em nível de poliaminas livres e conjugadas a componentes fenólicos em órgãos maduros infectados e não infectados (LEGAZ et al., 1998; PIÑON et al., 1999). Poliaminas são essenciais para o crescimento normal, diferenciação celular e são produzidas em uma variedade de fungos, principalmente a partir de ornitina (ornitina descarboxilase), (MENNUCCI; ROJAS; CAMARGO, 1975; RUIZ-HERRER, 1994; SHAPIRA et al., 1989; RAJAM; WEINSTEIN; GALSTON, 1989; WALTERS; MACKINTOSH, 1997). Componentes fenólicos são produzidos pela planta em resposta à infecção, inativando o efeito das poliaminas através da conjugação (SUNDAR, 2012).

Enzimas associadas ao *burst* oxidativo foram encontradas como variando na presença do fungo. São principalmente peroxidases que apresentam altos níveis de atividade na presença do fungo (RODRIGUEZ et al., 2001). A germinação do esporo, acompanha a formação de apressório, principalmente na base de folhas emergentes a partir das gemas. Neste caso os mecanismos de defesa da cana implicam também na produção de enzimas que hidrolisam alguns dos componentes da parede celular do micélio, tais como β -1,3-glucanase e quitinase (LEGAZ et al., 2002). A produção de fatores de virulência pelo fungo induz a síntese e ativação de enzimas relacionadas à produção e polimerização de monolignóis, para formar lignina. Já nas plantas definidas como sensíveis ao carvão, acontece deslignificação de alguns tecidos, principalmente dos esclerídeos foliares. Em resposta à infecção por *Sporisorium*, a cana-de-açúcar também altera o padrão de expressão de reguladores da transcrição, genes associados ao estresse oxidativo, das vias de etileno e auxina, além de

outros associados à via da lignificação como mencionado (LAO et al., 2008; MENOSSI et al., 2008).

Ustilago maydis, o agente causal do carvão do milho é o representante mais bem estudado associado a esta doença (BÖLKER, 2001). Estudos com *U. maydis* 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., 1992; ALBERT; SCHENCK, 1996). O *locus a* apresenta dois genes os quais codificam um lipopeptídeo com função de ferormônio e uma proteína de membrana receptora de ferormônio. Estas proteínas são responsáveis pelo reconhecimento mútuo das células haplóides. O reconhecimento acontece pelo produto do gene que codifica uma proteína transmembrana receptora. Os ferormônios, lipopeptídeos Mfa1 e Mfa2, que são secretados pelos esporídios cujo alelo *a* seja de reação sexual diferente, são detectados reciprocamente através de receptores transmembrana dos ferormônios (Pra2 e Pra1). Após a detecção do sinal emitido pelo ferormônio, através de uma sinalização intracelular que envolve proteínas-G e uma cascata de MAP-kinases, as células respondem com a formação de hifas de conjugação, que crescem uma em direção à outra permitindo a fusão nas suas extremidades. O *locus a* em *U. maydis* é bialélico.

O *locus b* é multialélico e codifica duas subunidades de um mesmo fator de transcrição da família *homeodomain* (SINGH; SOMAI; PYLLAY, 2004; BÖLKER, 2001). Ainda em *U. maydis*, após a fusão das hifas, o dicário filamentoso é formado e apenas mantido se ambos os núcleos possuem diferentes alelos no *locus b*, o gene pode apresentar até 23 alelos. O *locus b* contém os genes *bE* (*bEast*) e *bW* (*bWest*) que são transcritos de maneira divergente (Figura 2). Eles codificam duas subunidades de um fator de transcrição com homeodomínios, cada qual com 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 (Figura 2). A porção C-terminal das proteínas, onde se encontram os homeodomínios é altamente conservada. Para que ocorra a continuidade do crescimento dicariótico filamentoso, cariogamia *in planta* e consequente meiose é necessário a formação de um fator de transcrição heterodimérico funcional, formado pelo produto de alelos diferentes. Este fator de transcrição quando funcional ativa a transcrição de genes associados à manutenção do estado dicariótico.

A fusão de células compatíveis é decisiva ao processo de infecção e o estabelecimento da doença em *U. maydis* (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Durante o processo de infecção, sinais do ambiente e outros específicos ao hospedeiro são percebidos e

transmitidos através de vias de sinalização intracelular. Se componentes dessas vias são interrompidos, a virulência pode ser reduzida (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008; BÖLKER, 2001). O mesmo processo tem sido relatado para *S. scitamineum* (ALBERT; SCHENCH, 1996).

Os *loci a* e *b* em *U. maydis* estão localizados em cromossomos diferentes fazendo com que a segregação desses *loci* seja independente (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Esse tipo de distribuição independente dos *loci a* e *b* nos cromossomos é denominado sistema tetrapolar de *mating-type*. O *mating-type* em *Sporisorium 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 cromossomo, segregando como um único *locus*. Entre os fungos causadores de carvão em gramíneas, o sistema bipolar foi descrito em *Ustilago hordei* e *S. scitamineum* (BAKKEREN; KRONSTAD, 1993, 1994).

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 a sequência completa do genoma disponível (SOANES; RICHARDS; TALBOT, 2007; XU et al., 2006). O genoma de *U. maydis* e *S. reilianum* foram completamente sequenciados. O genoma de *S. reilianum* foi sequenciado com uma cobertura de 29X (SCHIRAWSKI et al., 2010), somando-se em *contigs* 18,2 Kb. O tamanho total do genoma é estimado em 18,7 Kb. As sequências dos genomas *S. reilianum* e *U. maydis* são altamente sintênicas, isto é, eles compartilham a mesma ordem de genes nos seus cromossomos. Somente um rearranjo cromossômico foi detectado. Comparando-se os dois genomas foram identificadas 43 regiões com baixo nível de conservação entre *U. maydis* e *S. reilianum*. Estas regiões continham todos os *loci* ditos de virulência que foram identificados em um estudo anterior no genoma de *U. maydis*, ou seja, aglomerados de genes que codificam proteínas secretadas, sem função determinada (KÄMPER et al., 2006). Quando os genes que codificam essas proteínas são interrompidos em experimentos de *knockout*, ocorre perda de virulência.

Esforços de sequenciamento estão em progresso para *U. hordei* (BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008). Até o momento, existem 74 sequências de *S. scitamineum* codificando 14 proteínas depositadas na base de dados (*GenBank*, 2012) uma delas sendo a região que contém o *locus* para *mating type* utilizado para a detecção do fungo. Albert e Schench (1996) desenvolveram *primers*, com base na sequência dos genes bE e bW de *U. maydis* e avaliaram a sua utilização na detecção de *S. scitamineum in planta* (Figura 2). 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 2 - Adaptado do Bakkeren; Kämper; Schirawski, (2008). Organização genética do locus *b* de *Ustilago maydis*, *S. reilianum*, *U. hordei*. Os genes estão representados com setas indicando a orientação da transcrição. Genes homólogos aparecem com a mesma cor e determina a presença das duas classes de homeodomínios. Setas pretas indicam o posicionamento dos primers desenhados por Albert e Schenck (1996) para diferenciar alelos em *S. scitamineum*

2.3 Diversidade entre isolados de *S. scitamineum*

S. scitamineum tem provavelmente sua origem na Ásia, de onde foi disseminado para outras áreas produtoras potencialmente pela troca de material propagativo. Nesta região também é onde se encontra a maior diversidade entre os isolados. O conceito de raças ainda é motivo para estudos e discussões, no entanto para algumas regiões existe o conceito de raças determinadas, como mencionado anteriormente (SUNDAR et al., 2012).

Algumas estratégias já foram utilizadas para acessar a variabilidade de isolados de *S. scitamineum*, entre elas, estudos morfológicos e de inoculação em casa de vegetação (GILLASPIE; SOMAI; DEAN, 1983), análise de sequência de nucleotídeos das regiões ITS-1

e ITS-2 (SINGH; SOMAI; PYLLAY, 2005), RAPD (XU et al., 2004), AFLP (BRAITHWAITE et al., 2004) e microsátélites (RABOIN et al., 2007). Pouca variação foi observada em todos os experimentos. Para o AFLP, foram utilizados 38 isolados de diversas regiões de diferentes países, com 12 combinações de *primers*, não sendo observada nenhuma variação genética. Neste trabalho, os autores optaram por analisar a diversidade em células haplóides, originadas de basidiósporos individualizados, sendo analisadas células de um único tipo de reação sexual. Todos os isolados foram considerados idênticos, exceto aqueles de origem asiática (BRAITHWAITE et al., 2004). A melhor definição de variabilidade foi dada por Raboin et al. (2007). Esses autores utilizaram uma população originada 142 teliósporos de vários países (15 países desde América até Ásia) e 17 *loci* microsátélites. A variabilidade foi analisada entre e dentro de regiões para 77 isolados e os experimentos foram realizados com micélios dicarióticos. Novamente a variabilidade foi baixa entre e dentro de populações, com alto índice de homozigosidade entre indivíduos crescidos de teliósporos independentes, isolados do mesmo chicote. Os autores concluem que o modo de autofecundação é o prevalente.

Estratégias de RNA *fingerprinting* utilizando *differential display* com *primers* randômicos apresentaram padrões diferenciados de expressão gênica para isolados de plantas infectadas em várias regiões do Egito (FATTAH et al., 2009). No entanto, para este experimento não está claro qual fase do desenvolvimento do fungo foi utilizada. Rago et al. (2009) descreveram também variabilidade patogênica em isolados do Brasil.

2.4 Diversidade das regiões teloméricas

As terminações dos cromossomos, os chamados telômeros, despertaram interesse desde os trabalhos de Barbara McClintock realizados a mais de 60 anos atrás. A estrutura do telômero passou a ser conhecida a partir de 1980 quando Greider e Blackburn (1985) descobriram a enzima telomerase, que mantém as sequências de DNA no final do cromossomo. Essas sequências curtas são altamente conservadas para a maioria das espécies e distribuídas em repetições em tandem nas extremidades, cuja função é prevenir perdas de DNA da fita descontínua, durante a replicação nas terminações cromossômicas, com o auxílio de proteínas que se ligam ao telômero (*telomere-binding proteins*). Em associação com as regiões teloméricas, a região subtelomérica revela a presença de genes com funções que vem nos últimos anos sendo estudadas em detalhes. Em *Drosophila*, por exemplo, a presença de elementos transponíveis (*non-LTR retrotransposon*) de maneira ordenada é essencial na

manutenção do comprimento da sequência do telômero através de eventos de transposição (ABAD et al., 2004). Já em microrganismos eucarióticos é notável a presença de elementos repetitivos que favorecem eventos de recombinação e o silenciamento de genes (repressão devido ao efeito de posição), responsáveis pela natureza dinâmica da região subtelomérica (THAM; ZAKIAN, 2002). Recentemente, nessas regiões em vários organismos, foi detectada a presença de genes associados à virulência, adaptação e evasão do sistema imune hospedeiro. Entre os exemplos mais proeminentes está a presença de proteínas associadas à variação antigênica do parasita da malária. Além disso, a região subtelomérica de *Plasmodium falciparum*, abriga famílias gênicas envolvidas na invasão e virulência (FIGUEIREDO et al., 2005). O mesmo mecanismo foi também determinado para *Trypanosoma brucei*, onde as glicoproteínas de superfície envolvidas na variação antigênica encontram-se nesta região (HORN; BARRY, 2005).

