



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**Fatores que influenciam no sucesso e longevidade do  
controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades  
resistentes**

**TATIANE DE FÁTIMA MISTURA**

**Araras**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**Fatores que influenciam no sucesso e longevidade do  
controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades  
resistentes**

**TATIANE DE FÁTIMA MISTURA**

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO SEITI URASHIMA

CO-ORIENTADOR: Dr. RENÉE S. ARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Produção Vegetal e  
Bioprocessos Associados como requisito  
parcial à obtenção do título de MESTRE  
EM PRODUÇÃO VEGETAL E  
BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M678f Mistura, Tatiane de Fátima  
Fatores que influenciam no sucesso e longevidade  
do controle das ferrugens da cana-de-açúcar por  
variedades resistentes / Tatiane de Fátima Mistura. -  
- São Carlos : UFSCar, 2016.  
59 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Saccharum spp. 2. Ferrugem alaranjada. 3.  
Ferrugem marrom. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos  
Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tatiane de Fátima Mistura, realizada em 29/06/2016:

---

Prof. Dr. Alfredo Seiji Urashima  
UFSCar

---

Prof. Dr. Luís Otávio Saggion Beriam  
IBC-SP

---

Prof. Dr. Roberto Giacomini Chapola  
FAI

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por sempre guiar meu caminho e iluminar minhas escolhas;*

*Ao Prof. Dr. Alfredo Seiiti Urashima pela orientação, conhecimentos transmitidos, amizade e confiança;*

*Ao Dr. Renée S. Arias pela ajuda nas análises genéticas e fornecimento das sequências dos marcadores microssatélites;*

*Ao Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de São Carlos (PMGCA/UFSCar) pelo fornecimento de gemas e inóculo de ferrugem;*

*Ao Laboratório de Genética Molecular (LAGEM) e a todos os funcionários, estagiários e mestranda;*

*A prof<sup>a</sup>. Dr. Monalisa Sampaio por conceder a coleta de ferrugem marrom no painel brasileiro de genótipos de cana-de-açúcar*

*Aos meus pais José e Maria por sempre me incentivarem nos momentos de fraqueza;*

*Em especial a tia Meire, que cedeu sua casa para eu ficar, esses longos sete anos e acompanhou toda minha jornada;*

*Ao meu namorado Gustavo pelo carinho e companheirismo todos esses anos;*

*A todos os amigos e amigas que de algum modo me apoiaram e acreditaram em mim;*

*Ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados*

*A Capes pela bolsa de estudos durante o curso*

*Obrigada!*

## SUMÁRIO

	Página
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVO</b> .....	3
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
1. Importância da cana-de-açúcar.....	4
2. Ferrugens.....	5
3. Controle.....	6
3.1 Avaliação da reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem.....	7
3.1.1 Campo e casa de vegetação.....	7
3.1.2 Escalas diagramáticas.....	8
3.2 Diversidade do patógeno.....	8
3.2.1 Marcadores moleculares – microssatélites.....	9
3.2.2 Correlação direta entre diversidade genética e fenótipos virulentos.....	10
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	11
<b>CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA DOS PATÓGENOS CAUSADORES DAS FERRUGENS EM CANA-DE-AÇÚCAR</b> .....	17
1. Resumo.....	17
2. Introdução.....	18
3. Materiais e Métodos.....	18
3.1 Isolados de <i>P. melanocephala</i> e <i>P. kuehnii</i> .....	18
3.2 Extração de DNA de <i>P. melanocephala</i> e <i>P. kuehnii</i> .....	21
3.3 Amplificação por PCR.....	21
3.4 Ajuste no PCR para <i>P. melanocephala</i> .....	22
3.5 Análise dos dados.....	23
3.6 Cultivares utilizadas para inoculação.....	23
3.7 Preparação do inóculo e inoculação.....	23
3.8 Viabilidade dos urediniósporos.....	24
3.9 Delineamento estatístico.....	24
3.10 Avaliação.....	24

