

INSTITUTO FEDERAL GOIANO
CAMPUS URUTAÍ

PAULA RODRIGUES NEVES

**OCORRÊNCIA E IDENTIDADE MOLECULAR DO CARVÃO-
DO-CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) UTILIZANDO
REGIÕES ITS do rDNA E β -TUBULINA**

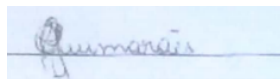
URUTAÍ – GOIÁS
2019

PAULA RODRIGUES NEVES

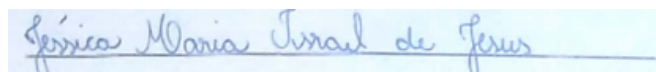
**OCORRÊNCIA E IDENTIDADE MOLECULAR DO CARVÃO-
DO-CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) UTILIZANDO
REGIÕES ITS do rDNA E β -TUBULINA**

Monografia apresentada ao IF Goiano-Campus Urutaí, como parte das exigências do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas para a obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.


Aprovada em 19 de Dezembro de 2019.



Banca Msc. Gesiane Ribeiro Guimarães
Doutorando em Agronomia
Universidade Federal de Uberlândia- UFU



Banca Msc. Jéssica Maria Israel de Jesus
Doutoranda em Fitopatologia
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ



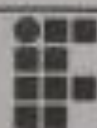
Orientador Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí
URUTAÍ – GOIÁS
2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

No Neves, Paula Rodrigues Neves
 Ocorrência e Identidade Molecular do Carvão-do-
Capim-Amargoso (*Digitaria insularis*) Utilizando
regiões ITS do rDNA e β -Tubulina / Paula Rodrigues
Neves Neves; orientador Milton Luiz da Paz Lima Lima.
-- Urutaí, 2019.
 21 p.

 Monografia (em Licenciatura em Ciências
Biológicas) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Urutaí, 2019.

 1. Identificação molecular. 2. Patógeno obrigatório.
3. *Sporisorium panici-leucophaei*. I. Lima, Milton
Luiz da Paz Lima, orient. II. Título.



INSTITUTO FEDERAL

Goiano
Câmpus Urutai

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL GOIANO - Câmpus Urutai
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

As 13 horas do dia 19 de _____ de _____, reuniu-se na sala nº _____ do Prédio _____ do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

Goiano - Câmpus Urutai, a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado

" OCORRÊNCIA E IDENTIDADE MOLECULAR DO CARVÃO-DO-CAPIM-AMARGOSO (DIGITARIA INSULARIS) CAUSADO POR SPORISORIUM PANICI-LEUCOHAEM "

composta pelos professores MILTON LUIZ DA PAZ LIMA, GESANE RIBEIRO GUIMARÃES e JESSICA MARIA ISRAEL DE JESUS, para a sessão

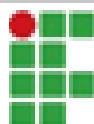
de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas. Abrindo a sessão o(a) orientador(a) e Presidente da Banca Examinadora, Prof. MILTON LUIZ DA PAZ LIMA,

após dar a conhecer aos presentes a dinâmica da presente defesa, passou a palavra ao(a) licenciando(a) PAULA RODRIGUES NEVES para

apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos membros da Banca Examinadora e respectiva defesa do(a) licenciando(a). Nesta ocasião, foram solicitadas algumas correções no texto escrito, as quais foram acatadas de imediato. Logo após, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do(a) licenciando(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. O(A) aluno(a) foi considerado(a) APROVADO (APROVADO ou NÃO APROVADO), por unanimidade, pelos membros da Banca Examinadora, tendo sido atribuído a nota (8,5) ao seu trabalho. O resultado foi então comunicado publicamente ao(a) licenciando(a) pelo(a) Presidente da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado o julgamento que tem por conteúdo o teor desta ata que, após lida será assinada por todos os membros da Banca Examinadora para fins de produção de seus efeitos legais.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Notas
1. <u>Milton Luiz da Paz Lima</u>	<u>8,6</u>
2. <u>Gesane Ribeiro Guimarães</u>	<u>9,3</u>
3. <u>Jessica Maria Israel de Jesus</u>	<u>7,7</u>
Média final:	<u>8,5</u>

