

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

**Avaliação da expressão de genes do fungo *Sporisorium scitamineum*
durante a interação com plantas de cana-energia com diferentes níveis
de resistência ao carvão**

Marcella Ferreira

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

**Piracicaba
2023**

Marcella Ferreira
Engenheira Agrônoma | Licenciada em Ciências Agrárias

Avaliação da expressão de genes do fungo *Sporisorium scitamineum* durante a interação com plantas de cana-energia com diferentes níveis de resistência ao carvão

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

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

Piracicaba
2023

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

Ferreira, Marcella

Avaliação da expressão de genes do fungo *Sporisorium scitamineum* durante a interação com plantas de cana-energia com diferentes níveis de resistência ao carvão / Marcella Ferreira. - - Piracicaba, 2023.

59 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Efetores 2. Expressão gênica 3. Doença do carvão 4. Cana-energia 5. Interação planta-patógeno I. Título

À minha família, com meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças a contribuição de algumas pessoas e instituições, pois a união é a força que nos move.

Sou grata a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) por todo o suporte, estrutura e por fornecer as bases acadêmicas necessárias para o desenvolvimento científico desde minha graduação até este momento de conclusão de minha dissertação de Mestrado. Desejo poder continuar me valendo disso.

Agradeço o Serviço de Pós-graduação e o Programa de Pós-graduação em Fitopatologia por essa oportunidade de aprimoramento, todos os professores que trazem suas experiências e nos abrem o caminho para o aprendizado, todos os funcionários que trabalham para que esse caminho flua com mais leveza e organização. Meus sinceros agradecimentos a Rodrigo Fray da Silva, Rodrigo Alves Pessanha e Lucas Pavão Zanoni, que me deram especial atenção quanto aos procedimentos burocráticos e facilitaram muito para que tudo acontecesse de forma mais tranquila, assim como a Eliana Maria Garcia, pelo suporte na revisão da dissertação e conclusão dessa fase.

Gratidão a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro, viabilizando a dedicação a esse trabalho.

A José Antonio Bressiani, representando a empresa GranBio, pelo fornecimento do material vegetal necessário a este estudo e também a Gabriella Arena, pelo suporte na análise dos resultados obtidos.

Sou imensamente grata a minha orientadora Dra. Cláudia Barros Monteiro-Vitorello, um exemplo em muitos aspectos. Grata pela confiança, competência, apoio, responsabilidade. Sou muito feliz de poder trabalhar ao lado de uma profissional séria, que tem amor pelo que faz. Gratidão pela mão estendida nos momentos de dificuldade e por nos proporcionar um ambiente de harmonia, estando ao nosso lado sempre.

Agradeço o Departamento de Genética, onde está situado o Laboratório de Genética de Microrganismos “João Lúcio de Azevedo”, no qual meus experimentos puderam ser desenvolvidos. Ao GENOMICs Group: Elaine Vidotto, Hugo Rody, Thiago Maia, Deepak Sehgal, Thaís Dal’Sasso, Gustavo Lima, Tiarla Souto, Gustavo Crestana, Renato Bombardelli, Jéssica Mendes, Joyce Ferreti, Gustavo Husein, Enrico Diniz, Gabriela Romero, Lâina Oliveira, Mariana Braga, Pedro Vilanova, Mauricio Jampani, Jonathan Macedo, Ana Júlia Franceschi, João Ferro e os membros que vieram antes, em especial a Natália Teixeira e Leila Peters, cujos trabalhos me forneceram bases fundamentais. Trabalhar com esse grupo é estar na companhia de amigos. Agradeço de coração a Joyce e Gustavo Crestana pela parceria em todos os momentos da realização deste estudo.

Agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceitado meu convite e contribuído para este trabalho e minha formação profissional.

Sou grata a minha família, meus pais Maurício José Ferreira e Rosélis Gomes Ferreira e ao meu companheiro, Endryo Miranda Rodrigues, por estarem ao meu lado nos momentos em que mais preciso. O amor de vocês me faz caminhar melhor. A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse neste momento.

Sou grata a Deus, por tudo isso ser possível. A Luz que nos inspira a sermos melhores todos os dias.

*“O progresso do homem na ciência
Tudo isso obedece a providência
A vontade do Pai celestial”*

(“O Criador” – Composição de Edgar Ferreira)

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. A DOENÇA DO CARVÃO DA CANA.....	9
1.1. Cana-de-açúcar e cana-nergia.....	9
1.2. O carvão da cana.....	14
1.3. Dinâmica da interação patógeno-hospedeiro.....	20
1.4. Efetores em fungos causadores de carvão.....	24
Referências.....	27
2. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DO FUNGO <i>Sporisorium scitamineum</i> DURANTE A INTERAÇÃO COM PLANTAS DE CANA-ENERGIA.....	35
Resumo.....	35
Abstract.....	35
Referências.....	57

RESUMO

Avaliação da expressão de genes do fungo *Sporisorium scitamineum* durante a interação com plantas de cana-energia com diferentes níveis de resistência ao carvão

A cana (*Saccharum* spp.) representa uma cultura de importância mundial e tem sido melhorada geneticamente por diversos programas e em muitos sentidos devido à sua versatilidade de uso. Essa planta foi primariamente utilizada para a produção de açúcar e pensando-se na proposta de utilização de fontes de energia mais sustentáveis, a chamada “cana-energia” tem sido desenvolvida com maior teor de fibra, biomassa e robustez, atributos para a produção do etanol celulósico. Além disso, a cana-energia suporta condições de maior escassez de água e nutrientes, podendo ser cultivada em locais cuja aptidão agrícola é inferior. Um dos fatores que afetam a produtividade da cultura é a incidência de doenças. A doença denominada “carvão da cana-de-açúcar” causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum* é considerada uma das mais importantes e ocorre em quase todos os países produtores de cana do mundo. Sua severidade varia amplamente, desde proporções negligenciáveis a sérias perdas. A resistência a essa doença se destaca como atributo chave na seleção de novas cultivares de cana-energia em programas de melhoramento genético. O presente estudo revisou a doença do carvão abordando os aspectos do patógeno, da planta hospedeira e a interação entre ambos. Também apresentou uma análise de genes selecionados do patógeno em termos de expressão durante o momento inicial da infecção de variedades de cana-energia com perfis contrastantes de suscetibilidade à doença. Foram observadas variações no padrão de expressão entre o conjunto de genes selecionados que refletem sua atuação e importância para a dinâmica fitopatológica. Os resultados obtidos nesse trabalho podem contribuir para a ampliação do conhecimento acerca da interação do patógeno com a cana-energia e para impulsionar novos estudos acerca dos mecanismos de suscetibilidade/resistência e virulência, servindo de base para a tomada de decisão em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Efeitos, Expressão gênica, Doença do carvão, Cana-energia, Interação planta-patógeno

ABSTRACT

Gene expression evaluation of the fungus *Sporisorium scitamineum* genes during interaction with energy cane plants with different levels of resistance to smut disease

Sugarcane (*Saccharum* spp.) represents a crop of world importance and has been genetically improved by several programs and in many ways due to its versatility of use. This plant was primarily used for the production of sugar and considering the proposal to use more sustainable energy sources, the “energy cane” has been developed with a higher fiber content, biomass and robustness, attributes for the production of cellulosic ethanol. In addition, energy cane withstands conditions of water and nutrient scarcity, and can be cultivated in places with lower agricultural suitability. One of the factors that affect crop productivity is the incidence of diseases. The disease called “sugarcane smut” caused by the fungus *Sporisorium scitamineum* is considered one of the most important and occurs in almost all sugarcane producing countries in the world. Its severity varies widely, from negligible proportions to serious losses. Resistance to this disease stands out as a key attribute in the selection of new energy cane cultivars in genetic improvement programs. The present study reviewed the smut disease introducing aspects of the pathogen, the host plant and the interaction between both. It also presented an analysis of selected genes of the pathogen in terms of expression during the initial time of infection of energy cane varieties with contrasting disease susceptibility profiles. Variations in the expression pattern were observed among the set of selected genes that reflect their performance and importance for the phytopathological dynamics. The results obtained in this work can contribute to the expansion of knowledge about the interaction of the pathogen with energy cane and to promote new studies about the mechanisms of susceptibility/resistance and virulence, serving as a basis for decision-making in genetic improvement programs .

Keywords: Effectors, Gene expression, Smut disease, Energy cane, Plant-pathogen interaction

1. A DOENÇA DO CARVÃO DA CANA

1.1 Cana-de-açúcar e cana-energia

Pertencente à Família Poaceae, a cana-de-açúcar é uma planta originária do Sudeste Asiático, da região da Nova Guiné e Indonésia (MOZAMBANI et al., 2006). Trata-se de uma monocotiledônea cultivada amplamente ao redor do mundo devido à sua versatilidade de utilização e elevada produção de açúcar, etanol e biomassa. As variedades modernas são híbridos provenientes do cruzamento entre várias espécies do gênero *Saccharum*, inicialmente com a associação das características de bom acúmulo de sacarose da *S. officinarum* com boa adaptação e resistência a doenças da *S. spontaneum* (MARIN, 2014). O vigor da *S. robustum* e também algumas características de *S. barberi* e *S. sinense* influenciaram o processo de hibridação para constituir a cana contemporânea (DILLON et al., 2007; YU et al., 2018).

O Brasil, onde a planta chegou poucos anos após o chamado “descobrimento”, tem sua história marcada pelo desenvolvimento dessa cultura em seu território, se consolidando ao longo dos anos como principal produtor mundial. O setor sucroenergético atual gera um PIB de aproximadamente US\$ 40 bilhões, o equivalente a 2% do PIB brasileiro e é um dos setores que mais gera empregos diretos e indiretos (UNICA, 2023). Recentemente, o Ministério do Consumidor, Alimentação e Distribuição Pública divulgou dados de produção da temporada 2021/2022 constatando a emergência da Índia como maior produtor e consumidor mundial de açúcar, com produção de aproximados 39 milhões de toneladas, superando os 35 milhões de toneladas produzidas pelo Brasil no mesmo período, fato que foi atribuído à movimentação dos preços internacionais e à política de apoio do governo indiano e repercutiu na mídia.

