



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" (ESALQ)
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA - GRUPO DE GENÔMICA

JOÃO VITOR FERRO MAZZEI

**Estudos funcionais do candidato a efetor g5159 de *Sporisorium*
*scitamineum***

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

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

PIRACICABA

2024

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância para a economia global. No entanto, enfrenta desafios como a doença do carvão da cana, causada pelo fungo biotrófico *Sporisorium scitamineum*. Esse fungo interfere no desenvolvimento da cana-de-açúcar, especialmente durante a transição da fase vegetativa para a reprodutiva, secretando moléculas efetoras que afetam as células do hospedeiro e resultam na formação de estruturas alongadas chamadas chicotes, um dos sintomas característicos da doença. Estudos genômicos e transcriptômicos têm ajudado a compreender essas interações complexas, levando à identificação de genes que codificam candidatos efetores (CEs), como o *g5159*. Um dos possíveis alvos deste CE é o fator de transcrição (FT) SPL13, que faz parte da família *squamosa-like* e regula a transição entre as fases vegetativa e reprodutiva das plantas. A interação entre o CE *g5159* e o FT SPL13 de *Arabidopsis thaliana* foi validada por meio de experimentos de expressão heteróloga. Este trabalho tem como objetivo analisar a sequência e estrutura tridimensional da proteína CE *g5159*, avaliar sua interação com o FT SPL13 de cana-de-açúcar, induzir alterações com base na sua estrutura e avaliar o efeito biológico *in vivo* das alterações realizadas por meio de experimentos de supressão de PTI e ETI.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Carvão da cana; Interação proteica; Estrutura tridimensional; Supressão de PTI e ETI.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) é de grande importância na economia global, sendo utilizada para a produção de açúcar, biocombustíveis, bioplásticos e bioeletricidade (Waclawovsky *et al.*, 2010). De acordo com a FAO, em 2021, a cana-de-açúcar foi a terceira commodity mais produzida em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor, responsável por cerca de 40% da produção mundial (FAOSTAT, 2021). No país, o Estado de São Paulo se destaca sendo o maior produtor nacional de cana-de-açúcar (CONAB, 2024). Na safra de 2023/24, a produção brasileira de cana-de-açúcar atingiu cerca de 713,2 milhões de toneladas, com um crescimento de 16,8% em relação à safra de 2022/23, firmando um recorde de produção da cultura, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (CONAB, 2023; CONAB, 2024).

Contudo, essa cultura enfrenta diversos estresses bióticos e abióticos que impactam sua produtividade e rendimento. Dentre eles estão o estresse hídrico, baixas temperaturas, ataques de insetos e diferentes tipos de patógenos (Ferreira *et al.*, 2017; Rajput *et al.*, 2021; Manimekalai; Suresh; Singaravelu, 2022; Sánchez-Elordi *et al.*, 2020). É importante destacar que os patógenos causam impactos significativos à cultura, capazes de reduzir drasticamente a produtividade e, dentre eles, os fungos são os causadores de doenças mais comuns (Rajput *et al.*, 2022).

O carvão da cana-de-açúcar é uma doença causada pelo fungo biotrófico *Sporisorium scitamineum* (Syd.) (Piepenbring *et al.*, 2002) (Syn: *Ustilago scitaminea* H. and P. Sydow) pertencente ao filo Basidiomycota e à ordem Ustilaginales, sendo considerada uma das doenças mais prevalentes e que mais causam prejuízos à cultura (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2018; Agisha *et al.*, 2022). As perdas de produção causadas por essa doença variam entre 12% a 75% em variedades suscetíveis,

podendo levar até a perda total da cultura se combinado com os fatores ambientais que favorecem a infecção (Rajput *et al.*, 2021).

Assim como em outros fungos do carvão, sua principal característica é a capacidade de influenciar a reprodução das plantas infectadas e a formar numerosos teliósporos pretos a partir dos tecidos meristemáticos do hospedeiro (Zuo *et al.*, 2019).