Em leveduras, genes associados às diversas estratégias de adaptação a novos nichos e resposta à estresse foram identificados em regiões subteloméricas (AI et al., 2002; HUNT et al., 2001; PEREZ-ORTIN et al., 2002; TEIXEIRA; GILSON, 2005), por exemplo, em *Sacharomyces cerevisiae*, a região subtelomérica contém um grupo de genes envolvidos na utilização de açúcar e os tipos de genes que são amplificados nessas regiões estão correlacionados com o nicho do qual cada linhagem foi isolada (DENAYROLLES et al., 1997). Outros genes localizados nessas regiões são *flo* e *pau*, os quais estão associados à floculação (adesinas) e ao crescimento anaeróbico respectivamente (RACHIDI et al., 2000; VERSTREPEN et al., 2005). A família *flo* codifica proteínas ricas em serina e treonina, ancoradas por GPI a membrana e que podem atuar em adesão celular. Genes que codificam proteínas com as mesmas propriedades, ricas em serina e treoninas, encontram-se também em regiões subteloméricas de *Candida glabrata*. Nesta levedura patogênica a humanos, as proteínas atuam na adesão as células do tecido epitelial (FABRE et al., 2005). Em *Pneumocystis carinii*, ascomiceto também patogênico a humanos, são encontrados uma família de genes que codificam proteínas de superfície (KEELY et al., 2005). No entanto, assim como em *Tripanosomas*, esse organismo utiliza mecanismos para alternar a expressão gênica entre as cópias dos genes, numa estratégia que permite a evasão do sistema imune.

A sequência de todas as 14 regiões teloméricas e subteloméricas de *Magnaporthe oryzae* (REHMEYER et al., 2006) revelou a presença de três genes associados a degradação de parede celular (CWDE), além de outros quatro genes AVR (DIOH et al., 2000; ORBACH et al., 2000). Em *Aspergillus fumigatus*, genes localizados nas regiões subteloméricas (até 300 Kb) são regulados positivamente durante o processo de invasão em aspergilose, sendo que

40% de todos os genes que foram regulados positivamente, estavam localizados em regiões subteloômicas. Entre os genes encontrados, estão àqueles relacionados à biossíntese de sideróforos e do metabólito secundário pseurotina, um agente neuritogênico (que afeta o desenvolvimento dos axônios), associados à patogenicidade (McDONAGH et al., 2008).

Em *Neurospora crassa* o mesmo tipo de caracterização revelou a presença de um elemento de transposição *Pogo*, e elementos similares a *MAGGY*, *MGLR-3* e *Pyret* de *M. oryzae*, e *Skippy* de *Fusarium oxysporum* (WU et al., 2009). A anotação da região subteloômica revelou ainda a presença de genes agrupados relacionados ao metabolismo secundário e oito genes que codificam enzimas com atividade de CWDE, localizados em seis dos 10 terminais analisados. Os telômeros de *Neurospora* como para os demais fungos são altamente polimórficos entre linhagens.

Exatamente pela natureza repetitiva de rápida evolução, as regiões teloméricas servem ao propósito de avaliar a diversidade dentro de espécies. A técnica é ainda empregada para substituir técnicas de eletroforese em campo pulsado, para determinação do número de cromossomos (BOUCIAS et al., 2000; INGLIS; MAGALHÃES; VALADARES-INGLIS, 1999).

Diversas técnicas podem ser utilizadas no estudo de diversidade, como por exemplo, marcadores do tipo microssatélites e AFLP (SINGH; SOMAI; PYLLAY, 2005; GILLASPIE; MOCK; DEAN, 1983; BRAITHWAITE, 2001), no entanto, considerando o exposto quanto a natureza repetitiva da região subteloômica, este pode ser mais eficiente em revelar variação entre isolados.

2.5 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são *loci* cromossômicos, genes ou sequências de DNA que apresentam segregação mendeliana. Os marcadores de DNA podem ter ação dominante ou codominante, sendo utilizados em estudos genéticos (VIEIRA; NATAL; SILVA FILHO, 2004).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA (MILLACH, 1998; VIEIRA; NATAL; SILVA FILHO, 2004). Os revelados por hibridização estão os marcadores RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) e Minissatélites. Aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD

(“*Random Amplified Polymorphic DNA*”), Microssatélite (ou SSR - “*Simple Sequence Repeats*”) e AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) (MILLACH, 1998).

A técnica RFLP (“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) é caracterizada pela ação de uma endonuclease sobre uma amostra de DNA, gerando fragmentos de diferentes comprimentos, devido ao elevado número de fragmentos formados, estes deverão ser detectados por uma sonda. Este marcador é do tipo codominante.

O minissatélite é uma técnica similar a RFLP, diferindo basicamente no tipo de sonda utilizada. Uma vantagem dos minissatélites é o alto grau de polimorfismo gerados, devido a variação na distribuição de sítios de restrição, sondas, número e tipos de sequências repetitivas (MILLACH, 1998), sendo um marcador codominante.

A técnica RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) é revelada pela amplificação de *loci* cromossômicos usando *primers* compostos de sequências curtas de oligonucleotídeos (VIEIRA; NATAL; SILVA FILHO, 2004). A diversidade é analisada utilizando *primers* aleatórios, mas devido à baixa reprodutibilidade destes marcadores, estes estão sendo substituídos. Este marcador é do tipo dominante.

Microssatélites (ou SSR - “*Simple Sequence Repeats*”) consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem presentes no genoma de eucariotos. As sequências que flanqueiam as regiões repetitivas são amplificadas por um par de *primers* específicos, complementares as sequências microssatélites, onde apresentam *loci* altamente variável e multialélico. O marcador é codominante.

O método de AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) consiste na amplificação via PCR, de fragmentos gerados por duas endonucleases diferentes, sendo uma corte raro (sítios de reconhecimento de 6 a 8 bases) e outra de corte frequente (reconhecimento 4 bases). O marcador é dominante.

A técnica de RFLP tem sido utilizada para fornecer um grande número de marcadores genéticos no genoma eucariótico (BECKMANN; SOLLER, 1983). O tamanho dos fragmentos obtidos pela digestão com endonuclease de restrição do tipo II pode ser alterado, a partir de diferenças específicas na sequência de DNA, como por substituição, adição ou deleção de bases, podendo ocorrer também alterações cromossômicas, tais como inversões ou translocações (MICHELMORE; HULBERT, 1987). O número de bandas observadas depende do número de *loci* no genoma, homólogos a sonda e do número de sítios de restrição dentro da sequência de DNA.

Análises de RFLPs detectam variações dentro das sequências de DNA e nas regiões homólogas contínuas da sonda. Há vários tipos de sondas que podem ser utilizadas, como

aleatória, fragmentos de DNA clonado, clones cDNA ou genes caracterizados (MICHELMORE; HULBERT, 1987).

A técnica de RFLP permitiu o estudo da quantidade e distribuição de variabilidade genética de fungos fitopatogênicos, como *Mycosphaerella graminicola* (McDONALD; MARTINEZ, 1991; XIA et al. 1993; McDONALD et al., 1994), *Stagonospora nodorum* (MCDONALD et al., 1994), *Sclerotinia sclerotiorum* (McDONALD; MARTÍNEZ, 1991; McDONALD et al. 1994; KOHLI; KOHN, 1998), *Phaeosphaeria nodorum* (UENG et al., 1992) e *Mycosphaerella graminicola* (BOEGER et al., 1993).

Há diversos marcadores moleculares disponíveis para analisar diversidade genética, mas não existe uma única técnica que resolva todos os problemas, por isso a escolha da técnica é um ponto crucial. Uma técnica que se aproxima do ideal é o AFLP, pois é uma técnica rápida, de fácil execução e um método confiável, que gera centenas de marcadores, onde é possível a detecção de polimorfismos de fragmentos de restrição amplificados via PCR.

A principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por *locus*, apenas um alelo é detectado, ou seja, o fragmento que é amplificado. As demais variações alélicas são classificadas como um alelo nulo. Marcadores AFLP são, portanto, marcadores dominantes e os dados têm natureza binária.

A técnica AFLP tem ampla aplicabilidade, podendo ser utilizados para análises de diversidade em bactérias, fungos, nematóides e plantas, como exemplo, o estudo de diversidade bacteriana que foi identificada através de AFLP (JANSSEN et al., 1996) , neste caso foi utilizado um grande número de linhagens de *Xanthomonas* e *Aeromonas*, os dados produzidos foram referentes com dados taxonômicos existentes, permitindo a diferenciação de linhagens altamente relacionadas.

Isolados de carvão na cana-de-açúcar de diversos locais foram analisados por (BRAITHWAITE et al., 2004) onde a técnica de AFLPs revelaram baixo polimorfismo, no entanto, isolados de Taiwan, Filipinas e Tailândia eram geneticamente mais divergentes. O AFLP foi utilizado por (BAKKEREN; KRONSTAND; LÉVESQUE, 2000) para examinar diferentes espécies de *Ustilago*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de crescimento

Os chicotes foram obtidos de diversas áreas de plantios, durante o cultivo da cana-de-açúcar nas estações experimentais do programa de melhoramento do Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana, Instituto Agronômico, Ribeirão Preto em colaboração com a Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza. O crescimento do micélio dicariótico e do estado haplóide do fungo foi realizado 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 e 1,5% de ágar) a temperatura de incubação foi de 28 °C, como descrito em (SINGH et al., 2005).

3.2 Isolamento do fungo

O isolamento dos teliósporos foi a partir de chicotes de plantas infectadas de diferentes localizações nos estados brasileiros (Tabela1).

Teliósporos foram coletados de chicotes e transferidos para microtubos, em água destilada adicionada dos antibióticos: sulfato de estreptomicina (5 mg/L) e tetraciclina (2,5 mg/L) por 30 minutos (ALBERT; SCHENCK, 1996). Cerca de 100 µL dessa suspensão de teliósporos em diluições apropriadas, foram plaqueadas em meio YM sólido e as quais incubadas a 28 °C sem iluminação. Após 24 h, em microscópio de luz foi observada a germinação característica dos teliósporos, por meio de uma agulha, estes foram transferidos para outra placa contendo meio sólido YM. As colônias crescidas eram miceliais. Para a obtenção das células haplóides leveduriformes, fragmentos de aproximadamente 2 cm² da cultura micelial, foram retirados e transferidos para meio líquido YM sob agitação de 180 rpm. Em seguida diluições da cultura leveduriforme foram preparadas em solução salina (0,85% NaCl) e plaqueadas em meio YM sólido. As colônias isoladas foram transferidas para placas de meio YM sólido, para a realização posterior do teste de compatibilidade (colaboração do aluno de IC Daniel Longatto Prezotto).

Tabela 1- Amostras isoladas a partir dos chicotes retirados de plantas infectadas de cana-de-açúcar, com a identificação dada no laboratório para o isolado, localidade e variedade da planta infectada

Identificação	Local	Variedade
SSC04	Barreiras BA	IAC91 5155
SSC05	Frutal MG	SP79 1011
SSC11	Jaboticabal SP	IAC91 1099
SSC17	Macatuba SP	CTC12
SSC18	Paranaíba MS	SP89 1115
SSC24	Paranaíba MS	IACSP94 4004
SSC31	Serra Azul SP	IACSP04 4084
SSC33	Vista Alegre do Alto SP	RB855453
SSC35	Limeira D'Oeste MG	IACSP93 3046
SSC36	Valparaíso SP	RB72454
SSC38	Guaíra SP	SP90 3414
SSC39	Ribeirão Preto SP	IAC98 2053
SSC40	Araçatuba SP	*
SSC41	Conchal SP	*

* Procedência da variedade indeterminada

3.3 Mating type dos derivados haplóides

Um conjunto de reações foi realizado de forma controlada a partir do isolamento e identificação de unidades formadoras de colônia (UFCs) compatíveis na reação sexual oriundas de teliósporos coletados de uma mesma variedade de cana-de-açúcar através da observação de seu hábito de crescimento. As UFCs leveduriformes isoladas foram obtidas como já descrito. Após a diluição seriada e crescimento em meio YM sólido foram coletadas 10 UFCs de cada uma das amostras, as quais foram crescidas cada qual em 5 mL no meio líquido YM por dois dias sob agitação de 180 rpm, à 28 °C. O crescimento celular foi determinado em espectrofotômetro Biomate® (*Thermo Scientific*). Com base nos valores de DO (densidade óptica) foi feita a diluição dos inóculos de modo que a DO final na reação sexual em placa fosse de aproximadamente 0,3. Foram feitas alíquotas de 1 mL (DO = 0,3) para cada amostra.