Em meados da década de 1970, a economia mundial dependente de matéria-prima energética estrangeira mostrou sua fragilidade ao se deparar com a Crise do Petróleo, o que desencadeou uma busca geral por fontes alternativas de energia que pudessem reduzir ou substituir o uso de combustíveis fósseis. O Brasil se destacou no período, iniciando um projeto de produção em massa de etanol a partir da fermentação da sacarose da cana-de-açúcar para ser utilizado como combustível para carros. Esse projeto de energia renovável ganhou ainda mais prestígio quando se intensificou o debate sobre sustentabilidade ambiental (MATSUOKA et al., 2014).

Em meio a esse contexto e ao declínio da indústria canavieira local, na década de 1980, em Porto Rico, um pesquisador chamado Alex Getchell Alexander iniciou uma jornada em busca de transformar a concepção da planta de cana que se tinha até então: a proposta de seu grupo de pesquisa era convencer a comunidade científica, principalmente voltada ao

melhoramento genético da planta, de que explorar a sua produção de fibra/biomassa seria mais lucrativo do que exclusivamente focar na produção de açúcar. Com incentivos federais, o grupo de pesquisa conduziu um programa multidisciplinar de manejo e avaliação de cultivares, a partir do qual foi cunhado o termo “cana-energia”. O conceito inicial de Alexander era mais voltado à forma de utilização da cana convencional, isto é, cana-energia designava a cana convencional que passou a ser aproveitada para a produção de biomassa, gerando uma série de produtos em vez de ser destinada apenas às usinas de açúcar. Porém, conforme os programas de melhoramento genético passaram a incorporar o objetivo de geração de energia à cana, cana-energia passou a designar uma cana selecionada para ter mais fibras em sua composição, o que é obtido simplesmente alterando-se a contribuição genética das espécies ancestrais de cana-de-açúcar, usando métodos tradicionais de melhoramento (MATSUOKA et al., 2014).

Uma série de culturas são estudadas para a produção de bioetanol, entre as quais a cana merece destaque (CARVALHO-NETTO et al., 2014). Sendo uma planta C4, a cultura apresenta alta eficiência fotossintética, apresentando um dos maiores acúmulos de matéria seca conhecidos, que a qualifica para tal finalidade (DINIZ et al., 2019). Alta produção em curto período, rápido crescimento, tolerância à seca, tolerância à baixas temperaturas e à escassez de nutrientes e baixa exigência de energia para desenvolvimento são características desejáveis para as chamadas “culturas energéticas”, além de reduzida ocupação de área e baixo custo de produção de energia a partir da biomassa (WACLAWOVSKY et al., 2010; MATSUOKA et al., 2014), atributos que se encaixam com essa cultura.

As variedades de cana-energia podem ser classificadas em duas categorias, segundo Tew e Cobil (2008): Tipo I, representada pela cana mais próxima da cana convencional em teor de sacarose, mas maior teor de fibra; e Tipo II, com teor marginal de açúcar e teor de fibra superior ao Tipo I, usado para produção de biomassa. Observando-se um canavial de cana-energia comparativamente a um de cana convencional, nota-se uma lâmina foliar mais estreita, caule mais fino e perfilhamento abundante. O sistema radicular da cana-energia é abundante e vigoroso, superando o da cana convencional em extensão lateral, profundidade e volume, o que permite que tolerem o estresse hídrico e desta maneira possam ser cultivadas em terras marginais, trazendo para essas áreas uma produção útil, auxiliem a mitigar a erosão do solo e contribuam para sua estruturação (MATSUOKA et al., 2014). Graças ao vigoroso rizoma característico dessas variedades, pode-se prever 10 a 12 soqueiras ou mesmo mais (CARVALHO-NETTO et al., 2014).

A empresa pioneira na produção de híbridos de cana-energia foi a Canavialis, empresa privada de melhoramento de cana-de-açúcar. Outras empresas e programas tradicionais de melhoramento vem desenvolvendo suas próprias cultivares a partir do cruzamento de cultivares comerciais desenvolvidos a partir de *S. officinarum* com *S. spontaneum*. A empresa GranBio Investimentos S.A.¹ vem trabalhando no desenvolvimento de variedades de cana-energia desde o ano de 2011, se destacando como um dos principais programas de melhoramento nessa área. Os pesquisadores buscaram valorizar as características desejáveis à produção de bioenergia e chegaram às suas variedades a partir de sementes e mudas ancestrais obtidas em bancos de germoplasmas nacionais e internacionais. Até o momento a empresa lançou 11 variedades de Cana Energia “Vertex” (nome comercial), sendo que o primeiro plantio comercial foi realizado em 2015 (CURSI et al., 2022).

Os programas de melhoramento tradicionais geralmente consideram entre as características para seleção de novas cultivares a alta produtividade voltada ao açúcar, resistência a doenças, brotação, capacidade de soca (que adquiriram maior importância com a implantação da colheita mecanizada), estabilidade de rendimento, adaptabilidade, hábito de crescimento ereto, ausência de floração, tolerância a estresses abióticos. Em se tratando de cana-energia, a GranBio busca por variedades com o seguinte perfil: elevado potencial de produção de biomassa; alta densidade energética (matéria-prima eficiente); alta resistência a estresses bióticos e abióticos – permitindo produção com menos insumos e em locais de menor valor agrônômico –; sistema radicular vigoroso (CURSI et al., 2022). Além disso, a empresa GranBio considera que as variedades de cana-energia Tipo II tenham o dobro do teor de fibra no médio prazo, teor de açúcar no caldo 20 a 50% menor em relação à cana-de-açúcar, ciclo de melhoramento mais rápido (4-6 anos) e taxa de multiplicação superior. Com isso, estabeleceu o seguinte conceito de produto, conforme a Tabela 1.

1

¹ GranBio Investimentos S.A. website: <http://www.granbio.com.br/>

Tabela 1 – Diferença entre as características da cana-de-açúcar e cana-energia (tipo I e II). Adaptada de (CURSI et al., 2022)

Característica	Cana-de-açúcar	Vertix tipo I	Vertix tipo II
Produtividade (X)	X	>1,5X	>2,0X
Açúcar (kg/t)	150	>100	<100
Fibra (%)	15	18 a 22	>25
Número de cortes	4 a 5	8 a 10	>10
Resistência a pragas e doenças	+	++	+++
Uso industrial	Açúcar e etanol	Açúcar, etanol e energia	Etanol de 1 ^a e 2 ^a geração, Bioquímicos, Energia e Biometano

De Abreu e colaboradores (2020) realizaram experimento no qual foram observadas algumas diferenças entre o desenvolvimento da cana-energia comparativamente à cana-de-açúcar, empregando variedades Vertix desenvolvidas pela GranBio. Verificou-se que a cana-energia demonstra maior taxa de brotação seguida de rápido desenvolvimento da parte aérea e posterior formação de raízes, ao contrário do que aconteceu para as variedades de cana-de-açúcar utilizadas no experimento. Também se observou que após 50 dias a cana-energia apresentou maior altura, sistema radicular mais desenvolvido, maior número de folhar verdes e perfilhos e folha +1 mais longa. Além disso, os pesquisadores notaram maior taxa de crescimento noturno em cana-energia, o que apontaram como possível fator fisiológico que explica sua maior produtividade em comparação com a cana-de-açúcar (DE ABREU et al., 2020).

A bioeletricidade gerada a partir da cana vem conquistando espaço na matriz elétrica brasileira. Em 2021, o setor sucroenergético produziu 20,2 mil GWh para a rede, o que equivale a cerca de 4% do consumo anual de energia elétrica ou a atender 10,2 milhões de unidades consumidoras residenciais. Esse valor também representa 30,4% da geração de energia elétrica pela Usina Itaipu, 63,5% da geração pela Usina Belo Monte ou 31% de toda a geração termelétrica a gás em 2021, além de reduzir proporcionalmente em 7 milhões de toneladas as emissões de CO₂ (UNICA, 2023).

É conhecido que a produtividade potencial de campo da cana-de-açúcar é de quase 400 toneladas de biomassa fresca por hectare por ano considerando condições ótimas. No entanto, a produtividade comercial média mundial é inferior a 25% desse valor. Isso demonstra que,

embora a cana já apresente sucesso de utilização para o desenvolvimento de uma gama de produtos, existe um considerável potencial de avanço em tecnologia voltado à cultura (WACLAWOVSKY et al., 2010; MATSUOKA et al., 2014).

A produtividade da cana poderia alcançar níveis ainda maiores se não fosse a ocorrência de alguns fatores redutores. As doenças podem ser citadas como um dos principais estresses que acometem a produtividade. O patógeno busca manipular o metabolismo de carboidratos das plantas para atender sua própria necessidade e retira nutrientes, aumentando a demanda por assimilados (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007; PASCHOLATI; DALIO, 2018). Em contrapartida, ocorre diminuição da produção de assimilados fotossintéticos pelo desenvolvimento de áreas cloróticas ou necróticas que alguns patógenos desencadeiam.

Quando em contato com organismos patogênicos, a planta ativa respostas de defesa que incluem a produção de moléculas sinalizadoras como ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e espécies reativas de oxigênio, ativação de fluxos de íons, fosforilação e desfosforilação de proteínas. Essas respostas exigem do metabolismo energético da planta, deslocando a energia que seria utilizada para crescimento em produtividade (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007). Em interações planta-patógeno há o envolvimento de moléculas efetoras secretadas pelos patógenos para suprimir a defesa das plantas, o que compromete ainda mais o metabolismo energético dessas culturas (SANABRIA; HUANG; DUBERY, 2010).

De acordo com a EMBRAPA, já foram identificadas mais de 200 doenças que podem atingir a cana-de-açúcar e mais de 50 delas ocorrem no Brasil. Entre as principais que podem ser consideradas de grande importância econômica para a cultura estão a escaldadura-das-folhas, estria vermelha, raquitismo-da-soqueira, mosaico, amarelinho, ferrugem da cana-de-açúcar, mancha parda, podridão abacaxi, podridão de *Fusarium*, podridão vermelha e carvão da cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018). As doenças mais importantes para a cultura são controladas pelo uso de variedades resistentes, porém essa resistência é de caráter quantitativo, isto é, não é absoluta. Em função disso, as variedades apresentam algum grau de suscetibilidade a tais doenças. Além disso, os patógenos podem gerar variantes capazes de vencer a resistência das plantas ocasionando novos surtos epidêmicos.

Se tratando de cana-energia, existem três principais problemas na seleção das variedades: alta taxa de floração, baixa massa unitária do colmo e alta incidência da doença do

carvão, provocada pela infecção pelo fungo *Sporisorium scitamineum*. Logo, o desafio do melhoramento para o cultivo e consolidação dessas variedades é a utilização de estratégias mais eficientes para superar tais barreiras (DINIZ et al., 2019).