O fungo *S. scitamineum* infecta as plantas penetrando os tecidos meristemáticos das gemas, resultando em danos diversos, como o comprometimento da germinação, redução na espessura dos colmos, diminuição no crescimento, queda da produtividade, folhas mais estreitas, redução no conteúdo de açúcar e aumento do tecido fibroso. No entanto, sua principal característica é a formação de estruturas alongadas a partir do meristema apical denominadas chicotes. Esses chicotes são as estruturas de reprodução do fungo, compostas por tecidos tanto da planta quanto do fungo, onde são produzidos os teliósporos (Comstock; Lentini, 2005; Sundar *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2016; Rajput *et al.*, 2021).

As interações moleculares entre cana-de-açúcar e *S. scitamineum* são elucidadas por meio de diferentes tecnologias, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (Ling *et al.*, 2021). O genoma completo do isolado brasileiro SSC39B de *S. scitamineum* foi sequenciado e montado a nível cromossômico telômero-a-telômero (Taniguti *et al.*, 2015). A partir do perfil transcricional da interação planta-patógeno do patossistema cana-de-açúcar-*S. scitamineum*, Taniguti *et al.* (2015) identificaram cerca de 70 genes candidatos a efetores (CEs), que codificam moléculas secretadas que podem auxiliam na

manipulação do metabolismo do hospedeiro para permitir a infecção e estabelecimento do patógeno.

Para estudos de proteínas, diferentes abordagens computacionais vêm sendo empregadas para ampliar o conhecimento sobre a estrutura e função dessas moléculas. Dentre essas ferramentas o software AlphaFold 2 vem se destacando, gerando previsões precisas de estruturas de proteínas individuais por meio de alinhamentos múltiplos de sequências e redes neurais (Jumper *et al.*, 2021). Além disso, o AlphaFold-Multimer, uma versão adaptada, foi treinado especificamente para modelar complexos de proteínas (Evans *et al.*, 2021). Os resultados obtidos dessas ferramentas são promissores e podem ser utilizados para a compreensão da interação entre proteínas, identificação de regiões de interação e orientar estudos funcionais mais aprofundados e assertivos.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo. No entanto, essa posição de destaque também nos expõe consideravelmente aos impactos causados pelo fungo *S. scitamineum*, que afeta drasticamente a produção de cana-de-açúcar. Uma das abordagens mais eficientes para o controle de doenças fúngicas é a seleção de genótipos de plantas resistentes a esses patógenos. Portanto, é de grande importância ter um amplo e aprofundado conhecimento do patossistema de cana-de-açúcar e carvão a nível molecular, essencial para elaboração de estratégias de combate do fungo e melhoramento da cultura.

Neste contexto, nosso Grupo de Genômica tem se aprofundado em pesquisas para desvendar diferentes aspectos desse patossistema complexo. O CE g5159, inicialmente identificado por Taniguti *et al.* (2015), tem sido escolhido como o foco deste projeto devido aos resultados promissores apresentados em trabalhos

anteriores, que sugerem a possibilidade de que ele desempenhe o papel de efetor nesse patossistema. Um desses estudos, conduzido por Teixeira-Silva *et al.* (2020), analisou a expressão do CE g5159 e outros CEs em variedades de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis à doença do carvão. Em ambas as variedades, o gene *g5159* mostrou-se expresso, em 72 horas após a inoculação (hai) nas variedades resistentes e em 5 dias após a inoculação (dai) em variedades suscetíveis. Nesse mesmo estudo, foi observado que o CE g5159 foi capaz de suprimir a imunidade desencadeada por efetores (ETI, do inglês “*Effector-triggered immunity*”) em folhas de *Nicotiana benthamiana*.