Urutai-GO, 19 de DEZEMBRO de 2019



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

**Repositório Institucional do IF Goiano - RIIIF Goiano
Sistema Integrado de Bibliotecas**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Paula Rodrigues Neves

Matrícula: 2015101220530442

Título do Trabalho: OCORRÊNCIA E IDENTIDADE MOLECULAR DO CARVÃO-DO-CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) CAUSADO POR *Sporisorium panici-leucophaei*

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: Publicação de artigo

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: 20/12/2020

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Unial, 10/01/2020

Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Cliente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

Dedico este trabalho a Paula Rodrigues Neves por ter seguido em frente nos piores momentos e não ter desistido e poder alcançar os seus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho. Agradeço aos meus familiares, minha mãe Helena Neves Rodrigues e meu pai José Rodrigues Nogueira e meus irmãos Edina Rodrigues Nogueira, Camila Rodrigues Neves, Leila Rodrigues Neves e Isaque Rodrigues Neves, por me lembrarem de quem eu sou e aonde desejo chegar. Aos meus sobrinhos Victor Eduardo Alves Rodrigues, Joana Milena Alves Rodrigues, Viviane Alves Rodrigues, Maria Cecília Alves Rodrigues e Ismael Alves Rodrigues por trazerem a esperança no olhar. Meus amigos que me apoiaram em minhas decisões e estiveram nos momentos mais importantes comigo.

Em especial minha amiga Jennifer Decloquement que esteve comigo no início da minha graduação em uns dos momentos mais conflituosos da minha vida. A minha amiga Gesliene Paula dos Santos que esteve comigo na metade desse ciclo que passei no meu curso me apoiando e cuidando de mim. A minhas amigas Ana Paula Neres Kramer e Gesiane Ribeiro Guimarães por estarem comigo nessa etapa que se termina me dando o apoio e brocas necessárias. Sinto-me grata também por todos que passaram pela minha vida e tive a oportunidade de aprender algo novo.

Ao meu orientador Milton Luiz da Paz Lima que foi de extrema importância na minha formação acadêmica e crescimento pessoal, pelos conselhos que recebi mesmo que eu não tenha seguido a maioria deles.

A Jessica que foi de extrema importância na análise molecular das amostras, não sendo possível realizar o trabalho sem o seu auxílio e dedicação nas análises.

Aos meus professores e ao Instituto Federal Goiano Campus Urutaí, por minha formação acadêmica.

“Ninguém é sujeito da autonomia de ninguém. Por outro lado, ninguém amadurece de repente, aos 25 anos. A gente vai amadurecendo todo dia, ou não. A autonomia, enquanto amadurecimento do ser para si, é processo, é vir a ser.”
(Paulo Freire).

RESUMO

OCORRÊNCIA E IDENTIDADE MOLECULAR DO CARVÃO-DO-CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*) UTILIZANDO REGIÕES ITS do rDNA E β -TUBULINA

Resumo – Os fungos causadores carvões que afetam plantas daninhas são pouco estudados dado ao imenso foco e reconhecimento de interações de fitopatógenos sobre plantas cultivadas, mesmo sendo uma importante fonte de sobrevivência de fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi identificar, diagnosticar e sequenciar regiões conservadas do agente causal do carvão-do-capim-amargoso. Amostras de capim-amargoso apresentando sintomas de chicote e colapso da folha principal foram analisadas. Preparou-se lâminas semipermanentes, para caracterização morfológica, morfométrica e registros macro e microfotográficos. Coletou-se ustilósporos para extração do DNA, amplificação utilizando primers ITS-1[TCCGTAGGTGAACCTGCGG], ITS-4 [TCCTCCGCTTATTGATATGC], Bt2a[GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC] e Bt2b [ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC] e sequenciamento. Os soros apresentaram perídios compostos por células fúngicas, filiformes ou delgadas, os ustilósporos algumas vezes agrupados, esféricos, de diâmetros 8,4-(6,4) -3,1 μ m, dimórficos, com ausência de células estéreis entre os “spore balls”. As sequências foram comparadas com aquelas depositadas no gene Bank do “National Center for Biotechnology Information’s”. A região ITS produziu amplicons de 700 bp, e o gene que amplifica a região conservada b-tubulina produziu um amplicon de 520-710 bp. A análise morfológica e filogenética apontou que o isolado detectado no município de Urutaí, GO, como pertencente a espécie *Sporisorium panici-leucophaei* (Ustilaginales, Ustilaginaceae) somente registrado na Oceania, Sul do Brasil e continente Africano até o presente.