Todas as colônias haplóides utilizadas no teste de reação sexual foram previamente armazenadas a -80°C em solução de glicerol 15%. Inicialmente a placa de Petri foi dividida de modo que os sítios onde foram feitas as combinações estivessem equidistantes. O número

de sítios onde o teste foi feito dependeu do número de colônias diferentes que se desejou verificar a compatibilidade, por exemplo, na realização do *plate mating* entre 5 UFCs coletadas do isolado SSC11 utilizaram-se 5 placas de 90 mm. Em cada uma das placas foram obtidos 5 sítios de reação, em cada qual se adicionou 10 µL de meio inoculado com a 6ª UFC de SSC 11 com DO ajustada para 0,3. Em seguida, sobre cada sítio foram adicionados 10 µL de meio inoculado com a própria amostra (6ª UFC de SSC 11) e todas as demais (7ª, 8ª, 9ª e 10ª UFC de SSC 11). Com isso, na 1ª placa um dos sítios abrigou duas gotas de 10 µL da 1ª amostra na qual não ocorreu reação sexual, conforme esperado, atuando como controle positivo.

Para cada uma das UFCs utilizou-se uma placa na qual a suspensão de células haplóides obtidas a partir desta UFC foi colocada em todos os sítios. Para cada ensaio a mesma combinação entre duas amostras apareceram duas vezes. Após a combinação de todas as UFCs entre si, esperou-se cerca de 1 hora para secagem das suspensões de células antes de realizar o fechamento e inversão das placas, que foram incubadas a 28 °C por dois dias.

Uma vez tendo sido obtidos os dois tipos sexuais (A e B) para cada teliósporo extraído de chicotes obtidos de diferentes locais, foram realizados os testes de cada amostra contra os tipos sexuais isolados a partir das demais amostras. Optamos por utilizar A e B, pois não temos as referências positivas e negativas como descrito na literatura.

3.4 Armazenamento dos isolados de *Sporisorium scitamineum*

As colônias dicarióticas miceliais foram crescidas por 24 h em meio YM a 28 °C. Cinco fragmentos do micélio de aproximadamente 2 cm² foram retirados e transferidos para microtubos de 2 mL com tampa de rosquear contendo 1 mL de óleo mineral autoclavado. Os microtubos em duplicata foram mantidos em caixas a temperatura ambiente.

As colônias obtidas de células isoladas leveduriformes foram crescidas em meio YM líquido por 24 h a 28 °C. Foram armazenados em microtubos criogênicos contendo 1 mL da cultura que foi combinado com 0,5 mL de solução de glicerol 60 % e mantidos em freezer -80 °C.

3.5 Extração de DNA

Foram utilizados inóculos haplóides leveduriformes para o crescimento em meio líquido YEDP, em uma incubadora sob agitação de 200 rpm, a 30 °C, por 24 h.

As células foram transferidas para um tubo de 50 mL e centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi liofilizado por 24 h.

O produto liofilizado foi depositado num almofariz e macerado com a ajuda do pistilo e nitrogênio líquido. Após a maceração, foi acrescentado 6 mL de solução de lise (1% SDS; 0,15M NaCl, 60 mM EDTA pH 8.0 e 400 mM Tris-HCl) e 600 µL de 2-mercaptoetanol e com a ajuda do pistilo a amostra foi homogeneizada e em seguida transferida para microtubos de 1,5 mL.

Foram então adicionados 600 µL de Clorofane (25 mL fenol, 24 mL clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico) homogeneizado por 1 min por inversão. Em seguida a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 12 min.

Realizou-se a transferência do sobrenadante para outro microtubo de 1,5 mL e adicionou o mesmo volume de Clorofil (24 mL de clorofórmio e 1 mL de álcool isoamílico) homogeneizado por inversão. Após foi centrifugado a 10.000 rpm por 12 min.

A fração superior foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL e adicionado 1 volume de etanol gelado e homogeneizado por imersão. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 1 min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol 70% gelado. Nova centrifugação a 10.000 rpm por 1 min sendo descartado o sobrenadante.

O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de TE acrescido de 3 µL de RNase (na concentração 10 mg/mL).

3.6 PCR para confirmação da identidade do patógeno

O DNA extraído foi utilizado como amostra para a reação de PCR com os *primers* bE4 e bE8 (ALBERT; SCHENCK, 1996), cuja sequência consta na Tabela 2, de acordo com as condições: 1 µL de amostra na concentração de 20 ng em 25 µL de reação contendo: 3,75 mM MgCl₂, 10 mM de cada dNTPS, 0,4 M de cada *primers*, 1 U de *Taq* DNA polimerase e tampão 10X. O amplicon foi obtido pela reação da PCR com desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52 °C temperatura de anelamento, 45 s a 72 °C e uma extensão final de 72 °C a 7 min em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, TBE 0,5X, 60 V por 3 h.

Tabela 2- *Primers* utilizados na confirmação da identidade do patógeno

Nome oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')
bE4	5'- CGC TCT GGT TCA TCA ACG – 3'
bE8	5'- TGC TGT CGA TGG AAG GTG T – 3'

3.7 Purificação de produtos amplificados por PCR e sequenciamento

As purificações foram realizadas de amplicons a partir do gel de eletroforese ou diretamente de reações de PCR. Todas as purificações foram realizadas de acordo com o fabricante do kit GFX – *PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). O resultado da purificação foi avaliado em eletroforese com gel de agarose a 1 %, TBE 0,5 X. As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Laboratório de Genética Molecular de Plantas (ESALQ/USP).

3.8 Mini preparação da sonda telomérica pTEL13

O vetor, com a sequência complementar a região telomérica clonada foi enviado para o nosso Laboratório, onde foi transformado em *E.coli* quimicamente competente para estocagem em glicerol -80°C (protocolos como descrito em SAMBROOK, 2001)

A extração do DNA plasmidial da sonda pTEL13 foi feita por Miniprep utilizando lise alcalina com SDS (SAMBROOK et al., 2001).

Foram utilizadas *E.coli* transformadas com o vetor de interesse, em 5 mL meio de cultura CG, com o antibiótico sulfato de estreptomicina (10 mg/L), em uma incubadora sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 15 h.

Após as células foram transferidas para microtubos e centrifugados a 13000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 700 µL de solução STE (10 mM Tris-Cl pH 8.0; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 8.0) seguido de nova precipitação. As células foram ressuspensas gentilmente em 100 µL de Solução I gelada (50 mM glicose; 25 mM Tris-Cl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0), adicionou-se 200 µL de Solução II (0,2 N NaOH; 1% SDS) invertendo o microtubo gentilmente 5 vezes e em seguida, adicionou-se 150 µL de Solução III gelada (60 mL acetato de potássio 5 M; 11,5 mL ácido acético glacial; 28,5 mL água destilada) misturando-se gentilmente, logo após, os microtubos foram colocados no gelo por 5 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 20 min e o sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi recolhido para um novo microtubo.

O DNA plasmidial foi precipitado adicionando-se 1 mL de etanol 95% gelado, incubando à -80 °C por 10 min e centrifugando-se a 13000 rpm por 15 min. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70%, sendo centrifugado a 13000 rpm por 5 min. Finalmente ressuspendeu-se o DNA plasmidial em 30 µL de T₁₀E₁₀ (10 mM Tris-Cl e 10 mM EDTA – pH 8,0) acrescido de 0,5 mg/mL de RNase e incubado por 30 min a 37°C. O material foi armazenado à -20°C.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura

Para confirmar as características típicas descritas para a espécie em cada uma das fases do ciclo de vida, as mesmas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura, cujos métodos de preparo são detalhados a seguir.

3.9.1 Teliósporos

Foram preparadas amostras com teliósporos de diferentes épocas de coletas (Junho 2010 e Maio 2011). Foi utilizado fixador Karnovsky modificado - Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M. O volume de fixador utilizado excedia de 10X o volume da amostra. Foram utilizados microtubos de 1,5 mL para a fixação. As amostras com o fixador foram mantidas na geladeira por 24 h.

Desidratação: A amostra foi submetida a soluções de concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo cerca de 15 min em cada uma. Para solução a 100% foram realizadas três lavagens. Ao término da desidratação, as amostras foram colocadas em gaiolas individuais, passando pela secagem ao ponto crítico Baltec CPD 030. Em seguida as amostras foram fixadas em *stubs* e levadas ao metalizador Baltec MED 010 e analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP.

3.9.2 Teliósporos germinando

Os teliósporos foram inoculados em dois tipos de cultura sintético diferentes, sendo o primeiro meio YM sólido, incubado a 28 °C por 24 h. O segundo meio Água-Ágar nas mesmas condições de incubação. Foram analisados dois protocolos de preparo de amostra.

- 1- As amostras foram deixadas no fixador, desidratadas com concentrações crescentes de acetona, submetidas ao ponto crítico e metalizadas, como já citadas.
- 2- Vapor de ósmio - A amostra foi processada e depositada sobre uma lamínula. Esta lamínula foi colocada numa placa de Petri com papel de filtro umedecido para formar uma câmara úmida. Na capela foram colocadas duas gotas de ósmio a 2% na tampa do microtubo e estas colocadas na placa de Petri. Em seguida foram envoltas com papel alumínio e deixadas na capela por 24 h. Após a fixação o material foi mantido numa caixa com sílica para dessecação, sendo após metalizadas.

3.9.3 Fase micelial

O fungo foi repicado em meio de cultura YM sólido e incubado por uma semana a 28 °C. Devido ao crescimento superficial no meio de cultura, só foi possível a preparação da amostra em vapor de ósmio, conforme citado acima.

3.9.4 Fase leveduriforme

No meio sólido YM, as amostras leveduriformes foram repicadas e após quatro dias foi realizado o preparo através do vapor de ósmio, como já citado.

No meio líquido YM, foram incubadas sob agitação por 24 h a 28 °C. A preparação incluiu poli-L-lisina e lâminas redondas em suporte com forma de gaiola como descrito a seguir. Foi aplicada uma gota de poli-L-lisina 0,1% na lâmina, incubou por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida foi feita a retirada do excesso de poli-L-lisina e imediatamente aplicado o meio de cultura com o *Sporisorium* na fase leveduriforme. Após 15 min, foi retirado o excesso e as lâminas redondas foram colocadas numa gaiola (um anel, uma lâmina, um anel e assim consecutivamente, colocando-se um peso, após o último anel). Esta gaiola foi colocada num Becker com fixador, por três horas. Em seguida, foi realizada a desidratação com acetona 30, 50, 70, 90 e três vezes 100%. Com o término das desidratações, a gaiola foi levada ao ponto crítico e colocando um peso sobre esta para evitar o turbilhamento da amostra, sendo metalizadas posteriormente.

3.10 RFLP da região telomérica – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

3.10.1 Digestão do DNA Genômico

O DNA genômico das amostras foram extraídos a partir de culturas leveduriformes haplóides como descrito no item 3.5.

O DNA genômico foi hidrolisado com três endonucleases diferentes, *EcoRI* (Invitrogen), *HindIII* (Fermentas) e *PstI* (Fermentas). As reações foram preparadas no volume de 20 µL, sendo 20 µg de DNA, 2 U endonuclease, tampão React específico para cada enzima e água ultrapura esterilizada para completar o volume da reação. Ficaram incubadas a 37 °C por um período de 12 h.

3.10.2 Gel de Agarose

Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram separados em gel de agarose 0,6%, TBE 0,5X, por eletroforese a 40 V, por 12 h, um gel de aproximadamente 20 cm. Após a eletroforese, os géis foram corados em brometo de etídio (1 mg/mL^{-1}) e fotodocumentados.