Adicionalmente, outro estudo, realizado por Maia *et al.* (2022), evidenciou a capacidade do CE g5159 de suprimir a imunidade desencadeada por PAMP (PTI, do inglês “*PAMP-triggered immunity*”). Os sistemas PTI e ETI fazem parte do sistema imunológico inato das plantas, atuando em conjunto na detecção e resposta a diferentes tipos de ataques de origem biótica ao hospedeiro (Yuan *et al.*, 2021). Diante desse conjunto de evidências, o CE g5159 surge como um candidato promissor para estudos a fim de entender seu papel na progressão da doença.

Quanto às suas características estruturais, Teixeira-Silva *et al.* (2020) identificaram que a extremidade N-terminal do CE g5159 apresenta uma região desordenada. Corroborando com esse achado, Batista (2023), por meio de modelagem tridimensionais utilizando o software AlphaFold 2, identificou uma região de desordem N-terminal e, adicionalmente, uma C-terminal.

Regiões protéicas intrinsecamente desordenadas (IDRs) são segmentos de aminoácidos em proteínas que não possuem uma estrutura tridimensional definida, capazes de conferir plasticidade e versatilidade a elas, permitindo que assumam diferentes conformações estruturais, dependentes das condições do meio e das

interações com outras moléculas (Dobrev *et al.*, 2018). IDRs têm se mostrado comuns em proteínas efetores, podendo conferir vantagens evolutivas aos patógenos na batalha armamentista entre eles e as plantas. Essas vantagens estão associadas à translocação dessas moléculas e à evasão do sistema imune inato das plantas (Marín; Uversky; Ott, 2013). As IDRs também apresentam uma evolução mais rápida em suas sequências, o que dificulta a evolução de moléculas da planta capazes de identificá-las, além de poderem agir como escudos que protegem as estruturas centrais dos efetores contra a identificação pelos receptores imunológicos das plantas (Seong; Krasileva, 2023).

Quanto à sua atividade dentro da célula hospedeira, o CE g5159 foi utilizado como isca em experimentos de duplo-híbrido em leveduras, buscando moléculas com as quais esse CE interage em uma ampla biblioteca cDNA, feita a partir de folhas de *A. thaliana* expostas a diversas condições de estresse, como presa (Matiolli; Melotto, 2018). Esses experimentos revelaram a interação entre o CE g5159 de *S. scitamineum* e o fator de transcrição (FT) SPL13 da família *Squamosa Promoter Binding Protein-Like* (SPL) de *A. thaliana* (Monteiro-Vitorello, trabalho em andamento), que atua na regulação de genes ligados ao meristema floral e na mudança da fase vegetativa para a fase reprodutiva (Yamaguchi *et al.*, 2009). O patossistema *A. thaliana*-*S. scitamineum* vem sendo estabelecido como um modelo para o estudo da interação cana-de-açúcar-*S. scitamineum*, uma vez que o genótipo altamente poliploide de cana-de-açúcar dificulta os estudos moleculares e análises funcionais dessa interação (Marrafon-Silva *et al.*, 2023).

A interação entre o FT SPL13 de *A. thaliana* e o CE g5159 de *S. scitamineum* foi novamente observada em experimentos de Complementação por Fluorescência Bimolecular (BiFC) e expressão transiente em folhas de *N. benthamiana* (Mendes,

2022), no qual ela ocorreu no citoplasma das células. Esses resultados trouxeram novos questionamentos sobre as regiões específicas envolvidas na interação e os motivos pelos quais o FT ficou retido no citoplasma, não sendo mais direcionado ao núcleo. Desvendar os mecanismos dessa interação pode ser de grande importância para elucidar o processo de formação do chicote durante a doença em detrimento do desenvolvimento natural das flores da planta.

Nesse sentido, este projeto visa expandir o conhecimento sobre o CE g5159, por meio de estudos funcionais para analisar sua interação com o FT SPL13 da cana-de-açúcar, identificar possíveis regiões de interação entre essas duas proteínas e avaliar a resposta da planta em experimentos de supressão de ETI e PTI com CE g5159 mutado, removendo as regiões de desordem. Esses esforços são de grande relevância, pois buscam contribuir para a caracterização do CE g5159 como um efetor definitivo, em um cenário em que o número de efetores de *S. scitamineum* identificados e descritos até o momento é limitado.