Considerando as espécies intimamente relacionadas à cana, *S. spontaneum* apresenta grande potencial como fonte de variação genética para uma série de características, entre elas adaptabilidade ambiental e resistência a doenças (DA SILVA, 2017). Da Silva ressalta que a análise de genes diferencialmente expressos em *S. spontaneum* associados à susceptibilidade a doença do carvão pode aumentar as chances do encontro de bons genes candidatos a serem utilizados em programas de melhoramento. Ele ainda destaca a importância do *S. spontaneum* para o melhoramento genético da cana-de-energia: “o processo envolvendo os primeiros híbridos de cana-de-açúcar interespecíficos feitos pelo homem, entre a cana “nobre” *S. officinarum* e a cana “selvagem” *S. spontaneum*, em uma série de retrocruzamentos com a cana nobre é conhecido como “nobilização” (*nobilization*). Agora, a utilização recente e crescente de *S. spontaneum* em cruzamentos de hibridação para fins de bioenergia talvez possa ser chamada de “espontaneação” (*spontaneization*).

1.2 O carvão da cana

O fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw, agente causal do carvão da cana-de-açúcar, pertence ao Filo Basidiomycota, Classe Ustilaginomycetes, Ordem Ustilaginales e à Família Ustilaginaceae (SANTIAGO et al., 2009; STOLL et al., 2011). Anteriormente, o fungo fora classificado como *Ustilago scitaminea*, até que estudos referentes à morfologia de sua estrutura reprodutiva e das paredes dos teliósporos (esporos reprodutivos) apontaram para uma mudança no gênero desse microrganismo e levaram Piepenbring e colaboradores a reclassificarem-no como gênero *Sporisorium* (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2013).

O carvão-da-cana foi relatado pela primeira vez na África do Sul em 1877, em um clone de *Saccharum sinense* conhecido como 'China cana' (revisado por vários autores, incluindo (LUTHRA; SATTAR; SANDHU, 1940; WALLER, 1969; LEE-LOVICK, 1978; BAILEY, 1979) e, desde então, sua ocorrência já foi descrita em todas as áreas de cultivo comercial com exceção, até o momento, de Fiji (COMSTOCK; LENTINI, 2005; SUNDAR et al., 2012; TOM; BRAITHWAITE; KUNIATA, 2017; BHUIYAN et al., 2021). A doença atingiu a Argentina em

1940 e logo foi identificada no Brasil, Paraguai e Bolívia (BERGAMIN FILHO et al., 1987; RAGO et al., 2009).

A interação biotrófica fungo-planta leva ao desenvolvimento de uma estrutura formada por tecidos tanto do patógeno quanto do hospedeiro denominada de “chicote”, a característica diagnóstica mais identificável de plantas infectadas (Figura 1), que é responsável pela produção, amadurecimento e liberação dos esporos fúngicos no ambiente (RAJPUT et al., 2021). O direcionamento de grande quantidade de fotoassimilados ao chicote, bem como a profunda alteração do crescimento vegetativo normal do meristema apical da cana-de-açúcar, faz com que as perdas em produção sejam elevadas. A doença caracteriza-se ainda pela redução do diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução no número de perfilhos industrializáveis, aumento de tecido fibroso e perdas no conteúdo de açúcar (COMSTOCK; LENTINI, 2005).

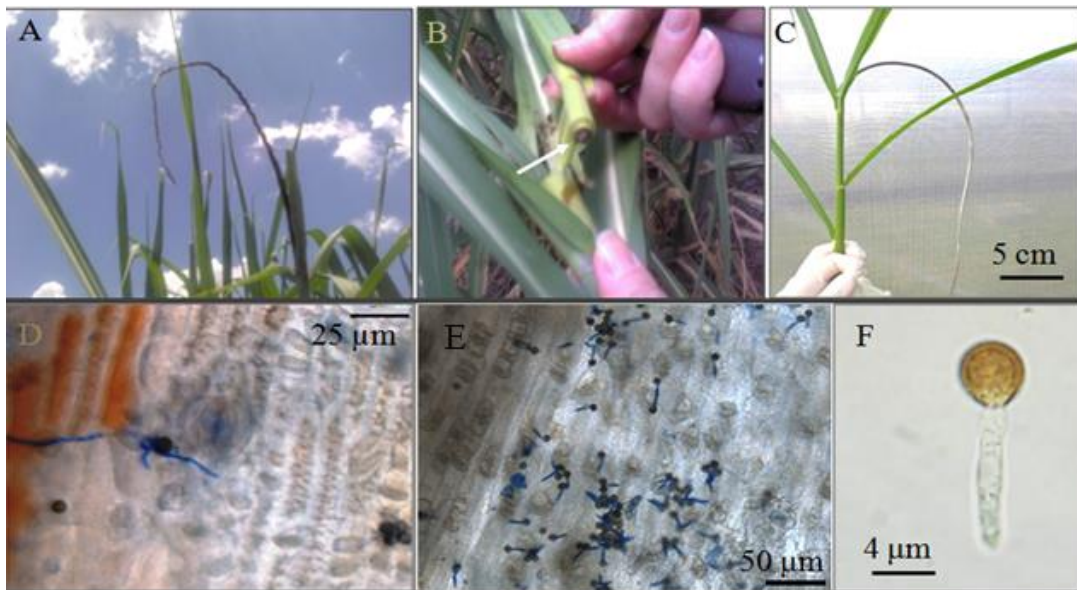


Figura 1 - Características do desenvolvimento do carvão da cana. A) planta em campo sintomática com o desenvolvimento do chicote; B) Corte transversal da planta sintomática, seta aponta para o desenvolvimento do fungo; C) planta suscetível com 45 dias com sintoma; D) tecido meristemático infectado; E) germinação do teliósporo em planta inoculada; F) teliósporo germinado. Figura retirada de LONGATTO et al. (2015).

A designação de carvão se refere à formação massiva de esporos escuros com aparência de “cinza de carvão” espalhados pela planta. Em São Paulo, o carvão foi documentado pela primeira vez no ano de 1946 (CARVALHO, 1948). Na década de 1980 ocorreu a maior epidemia registrada causando 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). O controle da doença foi alcançado através da erradicação de plantas contaminadas e pelo uso obrigatório de cultivares resistentes. Entretanto, nos últimos anos esta exigência deixou de ser mandatória, permitindo assim a manutenção da doença em baixos níveis.

O estabelecimento da doença e as perdas em produção são altamente dependentes da localização geográfica e suas condições climáticas. Sob condições climáticas ótimas, a doença tem o potencial de causar a perda total da safra. (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005; RAJPUT et al., 2021). Segundo Zhao e Li (2015) as mudanças climáticas e práticas de colheita verde impactam diretamente a incidência de doenças na cana-de-açúcar. Destaca-se que a prática da colheita verde reflete na manutenção de esporos do fungo causador do carvão nas socas e as condições de altas temperaturas e seca favorecem a propagação e o progresso da doença (ZHAO; LI, 2015; ZEKARIAS et al., 2016).

O ciclo de vida do fungo (Figura 2) tem início quando os teliósporos diploides ($2n$), provenientes do chicote que se formou em plantas contaminadas, germinam na superfície dos internódios, na forma de pró-basídios. A germinação leva à meiose e formação de quatro núcleos (esporídios ou basidiósporos) haploides (n), de crescimento leveduriforme, compatíveis dois a dois quanto à reação de cruzamento. Quando dois esporídios de tipos sexuais complementares se encontram, eles se fundem dando origem a uma hifa dicariótica infectante. A hifa dicariótica é formada e mantida devido a expressão de genes conservados do sistema de *mating-type* do *locus a* e do *locus b* (ALBERT; SCHENCK, 1996; BAKKEREN; KÄMPER; SCHIRAWSKI, 2008; YAN et al., 2016). O *locus a* possui genes que codificam uma proteína receptora e um feromônio que atuam na etapa de reconhecimento e fusão das células compatíveis e o *locus b* traz genes que codificam para um fator de transcrição heterodimérico que controla a expressão de genes associados à manutenção da hifa dicariótica e infectiva. Esse fator de transcrição regula o acasalamento sexual e/ou o crescimento filamentosos, potencialmente através da modulação do metabolismo da glicose e da resposta oxidativa (YAN et al., 2016) .

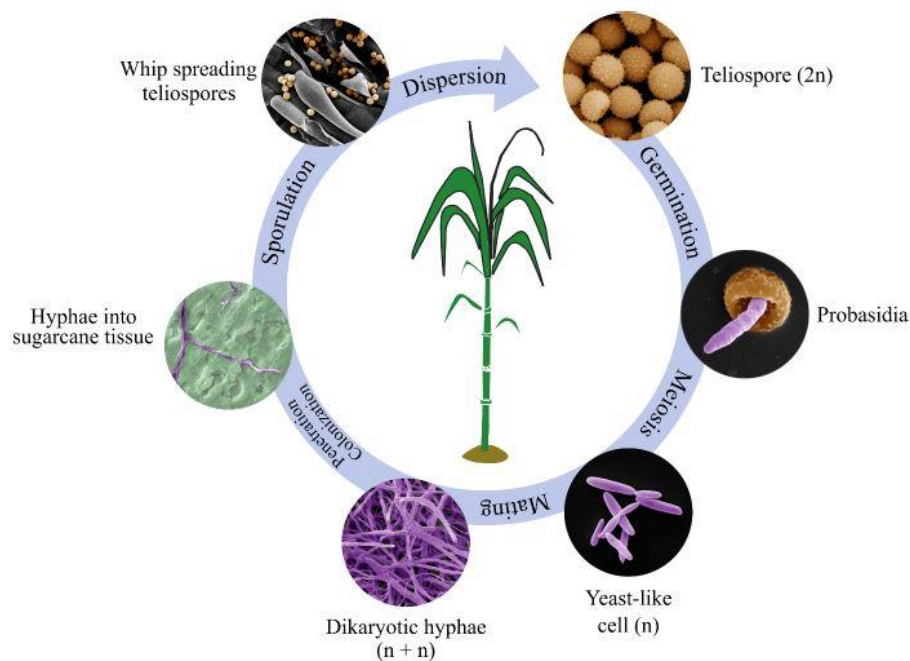


Figura 2 - Ciclo de vida de *S. scitamineum*: teliósporos diplóides ($2n$); pró-basídeo formado após a germinação dos teliósporos; basidiósporos/espórideos haplóides (n) após meiose; reação sexual e formação da hifa dicariótica ($n+n$) infectiva; hifa colonizando os tecidos do hospedeiro até, por fim, o momento da esporulação com a formação do chicote e dispersão de novos teliósporos. Figura adaptada de (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018).