Palavras-chave – Identificação molecular, Parasita obrigatório, *Sporisorium panici-leucophaei*.

ABSTRACT

OCCURRENCE AND MOLECULAR IDENTITY OF BITTER COAT (*Digitaria insularis*) USING RDNA ITS REGIONS AND β -TUBULINE

Coal-causing fungi affecting weeds are poorly studied. Given the immense focus and recognition of plant pathogen interactions on plants cultivated, even though it is an important source of phytopathogen survival. The goal the aim of this work was to identify, diagnose and sequence conserved regions of the causative agent from the bitter grass. Samples of bitter grass showing symptoms of whip and collapse of the main leaf were analyzed. Semipermanent slides were prepared, for morphological, morphometric characterization and macro and microphotographic records. Ustilosporos were collected for DNA extraction, amplification using ITS-1 primers. [TCCGTAGGTGAACCTGCGG], ITS-4 [TCCTCCGCTTATTGATATGC], Bt2a [GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC] and Bt2b [ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC] and sequencing. The sera presented peridium composed of fungal, filiform cells. Or thin, the sometimes clustered spherical ustilosporos of diameters 8.4- (6.4) -3.1 μm , dimorphic, with no sterile cells between spore balls. The sequences were compared to those deposited in the Bank gene of the National Center for Biotechnology Information's". The ITS region produced 700 bp amplicons, and the gene that amplifies the region Preserved b-tubulin produced a 520-710 bp amplicons. Morphological analysis and phylogenetic analysis pointed out that the isolate detected in the municipality of Urutaí, GO, as belonging to *Sporisorium panici-leucophaei* (Ustilaginales, Ustilaginaceae) species only recorded in Oceania, Southern Brazil and the African continent to the present.

Keywords –. Molecular Identification, Obligatory parasite, *Sporisorium panici-leucophaei*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS	22

INTRODUÇÃO

O gênero *Digitaria* tem cerca de 300 espécies que está distribuído por várias partes do mundo, no qual o Brasil possui a maior diversidade desse gênero no continente americano, possuindo 26 espécies nativas e 12 exóticas. Tendo destaque nesse gênero a espécie *Digitaria insularis* (Gazola et al., 2016).

O capim amargoso (*D. insularis* (L.) Fedde.) é uma planta perene de porte herbáceo com formação de touceiras, porte ereto e raízes rizomáticas, colmos estriados com porte médio de altura de 75 cm de altura, nativa de regiões tropicais e subtropicais da América. Propaga-se por sementes e através de curtos rizomas (Lorenzi, 2008). É uma planta pioneira sendo de grande importância ecológica, são as primeiras plantas a colonizar áreas de sucessão secundária, tendo uma rápido desenvolvimento e disseminação devido ao seu curto ciclo, sendo necessária para iniciar o desenvolvimento sucessório de arbustos e arbóreas (Pitelli, 1987).

De grande importância na produção agrícola, sendo um fator de competição entre elas e plantas cultivadas, sendo plantas pioneiras mais resistentes a situações adversas. O uso de herbicidas é uma das formas de controle mais usadas no meio agrícola, no qual o uso de forma inadequada aumenta a pressão de seleção, no qual indivíduos da espécies com características mais resistentes são selecionadas aumentando assim a sua população (Oliveira; Freitas, 2008).

Entre os fatores de importância agrícola e ecológica estão as doenças de plantas são classificadas como bióticas e abióticas, sendo doença definido com de ordem fisiológica, bioquímica, citológica, histológica ou morfológicas essas alterações visuais no hospedeiro são provocadas pelo desenvolvimento do patógeno (Blum et al., 2012).