3. HIPÓTESE

A hipótese do projeto é de que o fator de transcrição de cana-de-açúcar identificado como SPL13 interage com o candidato a efetor g5159 de *S. scitamineum*. Além disso, propõe-se que a remoção das regiões desordenadas N-terminal e C-terminal do CE g5159 interferem na atividade de supressão de PTI e ETI da molécula em experimentos heterólogos.

4. OBJETIVOS

Os objetivos do projeto são: analisar a interação entre a proteína SPL13 de cana-de-açúcar e o CE g5159 do fungo *S. scitamineum*; identificar possíveis regiões de contato entre eles por meio de análises *in silico*; obter uma sequência mutante do CE g5159 sem as regiões desordenadas para avaliar a atividade de supressão da

resposta imune (PTI e ETI), de acordo com Maia *et al.* (2022). Com isso, espera-se elucidar a função do CE g5159 do fungo na modulação da resposta imune da planta contra *S. scitamineum* e a confirmar a sua interação com um fator de transcrição relacionado à transição floral.

4.1. Objetivos específicos

- Clonar a sequência de SPL13 de cana-de-açúcar previamente identificada em Mendes (2022);
- Realizar a predição da estrutura 3D das proteínas envolvidas na interação e identificar regiões em potencial de contato alvo para mutações;
- Produzir uma sequência do gene *g5159* mutante sem as regiões desordenadas identificadas utilizando PCR;
- Obter construções em vetores com a sequência do CE g5159 mutante;
- Realizar experimentos de interação entre as proteínas SPL13 e CE g5159 íntegro através do sistema duplo-híbrido em leveduras;
- Realizar experimentos para determinar supressão de ETI e PTI utilizando o CE g5159 mutante, conforme Maia *et al.* (2022).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Análise das Sequências Alvo

Para realizar a caracterização geral do gene SPL13 de cana-de-açúcar, serão utilizados bancos de dados como UniProt e InterPro para identificar seus domínios, tamanho da sequência gênica, proteína, cDNA e CDS. Além disso, ferramentas do NCBI, como o BLAST, serão empregadas para realizar alinhamentos entre diferentes sequências. Posteriormente, os primers necessários serão desenhados utilizando o software Primer3 (Rozen; Skaletsky, 2000) e Primer-Blast. Para garantir a qualidade dos primers em relação a pareamentos indesejáveis, como a formação de dímeros

(*self-dimer* ou *cross-dimer*) e de alças (*hairpins*), será utilizado o software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Além disso, os primers para amplificação do gene do CE g5159 íntegro e truncado serão desenhados seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos, com base nos resultados de modelagem 3D obtidos a partir do software AlphaFold e sua implementação no ColabFold (Mirdita *et al.*, 2022) e do AlphaFold-Multimer (Evans *et al.*, 2021). Todos os primers terão sequências adicionais necessárias para a clonagem direcional nos vetores.

5.2. Material Biológico

Os teliósporos do isolado *S. scitamineum* SSC04 (Benevenuto *et al.*, 2016), disponíveis no "Laboratório de Genética de Microrganismos João Lúcio de Azevedo" da Universidade de São Paulo - campus Piracicaba (ESALQ), serão inoculados nas gemas de cana-de-açúcar da variedade IAC66-6, que serão obtidas na área experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Após 72 h, amostras serão coletadas para a extração de RNA total, seguindo o protocolo descrito por Teixeira-Silva *et al.* (2020). O RNA total extraído será convertido em cDNA para a amplificação do gene do SPL13 de cana-de-açúcar, do CE g5159 íntegro e truncado.

Para os experimentos de duplo-híbrido, serão utilizadas células de levedura MaV203 disponíveis no kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway™ Technology (Invitrogen™).