A partir da hifa dicariótica, ocorre a formação do apressório para a penetração dos tecidos (PETERS, 2016). O conjunto de eventos descrito geralmente ocorre entre 6 e 48 horas após os teliósporos terem sido depositados na superfície da cana-de-açúcar (SUNDAR et al., 2012; PETERS et al., 2017; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018). O estudo realizado por Peters e colaboradores (2017) demonstrou que os estágios de desenvolvimento fúngico nos tecidos da cana-de-açúcar apresenta diferenças entre genótipos infectados, em que a germinação dos teliósporos (taxa de 81%) foi precoce às 6 horas após inoculação (hai) no genótipo suscetível (IAC66-6), enquanto atingiu uma taxa máxima de 53% no genótipo resistente (SP80-3280) em 12 hai. Além disso, a formação de apressório foi significativamente maior e precoce no genótipo suscetível comparado ao resistente. A colonização do fungo nos tecidos vegetais culmina com a esporogênese e formação dos teliósporos na estrutura em forma de chicote, que são transportados principalmente pelo vento (SUNDAR et al., 2012; LONGATTO et al.; 2015).

O carvão é basicamente uma doença de tecidos meristemáticos, com um fungo que se propaga em tecidos vegetais jovens e em crescimento ativo. Em termos de infecção pode-se dizer

que a infecção primária ocorre por meio dos teliósporos presentes no solo ou em toletes de cana preparados para o plantio e a infecção secundária através dos esporos disseminados pelo ar de plantas doentes até plantas saudáveis, movimento que pode acontecer a longas distâncias, sobretudo em condições quentes e secas (RAJPUT et al., 2021). Válido salientar que o patógeno pode sobreviver de maneira assintomática em material vegetal de plantio. Os teliósporos podem se conservar viáveis em solo seco por cerca de 6 meses, no entanto a umidade pode inibir sua viabilidade a 2-3 meses (BHUIYAN et al., 2021).

A principal constatação feita em campo de que a planta está infectada pelo carvão é o surgimento de chicotes. Entretanto, essa detecção é tardia e pouco se pode fazer para reparar os danos desencadeados pela doença a partir desse momento. Para detecção precoce, técnicas de biologia molecular e microscopia podem ser empregadas para identificar a presença do fungo (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018). A sequência do gene bE referente ao tipo de reação sexual do fungo assim como a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) podem ser empregadas como alvo através de PCR convencional para detecção do patógeno em poucas semanas após a inoculação (ALBERT; SCHENCK, 1996; SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004; LONGATTO et al., 2015). Um aprimoramento dessa técnica (método quantitativo) já é capaz de detectar o fungo em fase inicial de infecção (12 horas) (SU et al., 2013, 2016b). O método *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) empregando a sequência do gene efetor Pep 1 (gene presente nos fungos causadores de carvão, envolvido na supressão da imunidade vegetal) como alvo é capaz de detectar o patógeno já no primeiro dia após a infecção (SU et al., 2016a).

A doença pode ser efetivamente manejada pela seleção e plantio de cultivares resistentes como a estratégia de controle mais confiável, econômica e eficaz. Instituições brasileiras de pesquisa privadas, estaduais e federais têm ao longo dos anos trabalhado no 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 (BHUIYAN et al., 2021; RAJPUT et al., 2021; CURSI et al., 2022). A verificação de variedades resistentes ao carvão é feita mediante inoculação artificial do patógeno na planta: as gemas presentes no colmo da cana-de-açúcar são imersas numa suspensão de esporos e então avalia-se o comportamento das cultivares em termos de expressão de sintomas ou sinais do patógeno. A porcentagem de chicotes emitidos após seis semanas a dez meses indica o nível de resistência da variedade (ELSTON; SIMMONDS, 1988; LEMMA et al.,

2015). A escala usada para classificar a resistência à doença varia de 0 (imune) a 9 (altamente suscetível) (LATIZA, AMPUSTA & RIVERA, 1980). Uma estratégia também adotada na avaliação das cultivares é a presença de escamas protetoras nas gemas, as quais atrasam a germinação e penetração do fungo (DA GLORIA; ALBERNAS; AMORIM, 1995; PETERS et al., 2017).

Quando se conhece a variação genética existente dentro e entre populações patogênicas em termos de sua quantidade e distribuição, as estratégias de melhoramento e seleção de genótipos de plantas com maior grau de resistência a doenças podem ser otimizadas (MCDONALD; LINDE, 2002). Diferenças quanto à suscetibilidade de variedades de cana-de-açúcar estão relacionadas às diferenças entre genótipos do fungo. Campos contaminados com *S. scitamenium* favorecem a hibridação entre variantes do fungo, permitindo o aparecimento de novas linhagens virulentas (PIEPENBRING, 2002; SCHENCK, 2003). Houve alguns relatos de variedades de cana que se tornaram suscetíveis ao longo do tempo, mas a presença de raças do patógeno é controversa (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018; BHUIYAN et al., 2021).

Os fungicidas fornecem uma defesa preventiva e curativa contra o carvão e são constantemente testados com intuito de comprovar sua eficácia e ajustar formas de aplicação. Algumas opções são tidas como eficazes como químicos do grupo das estrobilurinas e triazóis (RAJPUT et al., 2019, 2021). O controle biológico com o uso de bactérias endofíticas (principalmente *Bacillus* spp.) e fungos antagonistas (especialmente *Trichoderma* spp.) bem como a utilização de extratos vegetais, tem sido explorado e demonstrado alguns resultados positivos em condições experimentais (LAL et al., 2009; JAYAKUMAR; RAMESH SUNDAR; VISWANATHAN, 2019; KOUADIO JACQUES-EDOUARD et al., 2021; RAJPUT et al., 2021; TEGENE et al., 2021). A utilização de mudas de cana-de-açúcar pré-brotadas com certificado fitossanitário e mudas oriundas de micropropagação se apresenta como medida de prevenção contra o carvão e outras doenças. Além disso, o tratamento do material de plantio, limpeza de materiais e maquinário empregados nas operações agrícolas e eliminação de plantas doentes (*roguing*) agregam no manejo integrado da doença (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018; RAJPUT et al., 2021)

Posto que o patossistema *S. scitamineum* – cana-de-açúcar é consideravelmente sensível às condições ambientais, fazer a diferenciação entre o grau de agressividade dos isolados do fungo, bem como avaliar o nível de resistência e/ou tolerância das cultivares de cana não é tão

trivial, afirma-se que ainda há muito o que se aprender e se desenvolver acerca dessa doença. O entendimento da biologia do patógeno e os mecanismos de interação com o hospedeiro são fundamentais para o manejo e a prevenção contra a doença.

1.3 Dinâmica da interação patógeno-hospedeiro

Para se defender de organismos invasores, as plantas desenvolveram estratégias que permitem a percepção no momento de infecção. Entre essas estratégias, destacam-se a imunidade desencadeada por PAMPs ou MAMPs (PTI - *PAMP triggered immunity*) e a imunidade desencadeada por efetores (ETI - *Effector triggered immunity*) (JONES; DANGL, 2006). A PTI associa-se à defesa basal da planta, no sentido de reconhecimento de moléculas específicas denominadas *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) ou *Microbe Associated Molecular Patterns* (MAMPs). O termo MAMP é empregado para designar moléculas provenientes de microrganismos não patogênicos. Ambas são fundamentais para a sobrevivência desses microrganismos e conservadas entre as espécies, podendo desencadear as respostas de defesa inata das plantas (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; SANABRIA; HUANG; DUBERY, 2010; YUAN et al., 2021; GUO; CHENG, 2022). Essas moléculas são reconhecidas por meio de receptores de reconhecimento de padrões moleculares PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) no ambiente extracelular, representados pelas proteínas (*protein receptor-like* = RLPs) ou quinases (*kinase receptor-like* = RLKs). A PTI da planta é ativada para combater a infecção provocada por um microrganismo logo após o reconhecimento de PAMPs/MAMPs. Dentre as respostas da planta pode ocorrer a deposição de calose na parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio, influxo de íons de cálcio (Ca²⁺) para o interior das células e a expressão de genes envolvidos com a biossíntese de peptídeos e compostos antimicrobianos (SANABRIA; HUANG; DUBERY, 2010; GIRALDO; VALENT, 2013).

Para superar esse mecanismo de defesa da planta, os organismos passaram a desenvolver os chamados efetores. Os efetores são moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo (DALIO et al., 2014). Para determinar moléculas efetoras, predições computacionais se baseiam na presença de peptídeo sinal para secreção, ausência de hélices transmembranas, ausência de âncoras glicofosfatidilinositol (GPI), tamanho menor que 300 aminoácidos e ricas em resíduos de cisteína, além de outras evidências

como a presença de polimorfismos, sinais de seleção positiva, indução in planta dentre outras características (SPERSCHNEIDER et al., 2015).

Os hospedeiros reconhecem as moléculas efetoras por meio de proteínas codificadas por genes de resistência (R). Devido ao processo de co-evolução, as plantas também desenvolveram uma outra estratégia de defesa denominada imunidade desencadeada por efetores (ETI). Quando ela é ativada, entre as respostas da planta estão a reação de hipersensibilidade (HR, *hypersensitive response*), alterações nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e cascata de sinalização via quinases (SANABRIA; HUANG; DUBERY, 2010; DALIO et al., 2014; YUAN et al., 2021). Para continuar vencendo o sistema imune da planta, entre os patógenos ocorre constantemente alterações entre os efetores e seleção de novas moléculas, que torna a interação planta-patógeno altamente dinâmica, gerando extrema diversificação entre efetores e receptores (DODDS; RATHJEN, 2010; GUO; CHENG, 2022; NICOLE et al., 2022).