Dentre as doenças que assola as plantas estão os carvões de plantas que estão na classificação de Mcnew no grupo VI que são representados pelos carvões, galhas e viroses.

Estes patógenos são responsáveis na interferência do aproveitamento de substâncias fotossintetizadas, apresentando na evolução planta-patógeno uma especialização maior que outros grupos, o que os torna mais específicos e menos agressivos (Bendendo, 2018).

Os carvões de plantas são causados por agentes causais da divisão Basidiomycota sendo a classe Ustilaginomycetes pertencente a mais de 1000 espécies que são distribuídas entre 60 gêneros, sendo a ordem Ustilaginales a mais importante (Massola Junior, 2018). Os carvões são chamados porque eles formam uma pulverulência negra, representada por massas de esporos lembrando um fuligem ou carvão; todos os organismos causadores de carvões são parasitas de plantas, apresentam 1100 espécies que infectam angiospermas em mais de 75 famílias botânicas (Alexopoulos; Mims, 1979).

Existem três espécies de fungos causadores de carvões em *Digitaria insularis*, sendo eles representados por *Lundquistia panici-leucophaei* (Bref.) Vánky (2004) tendo um registro de ocorrência no Brasil em *D. insularis*; além dessa espécie foi relatado *Sporisorium cordobense* (Speg) Vánky (2000) infectando *D. insularis* na Argentina por Vank (2000) e na Bolívia por (Stoll et al., 2005); e terceiro gênero de fungo causador de carvão em *D. insularis* foi *Sporisorium panici-leucophaei* sendo relatado no Brasil por Cunnigton et al.(2005). Existem 394 táxons de *Sporisorium* spp. (fungos causadores de carvões) registradas no mundo, não sendo verificado formaes speciales e variedades; já o gênero *Lundquistia* spp. tem-se registrado apenas cinco táxons [*L. dieteliana* (Henn.) Vanky (2004); *L. duranii* (Vánky) Vánky (2004); *L. fascicularis* Vánky(2001); *L. mexicana* Vánky(2004) e *L. panici-leucophaei* (Bref.) Vánky(2004)]; (Index Fungorum, 2019).

De acordo com Alexopoulos e Mims (1979) a divisão Basidiomycetes é representada por uma classe sem himênio exposto e ou basidiocarpo presente, com basídia septada contendo quatro células é representada pela classe Phragmobasidiomycetidae, a segunda classe sem

himênio exposto e ou basidiocarpo presente e basidia apresentando uma célula simples denomina-se Holobasidiomycetidae, e com basidiocarpo ausente, emissão de um metabasídio de parede espessa produzindo um esporo de resistência origina a terceira classe denominada de Teliomycetidae.

O micélio dicariótico dos carvões infectam flores de plantas mais comumente, o micélio se desenvolve intracelularmente no tecido, em algumas circunstâncias as estruturas intercelulares assemelham-se a haustório, os grampos de conexão também são encontrados no micélio de muitas espécies. Os ustilósporos podem desenvolver em vários órgãos da planta hospedeira como flores, folhas, caules, rizomas e raízes. A superfície e ou ornamentações dos ustilósporos, importantes para taxonomia podem ser reticulados, equinulados, tuberculados ou lisos. Outras características importantes para identificação são o tamanho forma e coloração. A germinação dos teliósporos são favorecidas por condições de baixas temperaturas. A germinação do pró-micélio (metabasídio) dá origem ao basidiósporo que quando germinado forma um micélio no hospedeiro que mais tarde formará o ustilósporo/teliósporo (Alexopoulos; Mims, 1979). O teliósporo após germinado forma três septos sempre, apresentando espécies de fungos causadores de carvões tanto homotáticas como heterotáticas para produzirem teliósporos de origem sexual (Massola Junior, 2018).

O rDNA é uma ferramenta importante para avaliação de polimorfismo nos fungos. Existem muitas cópias de rDNA, como 18S, 5.8S, 28S, as quais são arranjadas por espaços não codificados (regiões conservadas e/ou sítios de conservação evolutiva). As sequências codificadas do rDNA são altamente conservadas entre espécies de fungos. A diferenciação genética entre populações de uma espécie constitui o primeiro estágio da divergência evolutiva. Essa diferenciação resulta, na maioria dos casos, da ação de diferentes ambientes a que cada população está sujeita sobre a variabilidade preexistente na espécie (Marques, 2003).