Para o experimento de supressão da resposta imune, serão utilizadas plantas de *N. benthamiana* de 4 a 5 semanas de idade, com sementes armazenadas a 5°C e em sílica para evitar a germinação no estoque. Serão utilizadas bactérias *Pseudomonas fluorescens* cepa EtHAn, *Escherichia coli* cepa HB101, *E. coli* cepa DH5α e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, também disponíveis no

"Laboratório de Genética de Microrganismos João Lúcio de Azevedo" da Universidade de São Paulo - campus Piracicaba (ESALQ).

5.3. Extração de RNA de cana-de-açúcar

A extração de RNA total das cana-de-açúcar inoculadas com *S. scitamineum* será realizada utilizando o reagente Trizol® (Ambion by life Technologies™), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a purificação da extração, será utilizado o kit de purificação PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™) e as amostras serão, posteriormente, tratadas com DNase (Sigma Aldrich™). A qualidade da extração será avaliada em uma eletroforese em gel de agarose (1%) e pelo espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

5.4. Síntese de cDNA e Amplificação dos Genes Alvos

Para a síntese de cDNA, será utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo as instruções descritas pelo fabricante. A amplificação dos genes alvo será conduzida utilizando o kit KAPA HiFi HotStart PCR (Kapa Biosystems), também de acordo com as instruções do fabricante. Os tamanhos corretos dos produtos de PCR serão verificados por eletroforese em gel de agarose (1%) e, em seguida, purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A concentração das amostras será avaliada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific).

5.5 Clonagens e confirmações de construção

Os *amplicons* do gene do FT SPL13 de cana-de-açúcar e do CE g5159 íntegro será clonado no vetor comercial pENTR™/D-TOPO™ (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as construções contendo o gene do SPL13 e do CE g5159 íntegro serão recombinadas nos vetores pDEST32 (formando o vetor isca pEXP32) e pDEST22 (formando o vetor presa pEXP22), utilizando as enzimas Gateway® LR

Clonase® II (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Essas construções serão utilizadas para o experimento de duplo-híbrido em leveduras.

O amplicon do gene do CE g5159 truncado, sem as sequências que codificam as regiões de desordem será clonado no vetor pDONR221 (Thermo Fisher Scientific), utilizando as enzimas Gateway® BP Clonase® II (Thermo Fisher Scientific). Após isso, essa construção será recombinada com o vetor pEDV6 (Maia *et al.* 2017) utilizando as enzimas Gateway® LR Clonase® II e será utilizada para a realização dos experimentos de supressão de ETI e PTI.

Todos vetores recombinantes serão transformados em células de *E. coli* DH5α quimicamente competentes. Eles serão extraídos e purificados em coluna a partir de colônias isoladas e cultivadas overnight a 250 rpm e 37°C, de acordo com as instruções provenientes do kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). As inserções corretas das construções serão verificadas por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento.

5.5 Experimentos de Duplo-híbrido em leveduras

Com a utilização do kit ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway™ Technology (Invitrogen™), células de levedura MaV203 competentes serão transformadas por meio de choque térmico com as construções finais pEXP32 e pEXP22 obtidas. O experimento para a verificação da interação e análise dos resultados serão realizados seguindo as instruções disponibilizadas no kit utilizado.

5.6 Experimentos de supressão de PTI e ETI

Para os experimentos de supressão de PTI e ETI, *E. coli* DH5α será utilizada para a propagação da pEDV6::*g5159* mutante. A construção será transferida para *Pseudomonas fluorescens* cepa EtHAn (Upadhyaya *et al.* 2014) por meio de um

cruzamento triparental padrão, usando *E. coli* HB101 (pRK2013) como cepa auxiliar (Maia *et al.* 2017). As células transconjugadas de *P. fluorescens* EtHAn serão selecionadas em meio sólido Luria-Bertani (LB) contendo gentamicina e cloranfenicol.