3.10.3 Transferência Alcalina

O gel de agarose foi submetido à depurinação por incubação em 400 mL de solução (HCl 0,25M) por 10 min, sob agitação.

Após foi realizada a desnaturação com a solução (NaCl 1M, NaOH 0,5M) por 15 min, sob agitação. Este processo foi repetido por mais uma vez.

Em seguida foi feita a neutralização (Tris - HCl 0,5 M; NaCl 1,5M, pH 7,5), por 15 min sob agitação. Este processo foi repetido por mais uma vez.

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 a membrana de náilon umificada (HYBOND- N+ - Amersham) e papéis de filtro. A transferência transcorreu por um período de 12 h. Após, o sistema foi desmontado e o DNA foi fixado à membrana com UV-crosslinker (Hoefer UVC 500) e armazenado a temperatura ambiente.

3.10.4 Pré- Hibridização da membrana de DNA Genômico

A membrana foi colocada em garrafas próprias, contendo 50 µL da solução de pré-hibridização por cm² de membrana e levada ao forno a 50 °C, em rotação por período 1 - 2 h.

Solução de pré-hibridização: 0,5 M NaCl, 4% (w/v) reagente bloqueador e tampão de hibridização, seguindo o protocolo do kit AlkPhos Direct Labelling Reagents - Amersham, (GE Healthcare).

3.10.5 Preparo e Marcação das sondas

A sonda foi preparada a partir do plasmídeo pTEL13 que corresponde a região telomérica (LEVIS et al., 1997). A sonda foi preparada a partir do produto de PCR do inserto.

A reação PCR foi realizada utilizando os *primers* M13 (*forward*: GTA AAA CGA CGG CCA G; *reverse*: CAG GAA ACA GCT ATG AC) de acordo com as condições: 2 µL de amostra na concentração de 15 ng em 50 µL de reação contendo: 1,5 mM MgCl₂, 10 mM de cada dNTPS, 0,2µM de cada *primers*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, Tampão da *Taq* 10X e água milliQ esterilizada para completar o volume da reação. O amplicon foi obtido pela reação da PCR com desnaturação inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C temperatura de anelamento, 40 s a 72 °C e uma extensão final de 72 °C a 3 min em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, TBE 0,5X, 60 V por 3 h.

A marcação da sonda e a hibridização foram realizadas segundo o protocolo do kit Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (GE Healthcare).

3.10.6 Hibridização

A sonda, devidamente marcada, foi colocada na garrafa com a solução de pré-hibridização. Esta membrana retornou para o forno a 50 °C, com rotação por 12 h.

3.10.7 Exposição e Revelação

A membrana foi envolvida em filme plástico e colocada em cassete de exposição, juntamente com um filme (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 dois min. O filme foi finalmente colocado para secar.

3.11 AFLP - Amplified fragment length polymorphism

A técnica tem como base a amplificação via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão de DNA genômico com combinações de duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente.

3.11.1 Restrição do DNA

O DNA genômico foi digerido com endonucleases, onde utilizou-se *MseI* como enzima de restrição de corte frequente e *EcoRI/PstI* como endonuclease de corte raro. Para a digestão foram utilizados 400 ng DNA genômico juntamente com 6 U de enzima de restrição em tampão 1X da enzima, 1X BSA (New England Bio Labs®) e água milliQ esterilizada para completar o volume da reação de 30 µL. O material foi incubado no termociclador Gen Amp® PCR System 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) por 12 h a 37 °C e em seguida, 20 min a 65 °C para inativação da enzima. Após a digestão, 5 µL da amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, TBE 1X, 60 V, por 3 h.

3.11.2 Preparo de adaptadores

O preparo dos adaptadores complementares aos fragmentos clivados foi manipulado conforme a endonuclease utilizada:

Adaptadores *EcoRI/PstI*: Consiste na preparação de uma solução contendo 5µM de adaptador *forward*, 5µM de adaptador *reverse* e água milliQ esterilizada para completar volume 200µl.

Adaptador *MseI*: Um solução foi preparada contendo 50µM de adaptador *forward*, 50µM de adaptador *reverse*, e água milliQ esterilizada para completar volume 200µl.

Para o preparo dos adaptadores foi utilizada as seguintes condições: 65 °C por 10 min, 37 °C por 10 min e por fim 25 °C por 10 min. A solução foi estocada a – 20 °C.

3.11.3 Ligação de Adaptadores

A ligação dos adaptadores foram realizadas acrescentando-se ao material digerido uma solução de 30 µL, contendo nesta 0,25 µM de adaptadores no caso da enzima de restrição de corte raro e 2,5µM de adaptadores da endonuclease de corte frequente, tampão 1X para a enzima T4 DNA ligase e 1,7 U de enzima T4 DNA ligase (New England Bio Labs®) e água milliQ esterilizada para completar volume da reação. O material foi incubado por 14 horas a 16 °C, seguindo da inativação da enzima a 65 °C por 20 min. O produto de ligação foi diluído de modo a padronizar sua concentração final a 5 ng/µL. A reação foi estocada a – 20 °C.

3.11.4 Reações de amplificação

Pré-amplificação

Tabela 3- Sítios de restrição, sequências de adaptadores e de iniciadores usados para as análises de AFLP

Enzima	Sítio de restrição	Especificação	Sequência (5' – 3') ¹
<i>EcoRI</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'	Adaptador <i>forward</i>	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'
		Adaptador <i>reverse</i>	5' - AAT TGG TAC GCA GTC TAC - 3'
		Iniciador E+A	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CA - 3'
		Iniciador E+ANN	5' - GAC TGC GTA CCA ATT CAN N - 3'
<i>PstI</i>	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	Adaptador <i>forward</i>	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA - 3'
		Adaptador <i>reverse</i>	5' - TGT ACG CAG TCT AC - 3'
		Iniciador P+A	5' - GAC TGC GTA CAT GCA GA - 3'
		Iniciador P+ANN	5' - GAC TGC GTA CAT GCA GAN N - 3'
<i>MseI</i>	5'-TTAA-3' 3'-AATT-5'	Adaptador <i>forward</i>	5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'
		Adaptador <i>reverse</i>	5' - TAC TCA GGA CTC AT - 3'
		Iniciador M+C	5' - GAT GAG TCC TGA GTA AC - 3'
		Iniciador M +CNN	5' - GAT GAG TCC TGA GTA ACN N - 3'

¹ N: nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva.

A pré-amplificação foi realizada utilizando para cada reação, um volume final de 20 µl, onde foi acrescentado 1,5 mM MgCl₂; 0,5 mM dNTPs; 300 nM de cada *primer* complementar ao adaptador onde foi adicionado um nucleotídeo seletivo a extremidade 3': oligo *EcoRI*+A ou *PstI*+A e oligo *MseI*+C, apresentados na Tabela 3; tampão 1X da *Taq* DNA polimerase; 3U *Taq* polimerase (Fermentas™); 3 µl (15 ng) do produto de ligação e água milliQ esterilizada para completar o volume final. As condições para a amplificação por PCR foram: desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 26 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C temperatura de anelamento, 1 min a 72 °C e uma extensão final de 72 °C a 5 min. A reação de pré-amplificação foram diluídas em 5X em água milliQ esterilizada e armazenada a -20 °C.

Amplificação seletiva

Para cada reação de amplificação seletiva foram adicionados na solução 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 250 nM do *primer EcoRI*+ANN ou *PstI* +ANN (Tabela 2) e 300 nM do *primer MseI*+CNN (Tabela 2), tampão 1X da *Taq* DNA polimerase; 3U *Taq* polimerase (Fermentas™); 1,5 µl (5ng) de reação pré amplificada e diluída e água milliQ esterilizada para completar o volume final de 20 µL. As condições para PCR foram: desnaturação inicial 94° C por 2 min; seguida de 12 ciclos a 94 °C por 30s, temperatura de anelamento 65 °C por 30s; temperatura de extensão 72 °C por 1 min, seguido de 23 ciclos nas mesmas condições, modificando a temperatura de anelamento para 56 °C e temperatura de extensão 72 °C por 3 min. Após a reação foi estocada em – 20 °C.

3.11.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Separação dos loci amplificados

Aos produtos da amplificação foi adicionado o tampão desnaturante (98% de formamida; 10 mM de EDTA pH 8.0; 0,002 % de azul bromofenol e 0,002% de xileno cianol). Esta mistura foi submetida à desnaturação a 94 °C por 5 min e em seguida mantida em gelo. Uma alíquota de 3 µL foi aplicada em gel de poliacrilamida 5% (acrilamida/bisacrilamida [19:1]; 7,5 M de uréia e tampão TBE 1X [89mM de Tris-base, 89

mM de ácido bórico; 2,5 mM EDTA 2Na]) após 1 h de pré corrida a 70W. A corrida de eletroforese foi utilizada no aparelho Sequi-Gen® (Bio-Rad) por 4 horas em um potência de 70W, usando um aparato de eletroforese Sequi-Gen® (Bio-Rad). Como marcador de peso molecular utilizou-se 2 µL de uma mistura dos marcadores (Invitrogen) de peso molecular de 25 e 100 pb (cada um a 40 ng/µL na mistura).

Coloração e visualização dos locos

A coloração foi realizada em solução de nitrato de prata (AgNO_3), seguindo protocolo adaptado de Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001):

Fixação: A fixação do gel foi realizada por imersão em solução de etanol 10% e ácido acético 1%, agitando por 10 min, seguida de uma lavagem com água destilada e deionizada, durante 1 min, com agitação.

Oxidação: O pré-tratamento foi realizado com solução de ácido nítrico 1,5%, agitando durante 3 min, seguindo-se de uma nova lavagem do gel com água destilada e deionizada durante 1 min, com agitação.

Impregnação com prata: A impregnação do gel se deu em solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,2% durante 20 min, sob agitação, na ausência de luz. Foi seguida de duas novas lavagens com água destilada e deionizada, com duração de 30 s cada.

Revelação: A revelação dos géis foi em uma solução de 2 litros contendo 60 g de Na_2CO_3 e 2 mL de formaldeído (37%). Nesta etapa, 1 litro da solução foi aplicado sobre o gel até que começaram a surgir bandas. Após este passo, a solução foi descartada e o outro 1 litro foi adicionado para finalizar o processo de revelação. Após a revelação das bandas no gel, a solução foi descartada.

Bloqueio: O bloqueio da revelação foi realizado em solução de ácido acético 5% durante 5 min, seguindo-se uma nova lavagem com água destilada e deionizada durante 1 min.

Após estas etapas, a placa contendo o gel foi colocada na posição vertical em um local seco e arejado a temperatura ambiente para sua secagem, sendo após digitalizado pelo scanner (Color Page- Genius®).