Os métodos usuais de identificação de espécies de fungos causadores de carvões são baseados em critérios de sintomatologia e morfologia de estruturas reprodutivas, sendo uma característica importante para a identificação e, em muitos casos, pode proporcionar uma rápida e confiável caracterização (Wilcoxson; Saari, 1996). Todas as técnicas conhecidas de diagnóstico molecular fundamentam-se na análise direta ou indireta da composição ou na sequência dos ácidos nucleicos para identificação e caracterização de organismos e características genéticas de interesse (Marques et al., 2002). A técnica mais utilizada em fungos é a amplificação de rDNA por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esta técnica permite a amplificação de regiões específicas do genoma, como o Espaço Interno Transcrito (ITS), localizado entre regiões altamente conservadas, como as regiões correspondentes aos genes 18S e 28S. O ITS é altamente conservado na espécie, mas é variável entre espécies, sendo frequentemente usado para taxonomia (Gomes et al., 2002). A região β -tubulina é utilizada na identificação molecular devido ter uma análise comparativa mais próximas, que facilita a comparação entre membros da mesma espécie (RAMOS, 2016).

O objetivo deste trabalho foi identificar, diagnosticar e sequenciar regiões conservadas do agente causal do carvão-do-capim-amargoso.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de capim amargoso contendo fungo causador de carvão foram encontradas no município de Urutaí- GO.

A planta hospedeira contendo sintomas e sinais de fungos característicos da ordem Ustilaginales de uma planta com tecidos sintomáticos do capim-amargoso foram examinadas no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí- GO apresentando sintomas aparentes de carvão no ano de 2018.

Planta com sintomas/sinais aparentes de fungo causador de carvão em folhas e gemas meristemáticas foram primeiramente analisadas em microscópio estereoscópico. As estruturas fúngicas foram retiradas com auxílio de estilete de ponta fina e colocadas em lâminas de vidro contendo fixador lactofenol (200 mL.L⁻¹ fenol fundido, 200 mL.L⁻¹ ácido láctico; 400 mL.L⁻¹ glicerina branca; 0,5 h.L⁻¹ azul de algodão; 200 mL.L⁻¹ água purificada) em seguida lamínula de vidro foi sobreposta e vedada com esmalte. Esse processo é caracterizado com lâmina semipermanente.

As lâminas semipermanentes foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon® ECLIPSE NI-U, acoplada a câmera Feldmann Wild leitz® FWL DIGI-PRO ligado ao computador no qual é feita a captura e medições através do programa TouPTek 3.7 para largura e comprimento do teliósporos/Ustilósporos, na objetiva de 60x. As medidas referentes foram realizadas com 100 repetições e foram consideradas as dimensões médias. Os sintomas foram fotografados com câmera profissional Canon Eos T6i.

Os dados catalogados no Index fugorum foram utilizados como comparativo com os dados morfológicos apresentados no material coletado. Foi feita coleta dos ustilósporos para um microtúbulo e armazenados a -20° C. Foi feito a extração do DNA realizando o método

CTBA (Cetiltrimetil brometo de Amônio) (Doyle; Doyle, 1990). A partir do material coletado, Foi feita à amplificação de 2 genes e 4 regiões de amplificação (Tab.1).

Tabela 1. Listagem de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento utilizados para amplificação na reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Código do oligonucleotídeo	Sequência no oligonucleotídeo	Temperatura de anelamento
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	60
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	60
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	58
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	58

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio em tampão TAE IX e visualizados sob luz ultravioleta para verificação da amplificação e a pureza dos amplicons. Os produtos de PCR foram tratados com as enzimas ExoSAP-IT (USB) e sequenciados. As sequências de nucleotídeos foram editadas com o programa Bootstrap obtido com alinhamento de sequências entre as regiões conservadas ITS1-5.8S-ITS2 e β -tubulina de *Ustilago Trichophora*, *U.davisii*, *U. avenae*, *U. striiformis*, *U. cynodantis*, *U. cynodantis 2*, *U. Maydis*, *U. Kamerinsis* e a sequência da região ITS de *Puccinia coronate* que foi adicionada para servir de outgroup (DNA baser).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sintomatologia do carvão do capim amargoso:

Os sintomas concentram-se nas regiões apicais, resultando num sintoma similar a um chicote da folha principal do capim amargoso. Existe uma modificação do meristema apical e ou colmo, de 60 a 100 mm de comprimento, que se observa o desenvolvimento e/ou cobertura de uma película hialina e clara de tecido epidérmico do hospedeiro (Fig. 1ABC), o qual quando maduro rompe-se originando pequenos filamentos recobertos por pulverulência (sinais), que rompem-se e espalham os esporos (Fig. 1DE) para serem disseminados para o ambiente. Ocorre a formação de um chicote de ângulo agudo conspícuo (Fig. 1C) o que representa a formação de galhas (hipertrofia e hiperplasia) em ocorrência da infecção em capim amargoso (Fig. 1ABC). De acordo com Stoll et al.(2004) as características morfológicas não foram capazes da diferenciação dos gênero dos gênero *Ustilago* e *Sporisorium* entretanto na caracterização molecular, a árvore filogenética demonstra um certo distanciamento entre espécies dos gêneros em questão.

Etiologia da do carvão do capim amargoso:

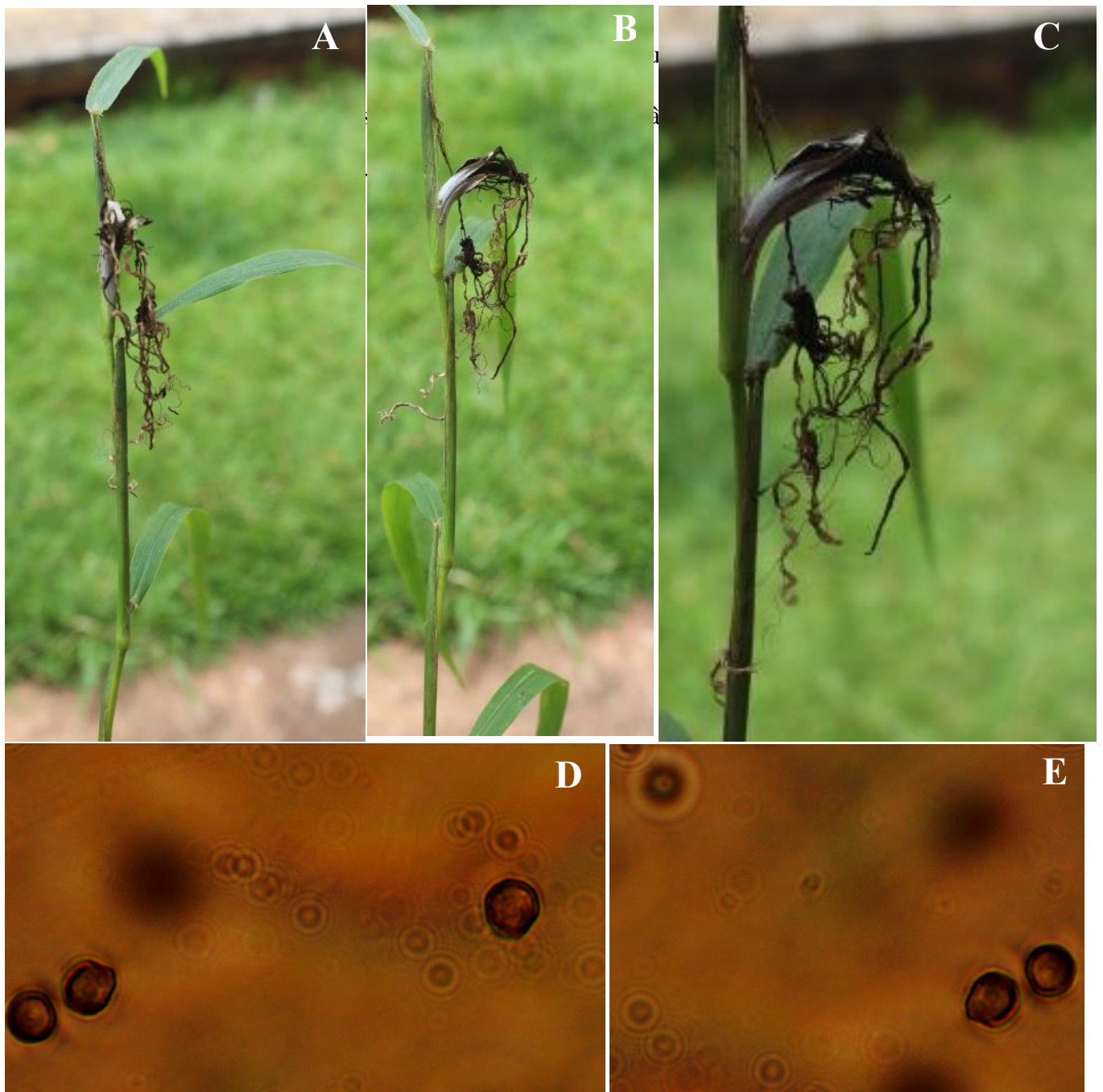


Figura 1. Sintomatologia do carvão do capim amargoso causado por *Sporisorium panici-leucophaei*. AB. Modificação do meristema apical e ou colmo, recoberto por uma película hialina e clara de tecido epidérmico (quando maduro rompe-se em pequenos filamentos), que ao se romper expõe massa de ustilósporos/teliósporos, C. ângulo agudo de ramificação do chicote, DE. Ustilosporos/teliósporos esférico de superfície lisa.

Sequenciamento de regiões conservadas do fitopatógeno:

A região ITS produziu amplicons de 700 bp, e o gene que amplifica a região conservada b-tubulina produziu um amplicon de 520-710 bp. O carvão causador de doenças em plantas do capim amargoso mostrou um distanciamento (Fig.2) com fungos do gênero *Ustilago* sp. sendo ele não pertencente ao mesmo. As sequências foram comparadas com aquelas depositadas no gene Bank do “National Center for Biotechnology Information’s”.