Os mecanismos utilizados pela cana-de-açúcar para se defender do patógeno causador do carvão, que lhe conferem resistência, são provenientes de características hereditárias multifatoriais, na qual diversos componentes contribuem para isso ao longo dos estágios da interação patógeno-hospedeiro (SUNDAR et al., 2015; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018). De modo geral, a resistência é associada a dois tipos de mecanismos, assim divididos em termos didáticos: pré-formados (barreiras físicas e químicas, como número de escamas das gemas e sua composição, além da presença de tricomas) (WALLER, 1970; JAMES, 1973; DA GLORIA; ALBERNAS; AMORIM, 1995; MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018) e pós-formados (fisiológicas e moleculares). A combinação desses mecanismos dita o nível de resistência da variedade, e genótipos que apresentam maior número deles potencialmente sobrevivem com maior facilidade às variações no ambiente e à diversidade genética da população do patógeno (BHUIYAN et al., 2013).

Podem ser destacados entre os mecanismos de defesa do hospedeiro pré-formados os seguintes: número de escamas das gemas (região meristemática por onde o patógeno adentra o hospedeiro) com tecidos lignificados para impedir a entrada de fungos; abundância de tricomas, que podem ter um efeito repelente de água (WALLER, 1970; DA GLORIA; ALBERNAS; AMORIM, 1995); composição bioquímica das gemas (JAMES, 1973). Compostos de flavonoides com alto teor de glicosídeos contribuem na inibição e/ou atraso da germinação dos

teliósporos (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018). Todavia, tais mecanismos dependem muito das condições ambientais e podem ser perdidos ocasionalmente por danos nas gemas.

Os mecanismos de defesa pós-formados estão relacionados a artifícios específicos que são ativados quando patógenos *S. scitamineum* é percebido pela cana. Estudos comparativos entre genótipos suscetíveis e resistentes ao carvão demonstram que os genótipos resistentes percebem o patógeno mais cedo, desencadeando extensa reprogramação transcricional (PETERS et al., 2017). Nesses genótipos, logo no início do processo infectivo, pelo reconhecimento dos PAMPs, ocorre forte explosão oxidativa e modulações no sistema antioxidante que culminam no retardo ou prejudicam a proliferação do fungo. Aumento de quitinases, glucanases, lignificação de tecidos e alterações hormonais via sinalização MAPK também caracterizam o processo. Nos genótipos suscetíveis, o sucesso no processo de infecção e colonização envolve alterações na partição do carbono, quebra do amido e alterações hormonais (principalmente auxina) que leva, finalmente, à emissão do chicote (MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER; BENEVENUTO; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, 2018).

A proteína β -1,3-glucanase está associada à degradação da parede celular fúngica e a molécula antifúngica taumatina também foi correlacionada positivamente com a resistência da cana ao carvão (BLANCH; VICENTE, 2007; PENG et al., 2017). Sanchez-Elordi e colaboradores demonstraram que uma arginase produzida por um genótipo resistente é capaz de induzir a aglutinação dos teliósporos e assim prejudicar a sua germinação. Contudo, os próprios esporos também produzem uma arginase que acelera o processo germinativo, a qual apresenta maior afinidade para se ligar aos mesmos do que a arginase vegetal. Sendo assim, o efeito de aglutinação é revertido (SÁNCHEZ-ELORDI et al., 2015).

Existem relatos sobre o acúmulo in planta de poliaminas e glicoproteínas durante o processo de infecção (FONTANIELLA et al., 2002), provavelmente associadas com a defesa da planta. Níveis elevados de poliaminas conjugadas com componentes fenólicos em órgãos maduros infectados, portanto, são diagnósticos da presença do fungo (LEGAZ et al., 1998; PIÑON et al., 1999). Poliaminas são essenciais para o crescimento normal e diferenciação celular e são produzidas em uma variedade de fungos, principalmente a partir de ornitina (ornitina descarboxilase) (SHAPIRA et al., 1989; RUIZ-HERRERA, 1994; WALTERS; MACKINTOSH, 1997). Componentes fenólicos são produzidos pela planta em resposta à infecção, inativando o efeito das poliaminas através da conjugação (SUNDAR et al., 2012). Já as

glicoproteínas (MARTÍNEZ et al., 2000; BLANCH; VICENTE, 2007), atuam potencialmente na inibição da germinação dos teliósporos (LLOYD, 1983). A germinação diminui cerca de 50% na presença dessas proteínas, pois impede a polarização e o acúmulo de organelas para a formação do tubo germinativo (MARTÍNEZ et al., 2000).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é marcante como resposta de defesa, gera mudanças na atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (PRX), dentre outras, por parte do hospedeiro, e impulsiona outras respostas, o que ocorre em genótipos resistentes, mas não em suscetíveis (PETERS et al., 2017). O estresse oxidativo ativa a via de produção de fenilpropanóides, cujos intermediários são precursores de metabólitos antimicrobianos, como flavonóides, além de se relacionarem à síntese de lignina. A lignina pode atuar como barreira contra a infecção, impedindo também a difusão de toxinas e efetores (LONGATTO et al, 2015). Em estudo desenvolvido por Santiago e colaboradores (2012), gemas de cana-de-açúcar inoculadas com *S. scitamineum* apresentaram aumento de 29% da lignificação em variedade resistente, contra 13% na variedade suscetível.

Componentes da parede celular (xilose, celobiose, ramnose) foram encontrados em menor abundância no meristema de plantas que desenvolveram chicote, o que demonstra possivelmente um afrouxamento no meristema para permitir que ele cresça (SCHAKER et al., 2016, 2017). Essas plantas também têm aumento na atividade das vias da glicólise, ácido cítrico e pentoses-fosfato, cujos produtos não são direcionados ao armazenamento (acúmulo de amido). Isso explica a redução no teor de sacarose de plantas doentes.

Em termos hormonais, observa-se um aumento nos níveis de etileno, ácido salicílico, jasmonato e giberelina em plantas resistentes (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005; LAO et al., 2008; QUE et al., 2014; HUANG et al., 2015; SU et al., 2016c), enquanto a auxina atua como regulador negativo do sistema imunológico e está associada às mudanças das funções meristemáticas em plantas suscetíveis (HECTOR et al, 1995; SCHAKER et al., 2016).

Os mecanismos de ataque de patógenos tem sido evidenciados através do estudo das enzimas liberadas na interação com o hospedeiro, toxinas e moléculas efetoras (PASCHOLATI & DALIO, 2018). Para *S. scitamineum*, temos um foco especial na identificação de efetores através de estudos comparativos entre os genomas dos fungos causadores de carvão (BARNABAS et al., 2017). A caracterização de efetores se mostra complexa, posto que tais moléculas apresentam uma evolução rápida, associada a uma alta especificidade entre patógenos

e hospedeiros (SPERSCHNEIDER et al., 2015; NICOLE et al., 2022). Na produção de mutantes (etapa característica do processo de validação de uma molécula efetora), as deleções únicas frequentemente não produzem um fenótipo detectável (BASSE; KOLB; KAHMANN, 2002). Imunoprecipitação (IP) seguida de espectrometria de massa, ensaios de expressão gênica transiente, dentre outras estratégias são empregadas como métodos para estudos de caracterização. Compreender o papel dessas moléculas na interação planta-patógeno tende a enriquecer o desenvolvimento de novos cultivares resistentes ao carvão.

1.4 Efeitores em fungos causadores de carvão

Predições realizadas por Taniguti e colaboradores (2015) revelaram 305 proteínas no secretoma de *S. scitamineum*, dentre as quais 54 foram anotadas como enzimas de síntese/quebra de sacarídeos (*Carbohydrate Active EnZyme = CAZymes*) e 70 como efetores candidatos. Barnabas e colaboradores (2017), por meio de ferramentas computacionais, identificaram candidatos a efetores como genes ortólogos compartilhados entre fungos causadores de carvão, o que permite a realização de comparações e facilita a identificação e caracterização dessas moléculas no genoma de suas respectivas espécies.

Descritos em *Ustilago maydis*, (agente causal do carvão do milho) os genes Rsp3 (*Repetitive Secreted Protein 3*) e Pep 1 (*Protein Essential for Penetration 1*) atuam respectivamente no bloqueio de proteínas antifúngicas de ligação à manose (MA et al., 2018) e na inibição da peroxidase POX12 do milho, o que tem como consequência o entrave da resposta de hipersensibilidade (HEMETSBERGER et al., 2012). Mutantes de *U. maydis* para o gene do Rsp3 demonstraram forte atenuação da virulência, evidente pela redução em quantidade e proporção de sintomas tumorogênicos. Esse efector se liga à superfície das hifas fúngicas, protegendo-as contra a atividade antifúngica de proteínas do milho (MA et al., 2018). Teixeira-Silva e colaboradores (2020) corroboraram com essas evidências em análise de candidatos a efetores de *S. scitamineum*, em que foi determinada a localização celular de atuação dessas moléculas bem como sua expressão em genótipos de cana-de-açúcar suscetível e resistente, que incluiu o gene ortólogo de Rsp3 nomeado g3970 no genoma.

Em trabalhos com o patossistema *S. citamineum* – cana envolvendo a sequência ortóloga de Pep1, ficou demonstrado atividade semelhante em termos de inibição enzimática e uma expressão gênica aumentada durante a colonização fúngica nos tecidos de plantas

resistentes (PETERS et al., 2017, 2020). Além disso, Lu e colaboradores (2021) produziram mutantes deficientes do gene codificador de Pep1 e constataram impacto negativo sobre o processo de acasalamento fúngico, com redução da esporulação ou até mesmo ausência do desenvolvimento do chicote. Os mutantes também produziram significativamente menos massa micelial nas plantas infectadas (LU et al., 2021).

Através da proteína Cmu1 (*corismato mutase-1*), o patógeno causador de carvão canaliza o corismato para a via dos fenilpropanóides, reduzindo sua disponibilidade para a síntese do ácido salicílico (envolvido em mecanismos de defesa), demonstrando ser, assim, uma outra estratégia do patógeno na busca de superar a defesa do hospedeiro (DJAMEI et al., 2011; BARNABAS et al., 2016, 2017). *S. scitamineum* possui um gene ortólogo Cmu1 (TANIGUTI et al., 2015) e as plantas de cana-de-açúcar apresentaram níveis de expressão reduzidos de ácido salicílico quando infectadas com o patógeno (SCHAKER et al., 2016).