3.12 Marcadores moleculares e análises biométricas

Os marcadores moleculares fornecem informações diretamente sobre o material genético dos indivíduos, e servem ao propósito de agrupar indivíduos semelhantes de forma que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados, como já discutimos. As diferenças são apresentadas na forma de uma matriz de dados retangular, cujas colunas identificam os genótipos e as linhas, as regiões do DNA em que foram avaliadas as diferenças. O método de agrupamento foi utilizado neste trabalho por não pressupor nenhum tipo de distribuição de probabilidade específica e por ser de fácil interpretação e utilização. A matriz foi gerada em comparações entre a ocorrência de bandas em comum e bandas diferentes, indicados por 0 e 1, sendo que 0 representa a ausência de banda e 1, a presença de banda, cada banda foi considerada como um *locus*. Somente as bandas polimórficas foram consideradas para a construção das matrizes de valores binários. Foram obtidas as matrizes de dissimilaridades (ou distância) entre os genótipos. As estimativas de similaridade genética (sg_{ij}) entre cada par de linhagens foram obtidas de acordo com o coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1901). Os coeficientes variam com relação à importância dada a ausência e presença conjuntas. Este coeficiente foi escolhido, pois compara o número de presenças de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas, ou seja, segue a seguinte fórmula: $a/a+b+c$ (Tabela 4). As similaridades foram transformadas em dissimilaridades (dg_{ij}) pela seguinte equação, para apresentação no dendograma:

$$dg_{ij}=1- sg_{ij}.$$

Tabela 4 - Quantificação da similaridade/dissimilaridade entre os genótipos i e j

		Genótipo i	
		1	0
Genótipo j	1	A	B
	0	C	D

Os dendogramas foram construídos segundo o método de médias aritméticas de grupos não ponderados (UPGMA), que é uma técnica SAHN (métodos de agrupamento sequenciais, aglomerativos, hierárquicos, sem sobreposição) (SNEATH; SOKAL, 1973). UPGMA (*unweighted pair-group method arithmetic averages*) é um algoritmo que não considera a estrutura do grupo a priori, dando pesos iguais para cada indivíduo do grupo e

calcula uma similaridade média de um indivíduo que pretende se juntar ao grupo já existente. Este é o algoritmo mais utilizado para estudos de divergência genética (DUARTE; SANTOS; MELO, 1999) sendo ainda considerado nas mais recentes publicações. Todas as análises foram feitas no programa estatístico R (<http://www.r-project.org>).

Para verificar a consistência dos dendogramas, foram utilizadas estratégias de reamostragem *bootstrap* com o programa Pvcust adicionado ao pacote R (SUZUKI; SHIMODAIRA, 2006). Este programa calcula dois valores de probabilidade para cada agrupamento. Um valor BP (*bootstrap probability*) que representa a frequência que o agrupamento aparece nas réplicas de *bootstrap* e um valor de probabilidade (*p-value*) na variação dos valores de BP durante as reamostragens. Este teste acessa a confiabilidade da árvore selecionada, AU (*approximately unbiased test*). Os valores de BP foram calculados com 10.000 replicações. Os resultados de BP e AU são apresentados nos dendogramas.

Para medir o grau de ajuste entre a matriz de similaridade original (matriz S) e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento (matriz C) foi utilizado o índice de correlação cofenética (CC) (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990). No caso C é aquela matriz obtida após a construção do dendograma, quanto mais próximos CC for de 1, menor será a distorção provocada pelo agrupamento dos indivíduos com o método de UPGMA.

Foi realizado também um teste de atribuição pelo programa *Structure* 2.2. O programa *Structure* utiliza um método de agrupamento para inferir estrutura de populações usando dados de genótipos obtidos de marcas não ligadas (PRITCHARD; MATHEW; DONNELLY, 2000). O método vem sendo aplicado para demonstrar a presença de estrutura populacional, identificar indivíduos distintos numa população, designar membros a uma população e identificar migrantes. O programa assume que existe um número K de populações, que pode não ser definido a priori. A população é caracterizada por um grupo de frequências alélicas em cada *locus*. Os indivíduos são designados probabilisticamente a populações, ou agrupados a duas ou mais populações se os seus genótipos indicam que eles sejam misturados (*admixed*). O modelo assume que dentro de populações, os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação. Para este trabalho a análise foi realizada com período de *burn in* de 100.000, sem informação a priori da população, pelo algoritmo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). As cores apresentadas nos gráficos representam marcas com frequências distintas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de teliósporos

O enfoque da primeira fase deste projeto foi o isolamento dos teliósporos a partir de chicotes de plantas infectadas de 14 amostras de diferentes localizações nos estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Figura 3) fornecidas pela Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza do Centro de Cana, IAC Ribeirão Preto. Observando o mapa apresentado na Figura 3, a distribuição dos isolados em diferentes localidades representam regiões de plantio de cana-de-açúcar.

Figura 3 - Mapa do Brasil com a localização, representada pelos pinos verdes, os isolados obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 1. A. Barreiras-BA, B. Frutal-MG, C. Jaboticabal-SP, D. Macatuba-SP, E. Paranaíba-MS, F. Serra Azul-SP, G. Vista Alegre do Alto-SP, H. Limeira D'Oeste-MG, I. Valparaíso-SP, J. Guaira-SP, K. Ribeirão Preto-SP, L. Araçatuba-SP, M. Conchal-SP

4.2 Confirmação da identidade dos isolados através de PCR - *primer* específico

Os *primers* utilizados amplificaram uma região do *locus b* associado a determinação do tipo de reação sexual (Figura 4). O amplicon esperado nestes experimentos era de 500 pb, como apresenta a Figura 5. Os fragmentos obtidos foram sequenciados e comparados com aqueles depositados no *GenBank* confirmando a identidade dos isolados obtidos.

Figura 4 - Esquema representando o posicionamento de *primers* utilizados para amplificar uma região do *locus b* que determina o tipo de reação sexual

Figura 5 - Foto de um gel de agarose 1% em 0,5X TBE dos produtos de PCR amplificados a partir dos *primers* bE4 e bE8. Canaletas: 1- Marcador 1 Kb plus ladder (Invitrogen), 2 - isolado SSC11A - isolado SC17B- isolado SSC18A e 5- isolado SSC31A

4.3 Separação de linhas haplóides a partir das colônias miceliais dicarióticas

O teste de compatibilidade para tipos de reação sexual (*plate mating*) entre colônias haplóides isoladas de um mesmo teliósporo, foi realizado inicialmente para a linhagem SSC 11 (Figura 6). Uma vez estabelecida metodologia, todas as linhagens foram avaliadas. O teste de compatibilidade para tipos de reação sexual (*plate mating*) entre os derivados haplóides de teliósporos coletados de diferentes amostras foi também realizado inicialmente entre os tipos sexuais (A e B) isolados para as amostras SSC 11 e 31 (Figura 7). Uma vez estabelecida a metodologia, foram realizados os testes de compatibilidade entre os tipos sexuais isolados das demais amostras. Para cada uma das colônias miceliais crescidas a partir dos teliósporos foi realizado o mesmo procedimento de forma que foram isoladas pelo menos duas colônias leveduriformes haplóides com tipos de reação sexual opostos. A separação dos haplóides foi realizada para 12 amostras, no entanto, para duas amostras só foi possível separação do tipo

sexual B, pois realizando o *mating* com as haplóides A de outros isolados, pode-se observar a formação do micélio dicariótico filamentoso.

Figura 6 - Resultado do *plate mating* entre 5 unidades formadoras de colônia obtidas a partir de teliósporo coletado na variedade SSC 11. Os números brancos no canto das imagens indicam a UFC que foi colocada em todos os sítios de combinação daquela placa de Petri. Os números pretos indicam as amostras que foram testadas. Fonte: Daniel Prezotto Longatto

Figura 7 - Resultado do *plate mating* entre os dois tipos sexuais diferentes envolvidos na reação sexual das unidades formadoras de colônia obtidas de teliósporos coletados das amostras SSC 11 e SSC 31. Os números brancos no canto das imagens indicam o tipo sexual que foi colocado em todos os sítios de combinação daquela placa de Petri. Os números pretos indicam as amostras teste. Fonte: Daniel Prezotto Longatto

4.4 Análise morfológica das várias fases do desenvolvimento *S. scitamineum*

Nas imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura foi possível confirmar todas as características de cada fase do ciclo de vida do fungo e adequar a melhor fase para os estudos de variabilidade (Figura 8).

Figura 8 - A: Micélio dicariótico crescidos em meio YM sólido; B: Células leveduriformes haplóides crescidas em meio YM líquido e detalhes do brotamento; C: teliósporos (2n), D: Teliósporos germinando em meio YM líquido. Microscopia eletrônica de varredura - LEO 435 VP

A principal característica observada ao ME foi a presença das equínulas presentes nos teliósporos de fungo de carvão (SUNDAR, 2012) (Figura 8c). Foram ainda realizadas imagens dos teliósporos associados ao chicote. Existe na literatura um relato de uma membrana prateada a qual os teliósporos se fixam durante o início da sua formação (TOKESHI, 1997), uma matriz gelatinosa acompanha a fragmentação das hifas, e fusão dos núcleos e reforço da parede celular e pigmentação (TRIONE; STOCKWELL; AUSTIN, 1988;). Esta película pode ser observada ao microscópio eletrônico de varredura (Figura 9).

Figura 9 - A: Membrana prateada que envolve o chicote, protegendo os teliósporos; B: Detalhe dos teliósporos fixados na membrana prateada e C: Visão geral da membrana prateada.

4.5 Definição da metodologia de RFLP da região telomérica para *S. scitamineum*

4.5.1 Digestão das amostras do patógeno e eletroforese em gel de agarose

Foram utilizadas três endonucleases de restrição: *Hind*III, *Eco*RI e *Pst*I. A enzima *Pst*I gerou um número maior de bandas distribuídas quase que igualmente por todo o gel de agarose (Figura 10). O DNA hidrolisado de cada um dos tratamentos separados por eletroforese foi transferido para membranas de náilon. Em todos os géis foram incluídas duplicatas para cada um dos derivados haplóides, utilizando os dois tipos de reação sexual oposto e compatível de cada indivíduo.

Figura 10 - Foto de um gel de agarose 0,6% em TBE 0,5X dos produtos de digestão com a endonuclease *Pst*I. Linhas: 1- Marcador *1Kb ladder* (Fermentas), derivados haplóides em duplicata, 2- 36A, 3- 36B, 4- 38A, 5- 38B, 6- 39A, 7- 39B, 8- 40A, 9 - 40B, 10 - 41A, 11- 41B

A sequência que foi utilizada como sonda para os experimentos de RFLP foi gentilmente cedida pela professora Dra. Maria Vieira Queiroz da Universidade Federal de Viçosa e obtida de (LEVIS et al., 1977). O clone foi obtido a partir de regiões teloméricas de *Botrytis cinerea*.

O plasmídeo foi extraído utilizando protocolos de mini preparação através de lise alcalina para a sua utilização. O inserto teve a sua sequência determinada para confirmar a presença da repetição telomérica (Figura 11).

Figura 11- Esquema do sequenciamento do inserto contendo a região telomérica de *B. cinerea*. A imagem foi obtida a partir do cromatograma, resultado da sequência obtida do vetor pTel13 a partir do iniciador M13R e utilizando o programa *CLC genomics workbench* (CLCbio)

4.5.2 Fragmentos polimórficos gerados pelo RFLP

Considerando as 3 enzimas utilizadas, foi obtido um total de 102 *loci*, passíveis de leitura para os 27 derivados haplóides. Desses *loci*, 36 se mostraram polimórficos entre os diferentes isolados (35,3%). A Tabela 5 apresenta o número de *loci* polimórficos e a porcentagem de polimorfismo por enzima utilizada. Foi sempre considerado o maior número de bandas hibridizadas para a soma total das bandas. Os fragmentos hibridizados variaram entre 1500 a 11000 pb (Figura 12).