4. Resultados e Discussão .....	25
5. Conclusões.....	42
6. Literatura citada.....	42
<b>CAPÍTULO 2: PROGRESSO DA FERRUGEM ALARANJADA NO TEMPO EM CINCO VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>47</b>
1. Resumo .....	47
2. Introdução.....	48
3. Materiais e Métodos .....	49
3.1 Hospedeiro.....	49
3.2 Patógeno.....	49
3.3 Viabilidade dos urediniósporos .....	49
3.4 Inoculação .....	49
3.5 Delineamento estatístico .....	49
3.6 Avaliação .....	50
4. Resultados e Discussão .....	50
5. Conclusões.....	57
6. Literatura Citada .....	57
7. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

	<b>Página</b>
Tabela 1. Identificação e detalhes dos isolados utilizados de <i>Puccinia melanocephala</i> e <i>Puccinia kuehnii</i> .....	19
Tabela 2. Temperaturas de hibridização ajustadas para amplificação dos DNAs de <i>Puccinia melanocephala</i> .....	22
Tabela 3. Primers transferidos de <i>Puccinia kuehnii</i> para <i>Puccinia melanocephala</i> com os parâmetros avaliados heterozigosidade (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e poder discriminatório (PD).....	26
Tabela 4. Padrão de virulência de <i>Puccinia kuehnii</i> no conjunto de variedades de cana-de-açúcar, medido pela porcentagem de área afetada e capacidade de esporulação.....	33
Tabela 5. Padrão de virulência de <i>Puccinia melanocephala</i> no conjunto de variedades de cana-de-açúcar, medido pela porcentagem de área afetada e capacidade de esporulação.....	37

### Capítulo 2

Tabela 1. Diferentes reações da variedade RB855156 à <i>Puccinia kuehnii</i> medida pela quantidade e viabilidade de urediniósporos.....	54
Tabela 2. Quantidade e viabilidade de urediniósporos em duas variedades de cana-de-açúcar com resistência diferenciada.....	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Esporos de <i>Puccinia kuehnii</i> .....	19
Figura 2. Esporos de <i>Puccinia melanocephala</i> .....	19
Figura 3. Produtos amplificados <i>Puccinia melanocephala</i> , após ajuste na temperatura de hibridização.....	25
Figura 4. Análise de agrupamento UPGMA de <i>Puccinia kuehnii</i> .....	28
Figura 5. Análise de coordenadas principais (PCoA) para <i>Puccinia kuehnii</i> .....	31
Figura 6. Análise de agrupamento UPGMA de <i>Puccinia melanocephala</i> .....	34
Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) para <i>Puccinia melanocephala</i> .....	36
Figura 8. Diferentes cultivares com valores de porcentagem de área lesionada iguais, mas diferentes reações.....	38
Figura 9. Variedade RB935744 inoculada com <i>Puccinia melanocephala</i> mostrando pústulas grandes e fechadas.....	39
Figura 10. Variedade RB92579 inoculada com <i>Puccinia melanocephala</i> mostrando pústula pequena e esporulante.....	39

### Capítulo 2

Figura 1. Progresso da ferrugem alaranjada no tempo com três isolados diferentes em cinco variedades de cana-de-açúcar.....	52
Figura 2. Visualização de pústula de reações diferentes causadas por <i>Puccinia kuehnii</i> na variedade RB855156.....	57

# FATORES QUE INFLUENCIAM NO SUCESSO E LONGEVIDADE DO CONTROLE DAS FERRUGENS DA CANA-DE-AÇÚCAR POR VARIEDADES RESISTENTES