Também descrita em *U. maydis*, a proteína efetora See1 (*Seedling Efficient Effector 1*) é órgão específica e atua sobre o ciclo celular, levando a sua progressão, bem como da síntese de DNA e proliferação celular nas folhas do hospedeiro, o que desencadeia a alteração fenotípica observada nas plantas infectadas: tumores característicos (REDKAR et al., 2015; MATEI et al., 2018). Um ortólogo de See1 foi identificado em *S. scitamineum* e sua expressão foi detectada em RNAseq (SCHAKER et al., 2016; BENEVENUTO et al., 2018). Além dos tumores, as plantas de milho infectadas podem acumular o pigmento antocianina. A biossíntese de antocianina compartilha um caminho de ramificação com a biossíntese de lignina. Tin2 (*Tumor inducing 2*) é um efetor capaz de influenciar essa ramificação metabólica (TANAKA et al., 2014), comprometendo a lignificação de tecidos, que é uma das estratégias de defesa da planta hospedeira.

O cluster Pit (*Proteins Important for Tumors*), que é composto por quatro genes que codificam duas proteínas secretadas (Pit2 e Pit4), uma proteína transmembrana (Pit1) e uma proteína citoplasmática (Pit3) (DOEHLEMANN et al., 2011), foi estudado em experimentos de deleção de genes únicos e de todo o cluster. Prevê-se que o Pit4 seja secretado e tenha um domínio de expansina potencialmente envolvido na expansão da parede celular. Pit2 foi caracterizado como inibidor das proteases de cisteína (envolvidas na imunidade mediada por salicilato) do milho liberadas no apoplasto do hospedeiro durante a interação com *U. maydis* (MUELLER et al., 2013). Um sítio ativo conservado é compartilhado entre outras espécies de

fungos causadores de carvão que apresentam genes semelhantes à Pit2 (DOEHLEMANN et al., 2011).

Em *Sporisorium reilianum* foi caracterizado o efetor Sad1 (*Suppressor of Apical Dominance*), que induz a perda de dominância apical do milho levando à produção de múltiplas inflorescências (GHAREEB et al., 2011, 2015), agindo sobre a dinâmica do hormônio auxina. Um ortólogo de Sad1 foi identificado no genoma de *S. scitamineum* no trabalho de Benevenuto e colaboradores (2018). Possivelmente o super-perfilhamento observado em cana-de-açúcar infectada é consequência da expressão desse efetor (SUNDAR et al., 2012).

Teixeira-Silva e colaboradores forneceram uma primeira análise abrangente de candidatos a efetores de *S. scitamineum* e o perfil de expressão desses genes em plantas de cana-de-açúcar infectadas. A análise, que englobou dez candidatos a efetores e apontou para seus respectivos compartimentos celulares de atuação, indicou que dois desses genes possivelmente contribuem para a caracterização precoce de resistência ou suscetibilidade à doença. Um deles, anotado no genoma como g5159, teve sua localização explícita na parede celular da planta e foi capaz de suprimir a ETI nas condições avaliadas, enquanto o gene g3890 teve localização nucleocitoplasmática (TEIXEIRA-SILVA et al., 2020). Foram identificados alguns interatores possíveis para ambos os genes, entre eles uma quitinase e subunidades do proteossoma podem ser destacados para o g5159. Um ensaio recente com a inoculação de candidatos a efetores em plantas *Nicotiana benthamiana* através do sistema de secreção tipo três de *Pseudomonas fluorescens* reforçou a capacidade de g5159 de supressão da PTI e ainda demonstrou que esse candidato é capaz de suprimir a ETI (MAIA et al., 2022).

Ling e colaboradores (2021) publicaram um primeiro estudo mecanístico sobre um fungo efetor de carvão da cana-de-açúcar. SsPele1 (*S. scitamineum* plant elicitor peptide-like efetor 1) possui semelhança estrutural com o peptídeo eliciador de plantas 1 e assim age competitivamente pela ocupação do sítio de reconhecimento dessa molécula, atenuando a resposta imune ativada pelo receptor. O peptídeo eliciador de plantas 1 é um peptídeo não funcional do hospedeiro, reconhecido pelo domínio extracelular de repetição rica em leucina (LRR) do receptor ScPEPR1 (*Elicitor Peptide Receptor 1*) em cana-de-açúcar. Quando há o reconhecimento, uma série de eventos de fosforilação associadas a quinases resultam na ativação da imunidade desencadeada por PAMP. Durante a infecção por *S. scitamineum*, o fungo libera o efetor Pele1 no apoplasto do hospedeiro e ao se ligar ao domínio extracelular de PEPR1 ele suprime as respostas imunes mediadas por esse receptor. *U. maydis* também apresenta um

ortólogo desse efector, o qual se demonstrou fundamental para a infecção por esse fungo em milho (LING et al., 2022).

Referências

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**, v. 80, n. 10, p. 1189–1192, 1996.

BAILEY, R. A. (1979). Possibilities for the control of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) with fungicides. Proceedings of The South African Sugar Technologist's Association, 137–42

BAKKEREN, G.; KÄMPER, J.; SCHIRAWSKI, J. Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 45 Suppl 1, n. SUPPL. 1, ago. 2008.

BARNABAS, L. et al. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum*. **Proteomics**, v. 16, n. 7, p. 1111–1122, 1 abr. 2016.

BARNABAS, L. et al. Putative orthologs of *Ustilago maydis* effectors screened from the genome of sugarcane smut fungus - *Sporisorium scitamineum*. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 147–156, 1 mar. 2017.

BASSE, C. W.; KOLB, S.; KAHMANN, R. A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 1, p. 75–93, 2002.

BENEVENUTO, J. et al. Comparative genomics of smut pathogens: Insights from orphans and positively selected genes into host specialization. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, 6 abr. 2018.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; CARDOSO, C.; SANGUINO, A.; IRVINE, JE; SILVA, W. M. (1987) Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia. Boletim Técnico Coopersucar (Ed. Especial) Piracicaba, p.1-23.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15–16, p. 4019–4026, 26 nov. 2007.

BHUIYAN, S. A. et al. Mechanism of resistance in Australian sugarcane parent clones to smut and the effect of hot water treatment. **Crop and Pasture Science**, v. 64, n. 9, p. 892–900, 26 nov. 2013.

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

BLANCH, M.; VICENTE, C. Glycoproteins of sugarcane plants facilitate the infectivity of *Ustilago scitaminea* and *Xanthomonas albilineans*, two sugar- cane pathogens. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 163–169, 2007.

BORRÁS-HIDALGO, O. et al. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant

somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant physiology and biochemistry : PPB**, v. 43, n. 12, p. 1115–1121, dez. 2005.

CARVALHO, R. S. Relatório sobre o carvão da cana. Anais da E.S.A. “Luiz de Queiroz”. (1948). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aesalq/v6/01.pdf> acesso em: 17/11/2020.

CARVALHO-NETTO, O. V. et al. The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 21 out. 2014.

COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. **Sugarcane Smut Disease** University of Florida - IFAS Extension, , 2005. .

CURSI, D. E. et al. History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 112–133, 1 fev. 2022.

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

DALIO, R. J. D. et al. (2014) Efeitos nas interações planta-patógeno. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 22, p. 25–68.

DA SILVA, J. A. The Importance of the Wild Cane *Saccharum spontaneum* for Bioenergy Genetic Breeding. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 229–240, 1 jun. 2017.

DE ABREU, L. G. F. et al. Energy cane vs sugarcane: Watching the race in plant development. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112868, 15 nov. 2020.

DILLON, S. L. et al. **Domestication to crop improvement: Genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae)** *Annals of Botany*, out. 2007. .

DINIZ, A. L. et al. **Genomic resources for energy cane breeding in the post genomics era** *Computational and Structural Biotechnology Journal* Elsevier B.V., , 1 jan. 2019. .

DJAMEI, A. et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature** **2011 478:7369**, v. 478, n. 7369, p. 395–398, 5 out. 2011.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** **2010 11:8**, v. 11, n. 8, p. 539–548, 29 jun. 2010.

DOEHLEMANN, G. et al. Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 751–766, ago. 2011.

ELSTON, D. A.; SIMMONDS, N. W. Models of Sugarcane Smut Disease and their Implications for Testing Variety Resistance. **The Journal of Applied Ecology**, v. 25, n. 1, p. 319, abr. 1988.

FONTANIELLA, B. et al. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 881–889, 1 out. 2002.

GHAREEB, H. et al. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. **Plant physiology**, v. 156, n. 4, p. 2037–2052, 2011.

GHAREEB, H. et al. SUPPRESSOR OF APICAL DOMINANCE1 of *Sporisorium reilianum* Modulates Inflorescence Branching Architecture in Maize and Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2789–2804, 9 dez. 2015.

GIRALDO, M. C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 800–814, nov. 2013.

GUO, J.; CHENG, Y. Advances in Fungal Elicitor-Triggered Plant Immunity. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 12003, v. 23, n. 19, p. 12003, 9 out. 2022.

HEMETSBERGER, C. et al. The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002684, maio 2012.

HUANG, N. et al. Identification of smut-responsive genes in sugarcane using cDNA-SRAP. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 2, p. 6808–6818, 18 jun. 2015.

JAMES, G. L. (1973). Smut spore germination in sugarcane internode surfaces. *Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association* 47: 179–180

JAYAKUMAR, V.; RAMESH SUNDAR, A.; VISWANATHAN, R. Biological Suppression of Sugarcane Smut with Endophytic Bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, n. 4, p. 653–660, 1 ago. 2019.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. **The plant immune system** Nature Publishing Group, , 16 nov. 2006. .

KOUADIO JACQUES-EDOUARD, Y. et al. Sustainable Control of the Sugarcane Smut Disease Caused by *Sporisorium scitamineum* Piep. Using an Essential Oil of *Cymbopogon citratus*. <http://www.sciencepublishinggroup.com>, v. 9, n. 3, p. 77, 2021.

LAL, R. J. et al. Biological control of sugarcane smut (*Sporisorium scitamineum*) through botanicals and *Trichoderma viride*. **Sugar Tech**, v. 11, n. 4, p. 381–386, 24 fev. 2009.

LAO, M. et al. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. **Plant cell reports**, v. 27, n. 6, p. 1103–1111, jun. 2008.

LATIZA, A. S.; AMPUSTA, D. C.; RIVERA, J. R. (1980). Reaction of sugarcane clones to strain B of *Sporisorium scitamineum*. *Int Soc Sugarcane Technol* 2, 1456–1462.

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

LEGAZ, M. E. et al. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*). **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 327, p. 1723–1728, 1 out. 1998.

LEMMA, A. et al. Study on the Reaction of Sugarcane Genotypes (CIRAD-2011) to Sugarcane Smut (*Sporisorium scitamineum*) in the Ethiopian Sugarcane Plantations. **Advances in Crop Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 1–3, 12 ago. 2015.