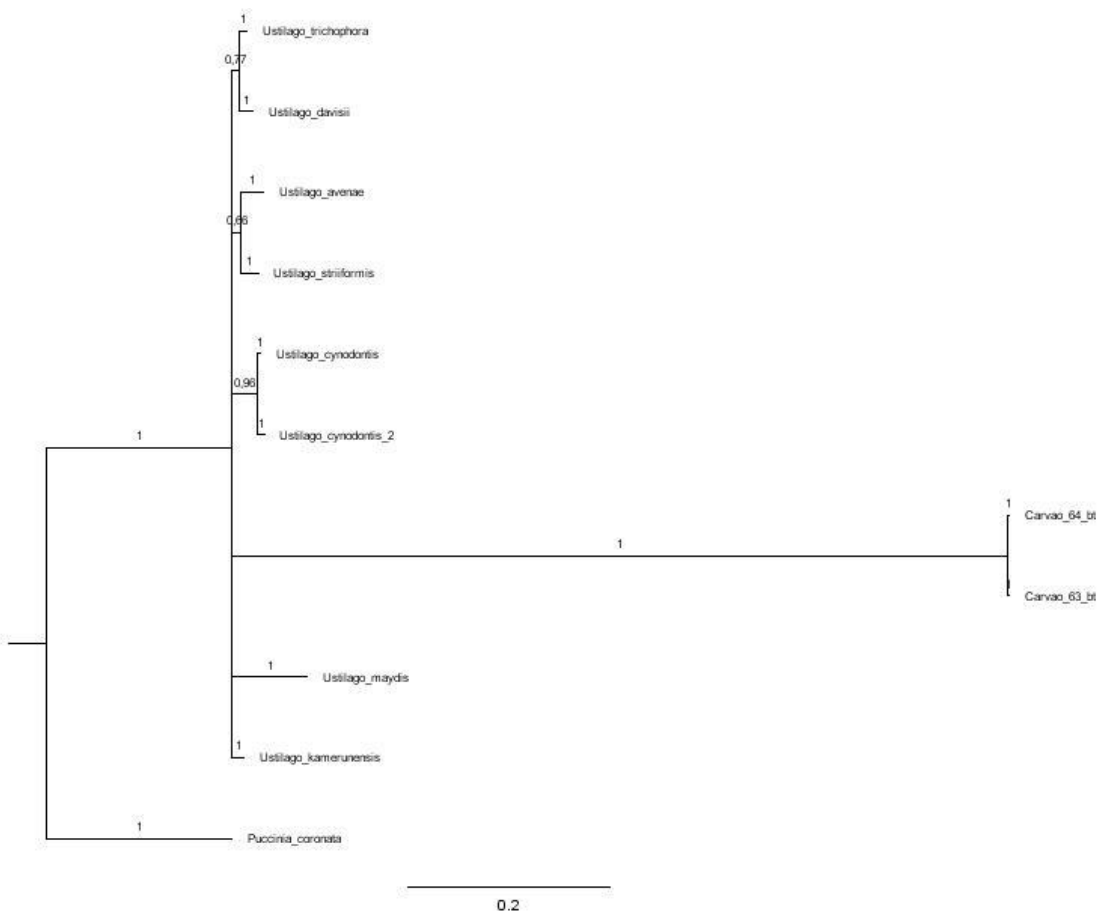


Figura 2. Cladograma obtido com alinhamento de sequências entre as regiões conservadas ITS1-5.8S-ITS2 e β -tubulina de diferentes espécies de fungos causadores de carvões. A sequência da região ITS de *Puccinia coronata* foi adicionada para servir de outgroup. (DNA baser).

CONCLUSÕES

A análise morfológica e filogenética mostrou que o isolado detectado pertence a espécie (Ustilaginales, Ustilaginaceae) *Sporisorium panici-leucophaei*, no qual não se tinha registro na literatura no município de Urutaí-GO e registro no Estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C. W. 1979. *Introductory mycology*. 3a. Ed. org. C.W.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS. New York, USA: John Willey.

BENDENDO, I.P. Classificação de doenças. IN: Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5ª Ed. Ouro Fino-MG: *Agrônoma Ceres*, 2018. 573p. Cap 21.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

GAZOLA, T; BELAPART, D; CASTRO, E.B; CIPOLA FILHO, M.L; DIAS, M.F. Características biológicas de *Digitaria insularis* que conferem sua resistência à herbicidas e opções de manejo. *Científica*, Jaboticabal, v.44, n.4, p.557-567, 2016.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C. M.; BARROS, E.G. & BORGES, A.C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetic Molec. Biol.*, v. 25 p.477-483, 2002.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. 