**Autor:** TATIANE DE FÁTIMA MISTURA

**Orientador:** Prof. Dr. ALFREDO SEITI URASHIMA

**Co-orientador:** Prof. Dr. RENÉE S. ARIAS

## RESUMO

Açúcar, etanol e bionergia são produtos gerados a partir da cana-de-açúcar, cuja demanda atual permanece alta. Entretanto, duas ferrugens têm ameaçado a produtividade, ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) e ferrugem alaranjada (*P. kuehnii*). O mais eficiente método de controle dessas doenças é variedades resistentes. O sucesso e longevidade das variedades dependem de vários fatores, podendo ser os dois principais: a diversidade do patógeno e a correta avaliação da reação dos genótipos. Portanto, o capítulo 1 desta dissertação objetivou examinar a diversidade genética e fenotípica dos patógenos das ferrugens e a existência de correlação direta entre essas características. 31 isolados de *P. melanocephala* e 39 de *P. kuehnii* foram genotipados por 10 SSR (Simple Sequence Repeat). A diversidade genética foi verificada através grupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Methods Using Arithmetic Averages) e análise de PCoA (Principal Coordinate Analyses). A diversidade fenotípica foi investigada pela porcentagem de área afetada e reações incompatíveis/compatíveis entre o patógeno e o hospedeiro. Os resultados deste trabalho mostraram similar agrupamento entre UPGMA e PCoA com identificação de nove subpopulações genéticas para *P. kuehnii* e 10 subpopulações para *P. melanocephala*. Para a diversidade fenotípica, três raças foram detectadas em *P. kuehnii*, enquanto em *P. melanocephala* duas. Correlação direta entre diversidade genética e fenotípica foi encontrada somente em *P. kuehnii*. O capítulo 2 examinou a reação de algumas variedades comerciais de cana-de-açúcar à *P. kuehnii* em diferentes períodos de tempo, assim como viabilidade e quantidade de urediniósporos. Para o progresso da doença, três isolados foram inoculados, em cinco variedades e sua reação avaliada aos 21, 28, 35 e 42 dias depois pela escala de notas. Reação da doença medida pela quantidade e viabilidade de urediniósporos foi examinada em dois diferentes ensaios. No primeiro, esporos de diferentes tipos de lesão foi investigado 42 dias depois da inoculação, no segundo, esporos do mesmo tipo de reação, mas de uma variedade suscetível e a outra resistente foram observadas. Nosso dado verificou que uma variedade pode mudar de reação de resistente para suscetível ao longo do tempo. Portanto, a fim de evitar falsos resistentes outras características do material devem ser levadas em conta, quantidade e viabilidade de urediniósporos.

**Palavras-chave:** *Puccinia kuehnii*, *Puccinia melanocephala*, UPGMA, PCoA, resistência

## FACTORS AFFECTING SUCCESS AND LONGEVITY OF RESISTANT VARIETIES TO CONTROL SUGARCANE RUSTS

Author: TATIANE DE FÁTIMA MISTURA

Adviser: Prof. Dr. ALFREDO SEIITI URASHIMA

Co-adviser: Prof. Dr. RENÉE S. ARIAS

### ABSTRACT

Sugar, ethanol and bionergy are products generated from sugarcane, whose current demand remains high. However, two rust diseases have threatened its yield, brown rust (*Puccinia melanocephala*) and orange rust (*P. kuehni*). The most efficient method to control these diseases is resistant varieties. The success and longevity of varieties depends basically on two factors: pathogen diversity and correct evaluation of genotype reaction. Therefore, chapter 1 of this dissertation aimed to examine phenotypic and genotypic diversity of rusts pathogens and existence of a direct correlation between these traits. Genotyping of *P. melanocephala* employed 31 isolates and 39 for *P. kuehni* with 10 SSR markers. The genetic diversity was verified through UPGMA clustering and PCoA analyses. The phenotypic diversity was investigated by leaf lesion area and compatible/incompatible interaction between host and pathogen. Data of this work showed similar grouping between UPGMA and PCoA with identification of nine genetic subpopulations for *P. kuehni* and 10 subpopulations for *P. melanocephala*. As for phenotypic diversity, three races were identified in *P. kuehni* whereas two were detected in *P. melanocephala*. Direct correlation between genetic and phenotypic diversity was only observed in *P. kuehni*. The chapter 2 examined reaction of five sugarcane commercial varieties to *P. kuehni* over different period of time as well as quantity and viability of urediniospores. For disease progress disease, three isolates were inoculated on five varieties and their reactions evaluated 21, 28, 35, 42 days after by disease score. Disease reaction measured by quantity and viability of urediniospores was examined in two different trials. In the first, spores from different type of lesions were investigated 42 days after inoculation, in the second, spores from the same type of reaction but from a susceptible and resistance varieties were observed. Our data identified one variety which reaction changed over time. Therefore, in order to avoid false resistant materials other traits should be taking into account, quantity and viability of urediniospores.

**Keywords:** *Puccinia kuehni*, *Puccinia melanocephala*, UPGMA, PCoA, resistance

## INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar. Essa posição só é alcançada porque temos uma grande área cultivada, 8.654,2 mil hectares, que produziu na safra 2015/2016, 665,6 milhões de toneladas de cana (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016). A partir dessa matéria prima é produzido açúcar, etanol e recentemente bioeletricidade.