Figura 12 - Do lado direito gel de eletroforese 0,6%, em uma corrida de 40 V, por 12 h. Cada canaleta apresenta o DNA dos haplóides com tipo de reação sexual A, tratadas com a enzima de restrição *HindIII* que foram transferidas para membrana de náilon e em seguida hibridizadas com a sonda da região telômerica, como consta na Figura do lado esquerdo. As amostras estão identificadas pelo nome da cidade de onde foram coletadas e as setas indicam bandas polimórficas. Todas as amostras são apresentadas em duplicatas. A última canaleta do gel de eletroforese apresenta uma amostra não digerida. Marcador *1 Kb ladder*

Tabela 5 - Número total de bandas com a sonda telomérica para os diferentes isolados e o número de bandas polimórficas

Endonuclease de restrição	Total de bandas	Total de bandas polimórficas	Taxa de polimorfismo (%)
<i>HindIII</i>	34	10	29,4
<i>EcoRI</i>	34	20	58,8
<i>PstI</i>	34	6	17,6
Total	102	36	35,3

O marcador utilizado tem um perfil multilocus por gerar muitas marcas genômicas. Desta forma, pode-se acessar a variabilidade de *S. scitamineum*, que apesar de ser considerada baixa em estudos anteriores (BRAITHWAITE et al., 2004; RABOIN et al., 2007) é existente e capaz de agrupar indivíduos. O agrupamento dos dados obtidos dos *fingerprintings* gerado pelo programa R deu origem ao dendrograma apresentado na Figura 13. Considerando a distância 0,6 entre os grupos, podemos observar claramente uma divisão dos derivados haplóides em dois grupos. Em cada grupo estão localizados os pares que representam os haplóides que vieram de um mesmo teliósporo. Foi observada uma exceção para a linhagem SSC41A e B, pois os tipos de reação sexual oposta foram alocados em grupos diferentes, supondo-se que houve isolamento de mais de um teliósporo. O número de isolados que estamos trabalhando ainda é pequeno. Existe a possibilidade da separação ser devido ao acaso, já que não analisamos vários isolados para cada região. No entanto, mesmo considerando este número pequeno, podemos verificar a presença de polimorfismo e a utilidade do marcador utilizado em revelar diferenças entre os isolados. Quando o programa *Structure* foi utilizado a atribuição dos isolados formaram 3 grupos, da mesma forma, somente os derivados haplóides SSC41 não correspondem ao mesmo agrupamento (Figura 14). Apesar da distribuição em 3 grupos, estas ainda mantém o mesmo padrão de distribuição observado no dendrograma. Este estudo teve como objetivo principal avaliar o uso da técnica de RFLP-tel, para um estudo mais detalhado de populações, novos isolados precisam ser obtidos. No entanto, a partir dos dados, sugerimos que provavelmente a população de *S.scitamineum* no Brasil pode ter sido influenciada por duas entradas independentes do fungo, tendo um efeito fundador que pode ter se disseminado pelas variedades. Um estudo detalhado da origem das variedades de cana de onde os isolados

foram obtidos poderia ajudar a traçar o caminho desses dois grupos em potencial de *S. scitamineum*. A confiança dos dados e a consistência dos nós foram constatadas pelos valores de *bootstrap* e pelo coeficiente de correlação cofenética (0,94), com isto o dendograma responde de maneira adequada à representação de grupos nessa amostra. Veja a seguir que os resultados se confirmam com o uso de AFLP e em análises combinadas.

O derivado haplóide 33B apresenta uma mistura de genótipo com contribuição quase que equivalente de genótipos de duas populações (Figura14). Para esse indivíduo não foi isolado o haplóide do tipo sexual oposto.

Figura 13 - Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 derivados haplóides de *S. scitamineum* utilizando *loci* polimórficos de RFLP-tel. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA. A cada ramo são apresentados em vermelho os valores AU e em verde os valores BP. Em cinza, os ramos são numerados

Figura 14 - Gráfico resultante do teste de atribuição, realizado pelo programa *Structure 2.2*. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor um agrupamento. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no agrupamento. Os isolados aparecem na coordenada X

Ressaltando que os derivados haplóides se mantêm no mesmo grupo, foi confirmado que o cruzamento preferencialmente acontece entre esporídios próximos (autofecundação) e prevalece na população em campo (RABOIN et al., 2007). No entanto, diferentemente do que foi descrito anteriormente (RABOIN et al., 2007), encontramos em haplóides que compõe um micélio dicariótico, *loci* que são polimórficos (Figuras 15 e 16), podendo ser considerados como heterozigotos.

Figura 15 - Autorradiografia resultado da hibridização apresentando as linhagens haplóides com DNA digerido com a enzima *EcoRI*, ressaltando que bandas polimórficas aparecem entre linhagens com tipos de reação sexual opostos obtidas do mesmo teliósporo. Na ampliação são apresentados os dois haplóides do isolado SSC05, onde a seta aponta para um *loci* heterozigoto. Para SS04, todos os *loci* foram homozigotos

Figura 16- Autoradiografia resultado da hibridização apresentando as linhagens haplóides com DNA digerido com a enzima *Pst*I, ressaltando que bandas polimórficas aparecem entre linhagens com tipos de reação sexual opostos obtidas do mesmo teliósporo. Na ampliação são apresentados os dois haplóides do isolado SSC04, onde a seta aponta para um *loci* heterozigoto. Para SS05, todos os *loci* foram homozigotos

O *fingerprinting* descrito acima foi utilizado também para estimar o número de cromossomos. Todos os cromossomos apresentam dois telômeros, portanto considerando o número total de bandas hibridizadas, podemos inferir o número total de cromossomos (N° de bandas/2) (Tabela 6). Foram geradas entre 28 e 34 bandas por digestão marcadas com a sonda telomérica. Desta forma o número de cromossomos variou entre 14 e 17, números consistentes com o descrito para espécies similares, sendo que *Ustilago maydis* contém aproximadamente 20 cromossomos (KINSCHERF; LEONG, 1988). O número de bandas variou devido o efeito da co-migração de fragmentos submetidos a eletroforese. Quando mais de um fragmento do mesmo tamanho apresenta sinal, muitas vezes fica difícil estimar o número de bandas marcadas. Desta forma, a variação encontrada é natural da estimativa.

Tabela 6 - Número de bandas geradas pela hibridização utilizando a sonda telomérica

Indivíduos	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I	Estimativa do número de cromossomos
04A	34	30	30	17
05A	32	32	30	16
11A	32	32	30	16
17A	30	30	30	15
18A	34	30	32	17
31A	34	30	30	17
33B	28	28	28	14
35A	30	32	32	16
36A	30	30	30	15
38A	30	32	30	16
39A	30	30	30	15
40A	34	34	30	17
41A	34	34	34	17

Considerando que todos os experimentos foram realizados sempre acompanhando os haplóides isolados de cada teliósporo, podemos analisar os dados em conjunto para cada dupla de haplóides com tipo de reação sexual oposta, ou seja, considerar como diplóide cada uma das duplas. Desta forma pode-se determinar a porcentagem de heterozigotos para determinado *locus* analisado (Tabela 7). O alto índice de homozigotos encontrado anteriormente (BRAITHWAITE et al., 2004; RABOIN et al., 2007) provavelmente se deve ao baixo número de *loci* analisados. Esta consideração ficará mais evidente na comparação dos dados obtidos de AFLP.

Tabela 7 - Porcentagem de *loci* polimórficos analisados no RFLP-tel dentro de linhagens haplóides originadas de uma mesma colônia micelial dicariótica crescida a partir de um único teliósporo

Linhagens haplóides	Total de bandas diferentes	Total de <i>Loci</i>	Porcentagem de bandas diferentes (%)
04A e 04B	1	36	2,8
05A e 05B	2	36	5,6
11A e 11B	4	36	11,1
17A1 e 17B	2	36	5,6
18A e 18B	8	36	22,2
31A e 31B	4	36	11,1
35A e 35B	0	36	0
36A e 36B	0	36	0
38A e 38B	4	36	11,1
39A e 39B	0	36	0
40A e 40B	0	36	0
41A e 41B	8	36	22,2

4.6 Testes e escolha de combinações de *primers* seletivos – AFLP

Para a escolha das melhores combinações de endonucleases de restrição/*primers* seletivos, foram preparados dois géis testes, sendo analisadas um total de 48 combinações entre as enzimas *EcoRI* e *PstI*, no qual foram utilizados o DNA de 4 indivíduos aleatoriamente para esta etapa, como exemplificado na Figura 17. As melhores combinações foram utilizadas para os demais isolados e encontram-se descritas na Tabela 8, sendo que cada indivíduo foi amplificado com duas repetições para verificar a reprodutibilidade dos resultados e para eliminação de erros referente ao manuseio do material (Figura 18).

Foi obtido um total de 1311 *loci* na análise de AFLP, a partir da combinação de 19 *primers* seletivos, destes 40 foram polimórficos (3%). Diferenças entre padrões de amplificação foram observadas, sendo que a variação de tamanho dos *loci* polimórficos foi de 122 a 1100 pb (Figura 18).

Na execução do AFLP durante a etapa de digestão do material genético, a combinação das enzimas *EcoRI/MseI* é a mais utilizada. No entanto, nem sempre esta combinação resulta nos melhores perfis eletroforéticos, bem como no maior número de *loci* polimórficos (VIEIRA, NATAL; SILVA FILHO, 2004), como se pode verificar na Tabela 8, a maioria das

combinações selecionadas foram de enzimas *PstI/MseI* que gerou também um maior número de *loci* polimórficos.

Figura 17 - Teste com a enzima *EcoRI* com 24 combinações de *primers* seletivos, utilizando aleatoriamente 4 indivíduos. M: Marcador de massa molecular Ladder (Invitrogen) 100 + 25 pb. As amostras foram aplicadas em duplicatas

Para este experimento foi verificado que a utilização de três nucleotídeos seletivos, na amplificação seletiva, fez com que os resultados fossem melhores e isto pode ocorrer para outras espécies (VIEIRA, NATAL; SILVA FILHO, 2004),

Dentre as 19 combinações de *primers* AFLP utilizados no presente estudo, aqueles que possuem maior potencial para utilização, na análise de variabilidade genética em *S. scitamineum* foram P+AGA/ M+CTC; P+AGA/ M+CAA, pois produziram seis bandas polimórficas cada.

Figura 18 - Gel de poliacrilamida mostrando uma reação de AFLP com a combinação E+ACC/M+CA, mistura dos marcadores de peso molecular 100 pb e 25 pb (Invitrogen). Cada indivíduo foi amplificado em duplicata. Canaletas: 1- isolado 04A; 2- isolado 05A; 3- isolado 11A; 4- isolado 17A1; 5- isolado 18A; 6- isolado 31A; 7- isolado 35A; 8- isolado 36A; 9- isolado 38A; 10- isolado 39A; 11- isolado 40A; 12- isolado 41A; 13- isolado 04B; 14- isolado 05B; 15- isolado 11B; 16- isolado 17B; 17- isolado 17A1B; 18- isolado 31B; 19- isolado 33B; 20- isolado 35B; 21- isolado 36B; 22- isolado 38B; 23- isolado 39B; 24- isolado 40B e 25- isolado 41B

Tabela 8 – Combinações de *primers* AFLP selecionados para genotipagem dos indivíduos

Nucleotídeos Seletivos	Total	<i>Loci</i>	Taxa de
	amplificado	polimórficos	polimorfismo (%)
E+AAA, M+CA	43	1	2,3
E+ACC, M+CA	71	1	1,4
E+AGC, M+CTA	72	1	1,4
E+AGA, M+CTG	58	1	1,7
E+AAA, M+ CTC	92	2	2,2
E+AGA, M+CGC	59	3	5,1
E+ACG, M+CTA	133	1	0,7
P+AAA, M+CTC	43	2	4,6
P+ACA, M+CAT	65	1	1,5
P+AGA, M+CAC	55	1	1,8
P+AGA, M+CAG	58	2	3,4
P+AGA, M+CTC	77	6	7,8
P+AAC, M+CGC	78	2	2,6
P+ACG, M+CAG	63	1	1,6
P+ACT, M+CAG	65	1	1,5
P+AGA, M+CAA	73	6	8,2
P+AAC, M+CTA	65	3	4,6
P+AGC, M+CAT	68	2	2,9
P+ACT, M+CTG	73	3	4,1
Total	1311	40	-

O agrupamento dos dados obtidos dos *fingerprints* de AFLP, gerado pelo programa R, deu origem ao dendograma apresentado na Figura 19. Considerando um valor de distância entre os grupos de 0,5, obteve-se a formação dos mesmos dois grupos, descritos anteriormente. A correlação cofenética, ou seja, a correlação entre as distâncias ou dissimilaridades reais e as obtidas do agrupamento foi de (0,96).