4ª. Ed. Instituto Plantarum. 2008. 640 p.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R. & FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. & AZEVEDO, J.L. *Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul, 2002. 433p.

MARQUES, E.K. *Diagnóstico genético molecular*. Canoas, ULBRA, 2003. 372p.

MASSOLA JUNIOR, N. S. 2018. Fungos fitopatogênicos. In *Manual de fitopatologia, princípios e conceitos*, org. A. Amorim, L. Rezende, J.A.M., Bergamin Filho. Ouro Fino, MG: Editora Agronômica Ceres, 2018 p. 107–140.

OLIVEIRA, A.R; FREITAS, S.P. Levantamento fitossociológico de plantas daninhas em áreas de produção de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 26, n. 1, p. 33-46, 2008.

PITELLI, R.A. *Série Técnica IPEF*, Piracicaba, v.4, n.12, p.1 – 24, 1987.

RAMOS, T. C. A. A. identificação e caracterização genética para prospecção do potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solos do quadrilátero ferrífero. Universidade Federal de São João Del-Rei, Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. MG-Sete lagoas-MG, 2016.

STOLL, M.; BEGEROW, D.; OBREWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of RdnA sequences. *Mycol. Res.* v. 109 p 342-356, 2005.

WILCOXSON, R.D., SAARI, E. E. 1996. *Bunt and smut diseases of wheat, concepts and methods of diseases management*. 1a. Ed. org. E.E. Wilcoxson, R.D., Saari. Mexico: CIMMYT.