O açúcar é uma “commodity” de grande importância econômica para o Brasil. A previsão de exportação para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas, sendo que metade do produto consumido no mundo é proveniente do Brasil (BRASIL, 2016).

O etanol e a bioeletricidade são de importância sustentável e ambiental. O etanol é renovável e emite menos gases de efeito estufa que o produzido a partir do milho (CRAGO et al., 2010). A partir do bagaço, um resíduo que seria descartado pelas usinas, é possível produzir bioeletricidade. O período de estiagem na região Sudeste vai do final do verão até o final da primavera, onde o medo de apagão é evidente devido aos níveis baixos dos reservatórios de água. Exatamente nesse período ocorre a safra da cana quando poderia produzir energia.

Pelos exemplos citados a demanda de cana-de-açúcar é grande, mas somente se torna viável se aumentar a produtividade, para evitar a destruição de matas ou invadir áreas de outras culturas. No entanto, vários fatores podem comprometer o aumento da produtividade dentre eles as doenças, sendo as principais a ferrugem marrom e alaranjada.

A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, reduz o crescimento e o rendimento da cana-de-açúcar, através da diminuição da condutância estomática, da transpiração e principalmente da taxa fotossintética (ZHAO et al., 2011). No Brasil a ferrugem alaranjada chegou em 2009 e as variedades suscetíveis foram SP89-1115, RB72454 e SP84-2025 (BARBASSO et al., 2010) todas essas variedades ocupavam 10% da área plantada (PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2012). Na Austrália em meados do ano 2000 a variedade Q124, considerada altamente suscetível, sofreu diminuição de 38% na sua produtividade (MAGAREY et al., 2004). Em outras regiões como na Flórida, as reduções foram de 12% na quantidade de colmos, 32%

na massa vegetativa, 43% na tonelada de cana por hectare e 53% no açúcar (RAID et al., 2011).

No Brasil a ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) entrou em 1986 (TOKESHI; RAGO, 2005). Um estudo verificou diminuição média de 10t/ha a produtividade das variedades SP71-799 e SP70-1284 em plantas sem controle químico (SILVA et al., 2001). No estado da Flórida a redução atingiu 32,6% na altura do colmo e queda de 40,9% na massa fresca (COMSTOCK, 1992); no estado da Louisiana a diminuição na produção ficou entre 14 a 16% e de 22% no rendimento de açúcar por área (HOY; HOLLIER, 2009).

O potencial de dano das duas ferrugens citadas é evidente, sendo o melhor e mais eficiente método de controle da doença, o uso de variedades resistentes. O sucesso e longevidade do controle dependem de vários fatores, onde se destacam a diversidade do patógeno e a avaliação correta da reação das variedades. Portanto, este trabalho tem como objetivo investigar fatores que influenciam no sucesso e longevidade do controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades resistentes. Medindo a diversidade genética pelo método UPGMA e PCoA, a diversidade fenotípica pela presença de raças fisiológicas, e avaliando da reação de cinco variedades de cana-de-açúcar aos 21, 28, 35, 42 dias após a inoculação.

## OBJETIVO

O objetivo geral desse trabalho foi investigar fatores que influenciam no sucesso e longevidade do controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades resistentes. Os objetivos específicos da dissertação foram:

### Capítulo 1

- I. Examinar diversidade genética e fenotípica de *P. kuehnii* e *P. melanocephala*
- II. Examinar se existe correlação direta entre a diversidade genotípica e fenotípica de *P. melanocephala* e *P. kuehnii* no Brasil.

### Capítulo 2

- I. Examinar a reação de algumas variedades comerciais de cana-de-açúcar à *P. kuehnii* aos 21, 28, 35 e 42 dias após a inoculação, assim como viabilidade e quantidade de urediniosporos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Importância da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e dos produtos açúcar e etanol (BRASIL, 2016). Esse lugar só é alcançado porque temos uma área cultivada de 8.654,2 mil hectares, que produziu na safra 2015/2016, 655,6 milhões de toneladas de cana (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