Quando o programa *Structure* é utilizado, a atribuição dos isolados formam três grupos (Figura 20). Da mesma forma que descrito anteriormente os derivados haplóides SSC41 não correspondem ao mesmo agrupamento.

Em cada grupo estão localizados os pares que representam os haplóides que foram separados dos teliósporos. A variabilidade dos isolados é baixa, mas foi possível agrupar os

indivíduos. No AFLP também encontramos pares de haplóides do mesmo isolado, que apresentam *loci* polimórficos (Tabela 9).

A distribuição em dois grupos como mencionado para o RFLP-tel se manteve usando marcadores AFLP, o que nos indica que provavelmente se tem dois grupos de isolados nas regiões canavieiras do Brasil. Por fim realizamos uma análise conjunta dos marcadores, e apresentamos o dendrograma na Figura 21, sendo que os mesmos grupos foram formados. A correlação cofenética foi de (0,90).

Figura 19 - Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 linhagens haplóides de *S. scitamineum* utilizando AFLP. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA

Figura 20 - Gráfico resultante do teste de atribuição, realizado pelo programa *Structure* 2.2. Cada barra vertical representa um isolado e cada cor um agrupamento. A coordenada Y mostra o coeficiente de participação (Q) de um isolado no agrupamento. Os isolados aparecem na coordenada X

Nos resultados obtidos na literatura para AFLP (BRAITHWAITE et al., 2004), nenhum polimorfismo foi detectado provavelmente devido ao baixo número de marcas utilizadas. Este trabalho revelou somente 3% dos *loci* obtidos como sendo polimórficos. A mesma explicação pode ser dada para as 17 marcas microsatélites que foram utilizadas por Raboin et al., (2007). Neste caso além de nenhum polimorfismo, apenas um *locus* heterozigoto foi identificado. Diferentemente do que obtido neste trabalho. O índice de heterozigoto é baixo, mas existente se consideramos AFLP como um marcador codominante nos derivados haplóides de cada linhagem dicariótica.

Tabela 9 - Tabela de bandas diferentes geradas no AFLP para os derivados haplóides de cada linhagem dicariótica

Indivíduos	Total <i>loci</i> diferentes	Total de <i>Loci</i>	Porcentagem de <i>loci</i> diferentes (%)
04A e 04B	11	40	27,5
05 e 05B	03	40	7,5
11A e 11B	03	40	7,5
17A1 e 17B	03	40	7,5
17A2 E 17B	05	40	12,5
17A1 e 17A2	02	40	5,0
31A e 31B	01	40	2,5
35A e 35B	12	40	30
36A e 36B	17	40	42,5
38A e 38B	03	40	7,5
39A e 39B	06	40	15
40A e 40B	03	40	7,5
41A e 41B	13	40	32,5

Figura 21- Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética entre 25 linhagens haplóides de *S. scitamineum* utilizando uma análise conjunta dos dados de AFLP e RFLP-tel. As relações são derivadas a partir do coeficiente Jaccard. A análise de agrupamentos foi feita utilizando-se o método de UPGMA.

5 CONCLUSÕES

A escolha do marcador foi fundamental para revelar diversidade entre os isolados de *S. scitamineum*, sendo que o RFLP-tel revelou um *fingerprinting* de DNA quase que específico para cada isolado, desta forma mais apropriado do que os descritos anteriormente para este fungo.

A quantidade de *loci* AFLP necessária para revelar polimorfismo foi mais alta do que para RFLP-tel.

Com base nos coeficientes de distância e os resultados de atribuição pelo programa *Structure*, foram revelados dois grupos genotípicos homogêneos, que se manteve nas duas técnicas utilizada, possivelmente ocorreram dois eventos independentes de entrada do patógeno no Brasil.

Os derivados haplóides de tipos de reação sexual opostos de cada linhagem dicariótica (teliósporo) permaneceram dentro do mesmo grupo, com exceção de uma única linhagem, desta forma, de maneira geral na natureza, a fusão entre os esporídios deve acontecer entre aqueles que estão mais próximos.

Considerando a análise conjunta de derivados haplóides por teliósporo, foram identificados *loci* heterozigotos. Sendo que em análises moleculares de diversidade genética realizada anteriormente por outros autores, foi revelada uma alta homogeneidade entre eles.

REFERÊNCIAS

- ABAD, J.P.; DE PABLOS, B.; OSOEGAWA, K.; DE JONG, P.J.; MARTIN-GALLARDO, A.; VILLASANTE, A. TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, p. 1620-1624, 2004.
- AI, W.; BERTRAM, P.G.; TSANG, C.K.; CHAN, T.F.; ZHENG, X.F. Regulation of subtelomeric silencing during stress response. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 10, p. 1295-1305, 2002.
- AIMI, T.; KANO, S.; YOTSUTANI, Y.; MORINAGA, T. Telomeric *fingerprinting* of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, p. 95-101, 2002.
- AKAGI, Y.; AKAMATSU, H.; OTANI, H.; KODAMA, M. Horizontal chromosome transfer, a mechanism for the evolution and differentiation of a plant-pathogenic fungus. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 8, n. 11, p. 1732-1738, 2009.
- ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a homolog of the *bE* mating- type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 1189-1192, 1996.
- ALEXANDER, K.C.; SRINIVASAN, K.C. Sexuality in *Ustilago scitaminea*. **Sydney Current Science**, Sydney, v. 35, p. 603-604, 1966.
- ALEXANDER, K.C.; RAMAKRISHNAN, K. Infection of the bud, establishment in the host and production of whips in sugarcane (*Ustilago scitaminea*). **Proceedings International Society Sugarcane Technology**, São Paulo, v.17, p. 1453-1455, 1980.
- APPEZZATO, B.G.; ALBERNAS, M.C.C.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Morphological characteristics of sugarcane clones, susceptible and resistant to smut (*Ustilago scitaminea*). In: RAO, G.P.; BERGAMIN FILHO, A.; MAGAREY, R.C.; AUTREY, L.J.C (Org). **Sugarcane Pathology**, New Hampshire; Enfield: Science Publishers, 1999, v. 1, p. 167-182.
- BAKKEREN, G.; KRONSTAD, J.W. Conservation of the *b* mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 1, 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 of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 15, p. 7085-7089, 1994.
- BAKKEREN, G.; KÄMPER, J.; SCHIRAWSKI, J. Sex in smut fungi: *Structure*, function and evolution of mating-type complexes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 15-21, 2008.

BAKKEREN, G.; KRONSTAND, J.M.; LÉVESQUE, C.A. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in *Ustilaginomycetes*. **Mycologia**, New York, v. 92, n. 3, p. 510-521, 2000.

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 Interactions**, Saint Paul, v. 5, n. 4, p. 347-355, 1992.

BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Tag Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.67, n. 1, p. 35-43, 1983.

BENTES, J.L.S.; COSTA NETO, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 2, p. 251-256, 2011.

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.

BLACKBURN, E.H.; GALL, J.G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. **Journal Molecular Biology**, San Diego, v. 120, p. 33-53, 1978.

BOEGER, J.M.; CHEN, R.S.; McDONALD, B.A. Gene flow between populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1148-1154, 1993.

BÖLKER, M. *Ustilago maydis* – a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 6, p. 1395-1401, 2001.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B.P.H.J.; CARMONA, E.; BORROTO, C.J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 1115-1121, 2005.

BOUCIAS, D.G.; TIGANO, M.S.; SOSA-GOMEZ, D.R.; GLARE, T.R.; INGLIS, P.W. Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 124-138, 2000.

BRAITHWAITE, K.S.; BAKKEREN, G.; CROFT, B.J.; BRUMBLEY, S.M. Genetic variation in a worldwide collection of the sugarcane smut fungus *Ustilago scitaminea*. In: AUSTRALIAN SOCIETY SUGARCANE TECHNOLOGIST CONGRESS, 2004, Mackay, **Proceedings...** Mackay: AuSSCT, 2004. v. 26. p. 224-232.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução a análise de agrupamentos**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, Rio de Janeiro, 1990. 105p.

CAPPER, R.; BRITT-COMPTON, B.; TANKIMANOVA, M.; ROWSON, J.; LETSOLO, B.; MAN, S.; HAUGHTON, M.; BAIRD, D.M. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 21, p. 2495-2508, 2007.

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.

COMSTOCK, J.C. Smut. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SALEM SAUMTALLY, A (Ed). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD-ISSCT, 2000. p. 181-189.

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.2005. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/sc008/>. Acesso: 20 jun. 2012.

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

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf. Acesso em: 05 jul. 2012

COOPER, J.A.; SEPT, D. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. In: JEON, K. (Ed). **The International Review of Cell and Molecular Biology**. Knoxville: Elsevier, 2008. v.267, p. 183-206.

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Boletim Técnico Copersucar**, Piracicaba, n. 36-87, p. 83, 1987.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver straining. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

DENAYROLLES, M.; DE VILLECHENON, E.P.; LONVAUD-FUNEL, A.; AIGLE, M. Incidence of SUC-RTM telomeric repeated genes in brewing and wild strains of *Saccharomyces*. **Current Genetics**, Heidelberg, v. 31, n. 6, p. 457-461, 1997.

DIOH, W.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J.L.; ORBACH, M.; LEBRUN, M.H. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, n. 2, p. 217-227, 2000.

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

FABRE, E.; MULLER, H.; THERIZOLS, P.; LAFONTAINE, I.; DUJON, B. Comparative genomics in Hemiascomycete Yeast: Evolution of sex, silencing, and subtelomeres. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, n. 4, p. 856-873, 2005.

FATTAH, A.I.; ALAMRI, S.R.; ABOU-SHANAB, A.I.; HAFEZ, E.E. *Fingerprinting of Ustilago scitaminea* (Sydom) in Egypt using differential display technique: Chitinase gene the main marker. **Research Journal of Agriculture and Biological Science**, Faisalabad, v. 5, n. 5, p. 674-679, 2009.

FERREIRA, S.A.; COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Disease of Sugarcane—Major Diseases**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 211-229.

FIGUEIREDO, L.M.; ROCHA, E.P.; MANCIO-SILVA, L.; PREVOST, C.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; SCHERF, A. The unusually large Plasmodium telomerase *reverse*-transcriptase localizes in a discrete compartment associated with the nucleolus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 1111-1122, 2005.

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

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

GenBank. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> Acesso em: 05 jul. 2011.

GILLASPIE, A.G Jr.; MOCK, R.G.; DEAN, J.L. Differentiation of *Ustilago scitaminea* isolates in greenhouse tests. **Plant Diseases**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 373-375, 1983.

GIRE, V. Dysfunctional telomeres at senescence signal cell cycle arrest Chk2. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 3, p. 1217-1220, 2004.

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

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

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

HUNT, C.; MOORE, K.; XIANG, Z.; HURST, S.M.; McDOUGALL, R.C.; RAJANDREAM, M.A.; BARREL, B.G.; GWILLIAM, R.; LYNE, M.H.; AVES, S.J. Subtelomeric sequence from the right arm of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I contains seven permease genes. **Yeast**, Davis - Califórnia, v. 18, n. 4, p. 355-361, 2001.

INGLIS, P.W.; MAGALHÃES, B.P.; VALADARES-INGLIS, M.C. Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 179, p. 49-52, 1999.