LING, H. et al. A sugarcane smut fungus effector simulates the host endogenous elicitor peptide to suppress plant immunity. **New Phytologist**, v. 233, n. 2, p. 919–933, 1 jan. 2022.

LLOYD, H. L. Chemical assay potentially suitable for determination of smut resistance of sugarcane cultivars. **Plant Disease**, v. 67, n. 10, p. 1103–1105, 1 jan. 1983.

LONGATTO, D. P. et al. Carvão da cana-de-açúcar: avanços na compreensão deste patossistema. Revisão anual de patologia de plantas. Tradução . Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2015. v. 23, p. 62-89. . Acesso em: 14 fev. 2023.

LU, S. et al. Sspep1, an effector with essential cellular functions in sugarcane smut fungus. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 954, 1 nov. 2021.

LUTHRA, J. C.; SATTAR, A.; SANDHU, S. S. Experiments on the control of smut of sugarcane (*Ustilago scitaminea* Syd.). **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B**, v. 12, n. 4, p. 118–128, out. 1940.

MA, L. S. et al. The *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. **Nature Communications** 2018 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–15, 27 abr. 2018.

MAIA, T. et al. A Bacterial Type Three Secretion-Based Delivery System for Functional Characterization of *Sporisorium scitamineum* Plant Immune Suppressing Effector Proteins. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0326-R>, v. 112, n. 7, p. 1513–1523, 13 jun. 2022.

MARIN, F. R. (2014). Eficiência de produção da cana-de-açúcar brasileira: estado atual e cenários futuros baseados em simulações multimodelos. Tese (Livre Docência em Agrometeorologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. doi:10.11606/T.11.2014.tde-22082014-112751.

MARTÍNEZ, M. et al. 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**, v. 102, 2000.

MATEI, A. et al. How to make a tumour: cell type specific dissection of *Ustilago maydis*-induced tumour development in maize leaves. **The New phytologist**, v. 217, n. 4, p. 1681–1695, 1 mar. 2018.

MATSUOKA, S. et al. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1–13, 30 set. 2014.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 40, p. 349–379, 2002.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. **Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition** Cell Press, , 31 out. 1997. .

MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER, P. D. C.; BENEVENUTO, J.; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, S. S. Progress in understanding fungal diseases affecting sugarcane: smut. In: ROOT, P. (Ed.). **Achieving sustainable cultivation of sugarcane**. 1. ed. [s.l.] Burleigh Dodds Science Publishing, 2018. 2p. 1–23.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. (2006). História e morfologia da cana-de-açúcar. Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. p. 11-18.

MUELLER, A. N. et al. Compatibility in the *Ustilago maydis*–Maize Interaction Requires Inhibition of Host Cysteine Proteases by the Fungal Effector Pit2. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 2, p. e1003177, fev.

2013.

NICOLE, J. et al. Fungal Effectomics: A World in Constant Evolution. **International Journal of Molecular Sciences** **2022**, Vol. **23**, Page **13433**, v. 23, n. 21, p. 13433, 3 nov. 2022.

PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. (2018) Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN Filho, A. (ed). Manual de Fitopatologia. Vol. 1. 5a ed. Ouro Fino, MG. Ed. Agr. Ceres. Cap. 34 – p. 389-421.

PENG, Q. et al. A sugarcane pathogenesis-related protein, ScPR10, plays a positive role in defense responses under *Sporisorium scitamineum*, SrMV, SA, and MeJA stresses. **Plant cell reports**, v. 36, n. 9, p. 1427–1440, 1 set. 2017.

PETERS, L. P. et al. Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and -susceptible genotypes. **Planta**, v. 245, n. 4, p. 749–764, 1 abr. 2017.

PETERS, L. P. et al. Differential responses of genes and enzymes associated with ROS protective responses in the sugarcane smut fungus. **Fungal Biology**, v. 124, n. 12, p. 1039–1051, 1 dez. 2020.

PIEPENBRING, M. (2002). Diversity, taxonomy, and ecology of plant parasitic smut fungi in Bolivia. *Ecología en Bolivia*, v. 37, p. 49-58.

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress** **2002** **1:1**, v. 1, n. 1, p. 71–80, 2 set. 2013.

PIÑÓN, D. et al. Role of polyamines in the infection of sugarcane buds by *Ustilago scitaminea* spores. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 57–64, 1 jan. 1999.

QUE, Y. et al. A Global View of Transcriptome Dynamics during *Sporisorium scitamineum* Challenge in Sugarcane by RNA-seq. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106476, 29 ago. 2014.

RAGO, A. M.; CASAGRANDE, M. V.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. (2009). Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 35: 93–97.

RAJPUT, M. A. et al. Chemical control of whip smut of sugarcane caused by *sporisorium scitamineum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 51, n. 5, p. 1891–1897, 1 out. 2019.

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

REDKAR, A. et al. A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* Guides Maize Leaf Cells to Form Tumors. **The Plant cell**, v. 27, n. 4, p. 1332–1351, 1 abr. 2015.

RUIZ-HERRERA, J. Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation. **Critical reviews in microbiology**, v. 20, n. 2, p. 143–150, 1994.

SANABRIA, N. M.; HUANG, J. C.; DUBERY, I. A. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. **Self Nonsell**, v. 1, n. 1, p. 40, jan. 2010.

SÁNCHEZ-ELORDI, E. et al. Sugar cane arginase competes with the same fungal enzyme as a false quorum signal against smut teliospores. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 115–122, 1 dez. 2015.

SANTIAGO, R. et al. Changes in soluble and cell wall-bound hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, n. 3, p. 439–450, 28 jul. 2009.

SCHAKER, P. D. C. et al. RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. **PLoS one**, v. 11, n. 9, 1 set. 2016.

SCHAKER, P. D. C. et al. Metabolome dynamics of smutted sugarcane reveals mechanisms involved in disease progression and whip emission. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 31 maio 2017.

SCHENCK, S. (2003). New race of sugarcane smut on Maui. Hawaii Agriculture Research Center. Pathology Report 69. Junho, 2003.

SHAPIRA, R. et al. Polyamines and Ornithine Decarboxylase Activity during Growth and Differentiation in *Sclerotium rolfsii*. **Microbiology**, v. 135, n. 5, p. 1361–1367, 1 maio 1989.

SINGH, N.; SOMAI, B. M.; PILLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Science**, v. 167, n. 5, p. 987–994, 1 nov. 2004.

SPERSCHNEIDER, J. et al. Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004806, 28 maio 2015.

STOLL, M. et al. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. <https://doi.org/10.1139/b03-094>, v. 81, n. 9, p. 976–984, set. 2011.

SU, Y. et al. A TaqMan real-time PCR assay for detection and quantification of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, 2013.

SU, Y. et al. Development and application of a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 1 abr. 2016a.

SU, Y. et al. Early Selection for Smut Resistance in Sugarcane Using Pathogen Proliferation and Changes in Physiological and Biochemical Indices. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. JULY2016, 27 jul. 2016b.

SU, Y. et al. Comparative proteomics reveals that central metabolism changes are associated with resistance against *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 12 out. 2016c.

SUNDAR, A. R. et al. A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*. **Botany**, v. 53, p. 107–128, 16 mar. 2012.

SUNDAR, A. R. et al. Disease resistance in sugarcane – An overview. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 4, p. 200–212, 15 dez. 2015.

TANAKA, S. et al. A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. **eLife**, v. 2014, n. 3, 28 jan. 2014.

TANIGUTI, L. M. et al. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129318, 12 jun. 2015.

TEGENE, S. et al. Evaluation of native *Trichoderma* isolates for the management of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in sugar plantations of Ethiopia. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1872853, 1 jan. 2021.

TEIXEIRA-SILVA, N. S. et al. Leaping into the unknown world of *Sporisorium scitamineum* candidate effectors. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–26, 1 dez. 2020.

TEW, T. L.; COBILL, R. M. Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum* spp.) as an energy crop. In: Genetic improvement of bioenergy crops. Springer, New York, NY, 2008. p. 273-294.

TOM, L.; BRAITHWAITE, K.; KUNIATA, L. S. Incursion of sugarcane smut in commercial cane crops at Ramu, Papua New Guinea. **Proceedings of the 2017 Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, Cairns, Queensland, Australia, 3-5 May 2017**, p. 377–384, 2017.

UNICA, UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Observatório da Cana <https://observatoriodacana.com.br/> acesso em: 02/01/2023.

WACLAWOVSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, abr. 2010.

WALLER, J. M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya: I. Epidemiology. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 52, n. 1, p. 139–151, 1 fev. 1969.

WALLER, J. M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya: II. Infection and resistance. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 54, n. 3, p. 405–414, 1 jun. 1970.

WALTERS, D. R.; MACKINTOSH, C. A. Control of plant disease by perturbation of fungal polyamine metabolism. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 689–695, 1 jul. 1997.

YAN, M. et al. The mating-type locus *b* of the sugarcane smut *Sporisorium scitamineum* is essential for mating, filamentous growth and pathogenicity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 86, p. 1–8, 1 jan. 2016.

YU, F. et al. Characterization of chromosome composition of sugarcane in nobilization by using genomic in situ hybridization. **Molecular Cytogenetics**, v. 11, n. 1, p. 35, 7 dez. 2018.

YUAN, M. et al. PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 62, p. 102030, 1 ago. 2021.

ZEKARIAS, Y. et al. Importance and status of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in the Ethiopian sugar estates. **Ethiopian Journal of Agricultural Sciences**, v. 21, n. 1–2, p. 35–46, 26 ago. 2016.

ZHAO, D.; LI, Y. R. Climate Change and Sugarcane Production: Potential Impact and Mitigation Strategies. **International Journal of Agronomy**, v. 2015, 2015.