Assim, essa cultura é de extrema importância econômica e social para o país, pois somente ela contribuiu com U\$ 43,4 bilhões do produto interno bruto (PIB) do agronegócio e gerou um milhão de empregos diretos (SETOR..., 2014). Além disso, a cana-de-açúcar atualmente ganha um lugar de destaque em questões ambientais e de sustentabilidade, pois tem a capacidade de gerar etanol, um combustível que quando comparado com a gasolina reduz a emissão de dióxido de carbono na atmosfera em até 90% (ETANOL..., 2015). A partir de 2003, com o advento dos carros flex-fuel utilizando etanol, o Brasil conseguiu reduzir 300 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub> na atmosfera (ETANOL..., 2015). Outra vantagem do etanol é que ele é renovável, o que o torna mais atrativo que a gasolina, pois essa é proveniente de petróleo, um combustível fóssil (GOLDEMBERG et al., 2008).

Outro aspecto que a cana-de-açúcar tem importância é na questão da estiagem, na região Sudeste, que vai do final do verão até o final da primavera, onde o medo de racionamento de energia devido aos níveis baixos dos reservatórios de água é evidente. Exatamente nesse período também ocorre a safra da cana-de-açúcar, ou seja, as usinas poderiam utilizar a queima do bagaço para produzir energia. Se as 350 usinas utilizassem a queima do bagaço para produzir energia, seria possível gerar 15.300 megawatts, mais energia do que a usina de Itaipu (ENERGIA..., 2015).

Esses exemplos mostram a importância da cana-de-açúcar para o agronegócio brasileiro, devido à versatilidade do seu produto da “commodity” do açúcar, a utilização de etanol como um combustível renovável e mais limpo que a gasolina e o potencial de gerar bioenergia a partir da queima do bagaço com custo zero às usinas, pois este é um resíduo do processo.

Por todas essas razões, a cana-de-açúcar continuará valorizada devido à utilização da sua matéria prima para diversos produtos, porém a demanda será grande e o uso dessa biomassa só será viável se aumentar a produtividade. No entanto, vários fatores podem comprometer a produtividade, dentre eles as doenças, sendo as principais as ferrugens, marrom e alaranjada.

## 2. Ferrugens

A ferrugem marrom é causada pelo fungo *P. melanocephala* e a alaranjada por *P. kuehni*. Ambas causam lesões na superfície inferior das folhas de cana. No início da infecção as duas ocasionam pequenas pontuações amarelas alongadas que aumentam de tamanhos. Depois essas lesões evoluem para pústulas e quando atingem a maturidade rompem a epiderme do tecido do hospedeiro, expondo uma massa de urediniósporos, os sinais (MAGAREY, 2000). Algumas diferenças podem ser observadas entre os sintomas das duas ferrugens como: as lesões da ferrugem alaranjada são levemente mais arredondadas; as pústulas são laranja não vermelho-marrom; as pústulas da ferrugem alaranjada são distribuídas desigualmente no limbo foliar, formando aglomerados de lesões, enquanto que a ferrugem marrom é espalhada uniformemente sobre a folha; os sintomas da ferrugem alaranjada ocorrem mais no final no verão e começo do outono, já os da marrom na primavera e começo do verão (MAGAREY et al., 2001). Assim as ferrugens diminuem drasticamente a área fotossintética e conseqüentemente, a produtividade (ZHAO, 2011).

Os primeiros relatos da ferrugem marrom ocorreram no continente Asiático e Africano, e não acarretaram danos significativos as lavouras infectadas. Somente em 1978, quando observada na República Dominicana é que a epidemia se alastrou e houve danos foram expressivos na redução do açúcar, e de 1,5 a 21,7 toneladas de cana por hectare (PURDY et al., 1983).

No Brasil a ferrugem marrom chegou em 1986 causando grandes danos para os programas de melhoramento genético, pois clones e variedades promissoras tiveram que ser descartadas devido à suscetibilidade à doença (TOKESHI; RAGO, 2005). Um estudo realizado no Brasil verificou o potencial de dano da ferrugem marrom nas variedades SP71-799 e SP70-1284 diminuindo em média 10 t/ha da produtividade, em plantas não pulverizadas com fungicidas (SILVA et al., 2001).