A supressão de PTI induzida por *P. fluorescens* EtHAn em *N. benthamiana* será realizada conforme descrito por Maia *et al.* (2022). Suspensões de *P. fluorescens* EtHAn que expressam a construção pEDV6::g5159 mutante e os controles negativos serão infiltrados em folhas de *N. benthamiana* usando uma seringa. O desenvolvimento de PTI será monitorado ao longo de 7 horas. Após esse período, uma solução de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 será infiltrada em uma área sobreposta. Após 3 dias, o colapso do tecido na região de sobreposição será avaliado. A supressão de PTI será estimada analisando a porcentagem de folhas infiltradas que exibem uma reação de hipersensibilidade (HR) induzida pela *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 em três experimentos independentes, com oito repetições biológicas cada.

Para verificar se o CE g5159 mutante é capaz de suprimir as respostas de ETI, será utilizado um ensaio com base na reação da morte celular induzida por AvrB (Teixeira-Silva *et al.*, 2020). Suspensões bacterianas de *P. fluorescens* EtHAn expressando a construção pVSP6::AvrB (Innes *et al.* 1993) e *P. fluorescens* EtHAn expressando a construção pEDV6::g5159 mutante serão misturadas e infiltradas em folhas de *N. benthamiana*, utilizando uma seringa. Como controles negativos, serão utilizadas co-infiltrações de *P. fluorescens* EtHAn contendo pVSP6::AvrB e *P. fluorescens* EtHAn contendo pEDV6 vazio. A supressão de ETI será inferida quando o CE g5159 mutante suprimir ou atenuar o colapso do tecido em mais de 50% das folhas co-infiltradas.

6. CRONOGRAMA

Atividades	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Análise das sequências, desenho de primers, predição das estruturas 3D e interações	X					
Extração RNA, síntese de cDNA; amplificação dos genes alvos	X	X				
Construção do vetores		X	X			
Experimentos para determinar supressão de ETI e PTI;			X	X		
Experimento de duplo-híbrido em levedura				X	X	
Análise de dados				X	X	X
Escrita do TCC				X	X	X
Apresentação e entrega do TCC						X

Este projeto é financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no processo 2023/13701-9.

REFERÊNCIAS

AGISHA, V. N. *et al.* Molecular Discrimination of Opposite Mating Type Haploids of *Sporisorium scitamineum* and Establishing Their Dimorphic Transitions During Interaction with Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 24, n. 5, p. 1430–1440, 12 jan. 2022.

BATISTA, E. D. R. **Análise da variabilidade e perfil de expressão das quitinases de cana-de-açúcar durante a infecção por *Sporisorium scitamineum*.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2023.

BENEVENUTO, J. *et al.* Molecular variability and genetic relationship among Brazilian strains of the sugarcane smut fungus. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 24, 1 dez. 2016.

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

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileiro** – Cana-de-açúcar: Quarto levantamento, abril 2023 – safra 2022/2023. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2023. Disponível em:

<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/47195_94fff688f8d04822096cf788ed0a95d6>. Acesso em: 12 mai. 2024.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileiro** – Cana-de-açúcar: Quarto levantamento, abril 2024 – safra 2023/2024. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/52732_1ba60aad418c90b0a86daf409a3703a5>. Acesso em: 12 mai. 2024.

DOBREV, V. S. *et al.* Characterization of the binding of small molecules to intrinsically disordered proteins. In: **Methods in Enzymology**. Elsevier, 2018. p. 677–702.

EVANS, R. *et al.* Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. **BioRxiv**, 4 out. 2021.

FAOSTAT. **Crops and livestock products: Sugar cane**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 12 mai. 2024.

FERREIRA, T. H. S. *et al.* Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 23 jun. 2017.

INNES, R. W. *et al.* Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the RPG1 locus of soybean. **The Plant journal**, v. 4, n. 5, p. 813–820, 1993.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

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, 12 nov. 2021.