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

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

KÄMPER, J.; KAHMANN, R.; BÖLKER, M.; MA, L.J.; BREFORT, T.; SAVILLE, B.J.; BANUETT, F.; KRONSTAD, J.W.; GOLD, S.E.; MÜLLER, O.; PERLIN, M.H.; WÖSTEN, H.A.B.; VRIES, R.; RUIZ-HERRERA, J.; REYNAGA-PÉÑA, C.; SNETSELAAR, K.; MCCANN, M.; PÉREZ- MARTIN, J.; FELDBRÜGGE, M.; BASSA, C.W.; STEINBERG, G.; IBEAS, J.; HOLLOMAN, W.; GUZMAN, P.; FARMAN, M.; STAJICH, J.E.; SENTRANDREU, R. GONZÁLES-PRIETO, J.M.; KENNEL, J.C.; MOLINA, L.; SCHIRAWKI, J.; MENDOZA-MENDOZA, A.; GREILINGER, D.; MÜNCH, K.; RÖSSEL, N.; SCHERER, M.; VRANES, M.; LADENDORF, O.; VINCON, V.; FUCHS, U.; SANDROCK, B.; MENG, S.; HO, E.C.H.H.; CAHILL, M.J.; BOYCE, K.J.; KLOSE, J.; KLOSTERMAN, S.J.; DEELSTRA, H.J.; ORTIZ-CASTELLANOS, L.; LI, W.; SANCHEZ-ALONSO, P.; SCHREIRER, P.H.; HÄUSER-HAHN, I.; VAUPEL, M.; KOOPMANN, E.; FRIEDRICH, G.; VOSS, H.; SCHLÜTER, T.; MARGOLIS, J.; PLATT, D.; SWIMMER, C.; GNIRKE, A.; CHEN, F.; VYSOTSKAIA, V.; MANNHAUPT, G.; GÜLDENER, U.; MÜNSTERKÖTTER, M.; HAASE, D.; OESTERHELD, M.; MEWES, H.W.; MAUCELI, E.W.; DeCAPRIO, D.; WADE, C.M.; BUTLER, J.; YOUNG, S.; JAFFE, D.B.; CALVO, S.; NUSBAUM, C.; GALAGAN, J.; BIRREN, B.W. *Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis*. Germany, **Nature**, London, v. 444, p. 97-101, 2006.

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

KINSCHERF, T.G.; LEONG, S.A. Molecular analysis of the karyotype of *Ustilago maydis*. **Chromosoma**, Paris, v. 96, n. 6, p. 427-433, 1988.

KOHLI, Y.; KOHN, L.M. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, p. 139-149, 1998.

LAO, M.; ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; ACEVEDO, R.; RODRÍGUEZ, E.; LEÓN, O.; SANTANA, I. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 6, p. 1103-1111, 2008.

LEE-LOVICK, G. Smut of sugarcane *Ustilago scitaminea*. **Review of Plant Pathology**, Farnham Royal, v. 57, n. 5, p. 181-188, 1978.

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

LEGAZ, M.E.; SANTIAGO, R.; ARMAS, R.; ALARCÓN, B.; DÍAZ, E.M.; SÁNCHEZ-ELORDI, E.; SACRISTÁN, M.; FONTANIELLA, B.; MILLANES, A.M.; BLANCH, M.; VICENTE, V. Molecular defence response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) to smut (*Sporisorium scitamineum* (Syd.)). **Science Against Microbial Pathogens**, Badajoz, v. 6, p. 1244-1249, 2002.

LIU, L.; DIGIROLAMO, C.M.; NAVARRO, P.A.A.S.; BLASCO, M. A.; KEEFE, D.L. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cell. **Experimental Cell Research**, New York, v. 294, p. 1-8, 2004.

LEVIS, C.; GIRAUD, T.; DUTERTRE, M.; FORTINI, D.; BRYGOO, Y. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 157, p. 267-272, 1997.

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.

LLOYD, H.L.; NAIDOO, G. Chemical assay potentially suitable for determination of smut resistance for sugarcane cultivars. **Plant Diseases**, Saint. Paul, v. 67, n. 10, p. 1103-1105, 1983.

MARTINEZ, M.; MEDINA, I.; NARANJO, S.; RODRIGUEZ, C.W.; ARMAS, R.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Changes of some chemical parameters, involved in sucrose recovery from sugarcane juices, related to the susceptibility or resistance of sugarcane plants to smut (*Ustilago scitaminea*). **International Sugar Journal**, Kent, v. 102, n. 1221, p. 445-448, 2000.

McDONALD, B.A.; MARTINEZ, J.P. DNA *fingerprinting* of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). **Experimental Mycology**, Orlando, v. 15, n.12, p. 146-158, 1991.

McDONALD, B.A.; MILES, J.; NELSON, L.R.; PETTWAY, R.E. Genetic variability in nuclear DNA in field population of *Stagonospora nodorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 250-255, 1994.

McDONAGH, A.; FEDROROVA, N.D.; CRABTREE, J.; YU, Y.; KIM, S.; CHEN, D.; LOSS, O.; CAIRNS, T.; GOLDMAN, G.; ARMSTRONG-JAMES, D.; HAYNES, K.; HAAS, H.; SCHRETTI, M.; MAY, G.; NIERMAN, W.C.; BIGNELL, E. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive Aspergillosis. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 4, p. 1-21, 2008

McEACHERN, M.J.; IYER, S. Short Telomeres in yeast are highly recombinogenic. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 7, p. 695-704, 2001.

MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. Sugarcane functional genomics: Gene Discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2008, p. 1-11, 2008.

MENNUCCI, L.; ROJAS, S.; CAMARGO, E.P. Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 404, p. 249-256, 1975.

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

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K.(Ed.). **Marcadores Moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 17-28.

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

ORBACH, M.J.; FARRAL, L.; SWEIGARD, J.A.; CHUMLEY, F.G.; VALENT, B.A. telomeric avirulence gene determines efficacy for rice blast resistance gene *Pi-ta*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 11, p. 2019-2032, 2000.

PADMAVATHI, J.; DEVI, K.U.; RAO, C.U.M.; REDDY, N.N.R. Telomere *fingerprinting* for assessing chromosome number, isolate typing and recombination in the entomopathogen *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 572-580, 2003.

PALM, W.; LANGE, T. How Shelterin protects mammalian telomeres. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 42, p. 301-334, 2008.

PÉREZ-ORTÍN, J.E.; QUEROL, A.; PUIG, S.; BARRIO, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, p. 1533-1539, 2002.

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

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

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype data. **Genetics**, Bethesda, v.155, p. 945-959, 2000.

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

- RACHIDI, N.; MARTINEZ, M.J.; BARRE, P.; BLONDIN, B. *Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 35, n. 6, p. 1421-1430, 2000.
- RAGO, 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.
- RAJAM, M.V.; WEINSTEIN, L.H.; GALSTON, A.W. Inhibition of uredospore germination and germ tube growth by inhibitors of polyamine metabolism in *Uromyces phaseoli* L. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.30, p.37-41, 1989.
- REHMEYER, C.; LI, W.; KUSABA, M.; KIM, Y.S.; BROWN, D.; STABEN, C.; DEAN, R.; FARMAN, M. Organization of chromosome ends in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, n. 17, p. 4685-4701, 2006.
- RODRIGUEZ, E.; LAO, M.; GAGO, S.; ESPINO, A.; ACEVEDO, R.; MUÑIZ, Y. Razas patogénicas del carbon de la caña de azúcar en Cuba. **Cuba Azúcar**, Cuba, v. 31, p. 34-38, 2001.
- RUIZ-HERRERA, J. Polyamines, DNA methylation and fungal differentiation. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v.20, p. 143-150, 1994.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p.
- SÁNCHEZ-ALONSO, P.; VALVERDE, M.E.; PAREDES-LÓPEZ, O.; GUZMÁN, P. Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. **Microbiology**, Reading, v. 142, n. 10, p. 2931-2936, 1996.
- SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 24, p. 90-91, 1998.
- SANTOS, A.S. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar. 2003. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/>. Acesso em: 22 jun.
- SCHENCK, S. New race of sugarcane smut on MAUI. **Hawaii Agriculture Research Center**, Aiea, v. 69, p. 1-4, 2003.
- SCHIRAWSKI, J.; MANNHAUPT, G.; MÜNCH, K.; BREFORT, T.; SCHIPPER, K.; DOEHLEMANN, G.; DI STAGIO, M.; RÖSSEL, N.; MENDOZA-MENDOZA, A.; PESTER, D.; MÜLLER, O.; WINTERBERG, B.; MEYER, E.; GHAREEB, H.; WOLLENBERG, T.; MÜNSTERKÖTTER, M.; WONG, P.; WALTER, M.; STUKEBENBROCK, E.; GÜLDENER, U.; KAHMANN, R. Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. **Science**, Washington, v. 330, p. 1545-1548, 2010.
- SHAPIRA, R.; ALTMAN, A.; HENIS, Y.; CHET, I. Polyamines and ornithine decarboxylase activity during growth and differentiation in *Sclerotium rolfsii*. **Journal General Microbiology**, Reading, v. 135, p. 1361-1367, 1989.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PYLLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Science**, Chicago, v. 167, n. 5, p. 987-994, 2004.

SINGH, K.; BUDHRAJA, T.R. The role of bud scales as barriers against smut infection. **Proceedings Biennial Conference Sugarcane Research Development**. New York, v. 5, p. 687-690, 1964.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PYLLAY, D. Molecular, profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 247, p. 7-15, 2005.

SLIJEPCEVIC, P.; AL-WAHIBY, S. Telomere biology: integrating chromosomal em protection with DNA damage response. **Chromosoma**, Berlin, v. 114, n. 4, p. 275-285, 2005.

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

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? **The Plant Cell**, Rochville, v. 19, n. 11, p. 3318-3326, 2007.

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

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A mini-review on smut disease of sugarcane caused by *Sporisorium scitamineum*. 2012. Botany. MWORIA, J.K. ISBN: 978-953-51-0355-4, Intech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/botany/-a-mini-review-on-the-status-of-smut-disease-of-sugarcane-caused-by-sporisorium-scitamineum-> Acesso em: 28 jun.2012

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. PVCLUST: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 1540-1542, 2006.

TEIXEIRA, M.T.; GILSON, E. Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. **Chromosome Research**, Dordrecht, v. 13, p. 535-548, 2005.

THAM, W.H.; ZAKIAN, V.A. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organism. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 4, p. 512-521, 2002.

TOKESHI, H. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.) In: KIMATH, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 207-225.

TRIONE, E.J.; STOCKWELL, V.O.; AUSTIN, H.A. The effects of polyamines on the growth and development of the wheat bunt fungi. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 149, p. 173-178, 1988.

UENG, P.P.; BERGSTROM, G.C.; SLAY, R.M.; GEIGER, E.A.; SHANER, G.; SCHAREN, A.L. Restriction fragment length polymorphisms in the wheat glume blotch fungus, *Phaeosphaeria nodorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, n. 11, p. 207-225, 1997.

VERSTREPEN, K.J.; JANSEN, A.; LEWITTER, F.; FINK, G.R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Naturals Genetic**, New York, v. 37, n. 9, p. 986-990, 2005.

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

XIA, J.Q.; CORRELL, J.C.; LEE, F.N.; MARCHETTI, M.A.; RHOADS, D.D. DNA *fingerprinting* to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 83, n. 10, p. 1029-1035, 1993.

XU, J.R.; PENG, T.L.; DICKMAN, M.B.; SHARON, A. The dawn of fungal pathogen genomics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 337-366, 2006. .

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenia I. Epidemiology. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v. 52, p. 139-151, 1969.

WALTERS, D.R.; MACKINTOSH, C.A.; Control of plant disease by perturbation of fungal polyamine metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 689-695, 1997.

WU, C.; KIM, Y.S.; SMITH, K.M.; LI, W.; HOOD, H.M.; STABEN, C.; SELKER, E.U.; SACHS, M.S.; FARM, M.L. Characterization of chromosome ends in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Genetics**, Palo Alto, v. 181, n. 3, p. 1129-1145, 2009.

WU, K.K.; BURNQUIST, W.; SORRELLS, M.E.; TEW, T.L.; MOORE, P.H. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p. 294-300, 1992.