2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES DO FUNGO *Sporisorium scitamineum* DURANTE A INTERAÇÃO COM PLANTAS DE CANA-ENERGIA

Resumo

A doença do carvão causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum* é considerada uma das doenças mais importantes da cana-de-açúcar. Durante a seleção de variedades de cana-energia no processo de melhoramento genético, a resistência a essa doença se destaca entre os atributos de interesse. Nesse estudo, abordamos a dinâmica fitopatológica do patossistema do carvão em cana-energia, evidenciando aspectos do sistema de ataque do patógeno nos momentos iniciais de interação com a planta. Conduzimos um experimento com dois genótipos de cana-energia contrastantes quanto a suscetibilidade à doença: Vertix 1 (suscetível) e Vertix 2 (resistente) e constatamos a presença de infecção pelo patógeno em 48 e 72 horas após a inoculação (hai). No tempo de 48 hai, avaliamos a expressão gênica de nove genes associados à virulência e desenvolvimento fúngico na planta hospedeira: os ortólogos de efetores comuns entre fungos causadores de carvão PEP1, CMU1, RSP3, STP1, o efetor PELE1 descrito em *S. scitamineum*, os candidatos a efetores g3890 e g5159, o gene ortólogo do fator de transcrição YAP1 e da glucose oxidase (GOX). Encontramos diferença estatística significativa na expressão gênica entre os genótipos para o gene da GOX, o qual foi mais expresso no genótipo resistente. Os outros genes apresentaram certa tendência de expressão variável. Os estudos com o carvão em cana-energia estão apenas iniciando. Acreditamos que no que tange aos estudos de expressão envolvendo genes de *S. scitamineum*, uma abordagem mais ampla considerando uma escala de tempo para o desenvolvimento da doença, assim como uma atenção especial na seleção de normalizadores, sejam fundamentais em novos estudos.

Palavras-chave: Expressão gênica, Doença do Carvão, Cana-energia, Resistência, Suscetibilidade

Abstract

The smut disease caused by the fungus *Sporisorium scitamineum* is considered one of the most important diseases of sugarcane. During the selection of energy cane varieties in the genetic improvement process, resistance to this disease stands out among the attributes of interest. In this study, we approach the phytopathological dynamics of the smut pathosystem in energy cane, evidencing aspects of the pathogen's attack system in the initial moments of interaction with the plant. We conducted an experiment with two contrasting energy cane genotypes in terms of susceptibility to the disease: Vertix 1 (susceptible) and Vertix 2 (resistant) and found the presence of infection by the pathogen 48 and 72 hours after inoculation (hai). At the time of 48 hai, we evaluated the gene expression of nine genes associated with virulence and fungal development in the host plant: the common effector orthologs among smut-causing fungi PEP1, CMU1, RSP3, STP1, the PELE1 effector described in *S. scitamineum*, effector candidates g3890 and g5159, the ortholog gene for transcription factor YAP1 and glucose oxidase (GOX). We found a statistically significant difference in gene expression between the genotypes for the GOX gene, which was more expressed in the resistant genotype. The other genes showed a certain trend of variable

expression. Studies with smut in energy cane are just beginning. We believe that with regard to expression studies involving *S. scitamineum* genes, a broader approach considering a time scale for the development of the disease, as well as special attention in the selection of normalizers, are fundamental in new studies.

Keywords: Gene expression, Smut disease, Energy Cane, Resistance, Susceptibility

Referências

- BARNABAS, L. et al. Putative orthologs of *Ustilago maydis* effectors screened from the genome of sugarcane smut fungus - *Sporisorium scitamineum*. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 147–156, 1 mar. 2017.
- BHUIYAN, S. A. et al. Sugarcane Smut, Caused by *Sporisorium scitamineum*, a Major Disease of Sugarcane: A Contemporary Review. **Phytopathology**, v. 111, n. 11, p. 1905–1917, 1 nov. 2021.
- CURSI, D. E. et al. History and Current Status of Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Molecular Genetics in Brazil. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 112–133, 1 fev. 2022.
- DA SILVA, J. A. The Importance of the Wild Cane *Saccharum spontaneum* for Bioenergy Genetic Breeding. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 229–240, 1 jun. 2017.
- DINIZ, A. L. et al. **Genomic resources for energy cane breeding in the post genomics era** *Computational and Structural Biotechnology Journal* Elsevier B.V., 1 jan. 2019. .
- DJAMEI, A. et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector. **Nature** **2011 478:7369**, v. 478, n. 7369, p. 395–398, 5 out. 2011.
- FELCHER, K. J. et al. Expression of a Fungal Glucose Oxidase Gene in Three Potato Cultivars with Different Susceptibility to Late Blight (*Phytophthora infestans* Mont. deBary). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 2, p. 238–245, 1 mar. 2003.
- GAN, P. H. P. et al. Effectors of biotrophic fungal plant pathogens. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 10, p. 913–918, 23 set. 2010.
- GARSMEUR, O. et al. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4300, 1 dez. 2018.
- GIRALDO, M. C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 800–814, nov. 2013.
- HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 9 fev. 2008.
- HEMETSBERGER, C. et al. The *Ustilago maydis* Effector Pep1 Suppresses Plant Immunity by Inhibition of Host Peroxidase Activity. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002684, maio 2012.
- JASWAL, R. et al. Effector Biology of Biotrophic Plant Fungal Pathogens: Current Advances and Future Prospects. **Microbiological Research**, v. 241, p. 126567, 1 dez. 2020.

- KACHROO, A. et al. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. **Transgenic Research**, v. 12, n. 5, p. 577–586, out. 2003.
- LI, X. et al. Glucose oxidase as a control agent against the fungal pathogen *Botrytis cinerea* in postharvest strawberry. **Food Control**, v. 105, p. 277–284, 1 nov. 2019.
- LIANG, L. **The role of Stp1, a secreted effector, in the biotrophic interaction of Ustilago maydis and its host plant maize**. 2012. Philipps-Universität Marburg, Marburg, 2012.
- LING, H. et al. A sugarcane smut fungus effector simulates the host endogenous elicitor peptide to suppress plant immunity. **New Phytologist**, v. 233, n. 2, p. 919–933, 1 jan. 2022.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LU, S. et al. Sspep1, an effector with essential cellular functions in sugarcane smut fungus. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 954, 1 nov. 2021.
- MA, L. S. et al. The *Ustilago maydis* repetitive effector Rsp3 blocks the antifungal activity of mannose-binding maize proteins. **Nature Communications** 2018 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–15, 27 abr. 2018.
- MAETA, K. et al. Activity of the Yap1 Transcription Factor in *Saccharomyces cerevisiae* Is Modulated by Methylglyoxal, a Metabolite Derived from Glycolysis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 19, p. 8753, out. 2004.
- MAIA, T. et al. A Bacterial Type Three Secretion-Based Delivery System for Functional Characterization of *Sporisorium scitamineum* Plant Immune Suppressing Effector Proteins. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-21-0326-R>, v. 112, n. 7, p. 1513–1523, 13 jun. 2022.
- MATSUOKA, S. et al. Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospects. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1–13, 30 set. 2014.
- MOLINA, L.; KAHMANN, R. An *Ustilago maydis* Gene Involved in H₂O₂ Detoxification Is Required for Virulence. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2293–2309, 27 ago. 2007.
- MONTEIRO-VITORELLO, C.B. SCHAKER, P. D. C.; BENEVENUTO, J.; TEIXEIRA-SILVA, N. ALMEIDA, S. S. Progress in understanding fungal diseases affecting sugarcane: smut. In: ROOT, P. (Ed.). **Achieving sustainable cultivation of sugarcane**. 1. ed. [s.l.] Burleigh Dodds Science Publishing, 2018. 2p. 1–23.
- PETERS, L. P. et al. Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and -susceptible genotypes. **Planta**, v. 245, n. 4, p. 749–764, 1 abr. 2017.
- PETERS, L. P. et al. Differential responses of genes and enzymes associated with ROS protective responses in the sugarcane smut fungus. **Fungal Biology**, v. 124, n. 12, p. 1039–1051, 1 dez. 2020.
- PETIT-HOUDENOT, Y.; FUDAL, I. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1072, 16 jun. 2017.
- PIPERIDIS, N.; D'HONT, A. Sugarcane genome architecture decrypted with chromosome-specific oligo probes. **The Plant Journal**, v. 103, n. 6, p. 2039–2051, 1 set. 2020.
- RAJPUT, M. A. et al. Sugarcane Smut: Current Knowledge and the Way Forward for Management. **Journal of Fungi** 2021, Vol. 7, Page 1095, v. 7, n. 12, p. 1095, 19 dez. 2021.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 13 mar. 2003.

RAMÍREZ-ZAVALA, C. Y. et al. An Overview of PRR- and NLR-Mediated Immunities: Conserved Signaling Components across the Plant Kingdom That Communicate Both Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 12974, 1 nov. 2022.

SAKAIGAICHI, T. et al. Evaluation of sugarcane smut resistance in wild sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) accessions collected in Japan. <http://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?journalCode=tpps20&page=instructions>, v. 22, n. 2, p. 327–332, 3 abr. 2018.

SANABRIA, N. M.; HUANG, J. C.; DUBERY, I. A. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. **Self Nonself**, v. 1, n. 1, p. 40, jan. 2010.

SCHAKER, P. D. C. et al. RNAseq Transcriptional Profiling following Whip Development in Sugarcane Smut Disease. **PLoS one**, v. 11, n. 9, 1 set. 2016.

SCHAKER, P. D. C. et al. Metabolome dynamics of smutted sugarcane reveals mechanisms involved in disease progression and whip emission. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 31 maio 2017.

SOUZA, G. M. et al. Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. 1–18, 1 dez. 2019.

SUNDAR, A. R. et al. A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*. **Botany**, v. 53, p. 107–128, 16 mar. 2012.

TANIGUTI, L. M. et al. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129318, 12 jun. 2015.

TEIXEIRA-SILVA, N. S. et al. Leaping into the unknown world of *sporisorium scitamineum* candidate effectors. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–26, 1 dez. 2020.

THIRUGNANASAMBANDAM, P. P.; HOANG, N. V.; HENRY, R. J. The challenge of analyzing the sugarcane genome. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 616, 14 maio 2018.

TODD, J. N. A. et al. Fungal Effectoromics: A World in Constant Evolution. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 13433, v. 23, n. 21, p. 13433, 3 nov. 2022.

ZEKARIAS, Y. et al. Importance and status of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in the Ethiopian sugar estates. **Ethiopian Journal of Agricultural Sciences**, v. 21, n. 1–2, p. 35–46, 26 ago. 2016.

ZHANG, B. et al. Plant NLRs: Evolving with pathogen effectors and engineerable to improve resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 28 set. 2022a.

ZHANG, J. et al. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. **Nature Genetics** 2018 50:11, v. 50, n. 11, p. 1565–1573, 8 out. 2018.

ZHANG, S. et al. Action Mechanisms of Effectors in Plant-Pathogen Interaction. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 6758, v. 23, n. 12, p. 6758, 17 jun. 2022b.