MAIA, T. *et al.* The *Hemileia vastatrix* effector HvEC-016 suppresses bacterial blight symptoms in coffee genotypes with the SH 1 rust resistance gene. **The new phytologist**, v. 213, n. 3, p. 1315–1329, 2017.

MAIA, T. *et al.* A bacterial type three secretion-based delivery system for functional characterization of *Sporisorium scitamineum* plant immune suppressing effector proteins. **Phytopathology**, v. 112, n. 7, p. 1513–1523, 2022.

MANIMEKALAI, R.; SURESH, G.; SINGARAVELU, B. Sugarcane Transcriptomics in Response to Abiotic and Biotic Stresses: A Review. **Sugar Tech**, 15 fev. 2022.

MARÍN, M.; UVERSKY, V. N.; OTT, T. Intrinsic disorder in pathogen effectors: Protein flexibility as an evolutionary hallmark in a molecular arms race. **The plant cell**, v. 25, n. 9, p. 3153–3157, 2013.

MARQUES, J. P. R. *et al.* Sugarcane smut: shedding light on the development of the whip-shaped sorus. **Annals of Botany**, p. mcw169, 27 ago. 2016.

MARRAFON-SILVA, M. *et al.* Exploring potential surrogate systems for studying the early steps of the *Sporisorium scitamineum* pathogenesis. **Phytopathology**, 2023.

MATIOLLI, C. C.; MELOTTO, M. A comprehensive *Arabidopsis* yeast two-hybrid library for protein-protein interaction studies: A resource to the plant research community. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 31, n. 9, p. 899–902, 2018.

MENDES, J. F. **Protein-protein interaction between a candidate effector of *S. scitamineum* and a transcription factor of *A. thaliana* to study the smut-sugarcane pathosystem.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 8 fev. 2022.

MIRDITA, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Progress in understanding fungal diseases affecting sugarcane: smut. **Achieving sustainable cultivation of sugarcane.** Volume 2, p. 221–243, 5 mar. 2018.

PIEPENBRING, M. *et al.* The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, v. 1, n. 1, p. 71–80, fev. 2002.

RAJPUT, M. A. *et al.* Impact of *Sporisorium scitamineum* infection on the qualitative traits of commercial cultivars and advanced lines of sugarcane. **PloS one**, v. 17, n. 5, p. e0268781, 2022.

RAJPUT, M. A. *et al.* Sugarcane smut: Current knowledge and the way forward for management. **Journal of fungi**, v. 7, n. 12, p. 1095, 2021.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology**, v. 132, p. 365–386, 2000.

SÁNCHEZ-ELORDI, E. *et al.* Effects of abiotic stresses on sugarcane plants with emphasis in those produced by wounds and prolonged post-harvest periods. Em: TRIPATHI, D. K. *et al.* (Eds.). **Plant Life Under Changing Environment.** San Diego, CA, USA: Elsevier, 2020. p. 251–269.

SEONG, K.; KRASILEVA, K. V. Prediction of effector protein structures from fungal phytopathogens enables evolutionary analyses. **Nature microbiology**, v. 8, n. 1, p. 174–187, 2023.

SUNDAR, A. *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. 339, 1 dez. 2020.

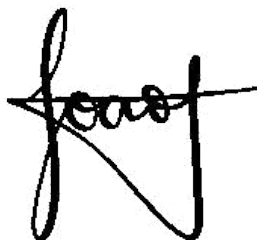
UPADHYAYA, N. M. *et al.* A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 27, n. 3, p. 255–264, 2014.

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.

YAMAGUCHI, A. *et al.* The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. **Developmental Cell**, v. 17, n. 2, p. 268–278, ago. 2009.

YUAN, M. *et al.* PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 62, n. 102030, p. 102030, 2021.

ZUO, W. *et al.* Molecular Interactions Between Smut Fungi and Their Host Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 57, n. 1, p. 411–430, 25 ago. 2019.



João Vitor Ferro Mazzei



Claudia Barros Monteiro Vitorello



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

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

Piracicaba, 23 de agosto de 2021.

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