Essa doença ocorre em todos os países produtores de cana (PURDY et al., 1983) e vários estudos mostraram sua capacidade de dano. Um trabalho realizado na Flórida, com uma cultivar suscetível à ferrugem marrom, indicou redução de 32,6% na altura do colmo e queda de 40,9% na massa fresca (COMSTOCK, 1992); na Louisiana a redução na produção de cana foi de 14 – 16% e de 22% no rendimento de açúcar por área (HOY; HOLLIER, 2009).

Já a ferrugem alaranjada foi relatada pela primeira vez causando danos econômico à cana-de-açúcar em 2000 na Austrália (MAGAREY et al., 2001). Em 2009 ela foi reportada pela primeira vez no Brasil, na cidade de Araraquara, interior do estado de São Paulo. As variedades SP89-1115, RB72454 e SP84-2025 foram identificadas como suscetíveis e a recomendação foi a interrupção do plantio (BARBASSO et al., 2010). Essas cultivares ocupava aproximadamente 10% da área plantada (PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR - PMGCA, 2012), portanto a substituição das variedades tornou-se uma tarefa difícil em curto prazo, principalmente se estavam nos primeiros cortes, por isso as cultivares continuaram no campo.

O temor à ferrugem alaranjada pode ser visto pela redução de produtividade que ela causou. Na Austrália em meados do ano 2000 a variedade Q124, considerada altamente suscetível, sofreu diminuição de 38% na sua produtividade (MAGAREY et al., 2004). Em outras regiões como na Flórida, as reduções foram de 12% na quantidade de colmos, 32% na massa vegetativa, 43% na tonelada de cana por hectare e 53% no açúcar (RAID et al., 2011). Embora as duas ferrugens tenham um potencial de dano evidente, alguns métodos podem ser empregados para controlá-las.

### 3. Controle

Os dois métodos que podem ser empregados para o controle das ferrugens, marrom e alaranjada são: controle químico a base de fungicidas e o uso de variedades resistentes.

O controle químico é usado em casos emergenciais, por exemplo, quando a resistência das variedades é quebrada. Como ocorreu na Flórida com as variedades CP 70-1133, CP 72-1210 e CP 78-1247, que após alguns anos de sua liberação apresentaram alta infecção de ferrugem marrom (COMSTOCK et al., 2010). No Brasil com a cultivar SP81-3250 que não constava como suscetível a ferrugem

alaranjada nos primeiros trabalhos de identificação de variedades a serem descontinuadas (BARBASSO, 2010), mas em 2012 sofreu um surto epidêmico quando era a segunda cultivar mais importante do Brasil, com área nova plantada de 110.078 ha (11,23%) e área cultivada de 823.776 ha (12,86%) (PROGRAMA DE MELHORAMENTO DE GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR - PMGCA, 2013), razões pelas quais fungicidas foram liberados em tempo recorde (Syngenta, 2010). Atualmente há seis produtos a base de triazol e estrobirulina registrados para o controle da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar (AGROFIT, 2015).

No entanto, o melhor e mais empregado método para o controle das duas ferrugens é a substituição de variedades suscetíveis por resistentes (TOKESHI; RAGO, 2005), pois reduz o impacto ambiental, seu custo é relativamente baixo e restringe o uso de defensivos agrícolas. Na Austrália, quando a variedade Q 124 e outras suscetíveis foram substituídas por cultivares resistentes, a ferrugem alaranjada voltou a ser uma doença de importância menor (MAGAREY et al., 2001). Mas o sucesso e longevidade da resistência das variedades dependem de vários fatores, onde se destacam a avaliação correta da reação das variedades e diversidade do patógeno.

### 3.1 Avaliação da reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem

#### 3.1.1 Campo e casa de vegetação

A reação de variedades de cana-de-açúcar pode ser testada em campo (KLOSOWSKI et al., 2015; ARAÚJO et al., 2013) ou/e em casa de vegetação (BOMBECINI et al., 2012; CHAPOLA, 2013; HOY et al., 2014). Em campo ocorrem infecções naturais do patógeno, grandes quantidades de genótipos podem ser avaliadas, mas não há controle das condições ambientais enquanto que nos ensaios em casa de vegetação a vantagem é o controle do patógeno e do ambiente (SOOD et al., 2009), entretanto por ter espaço reduzido, há limitação no número de materiais que podem ser testados. Devido às vantagens e desvantagens mencionadas nos dois tipos de avaliações, uma das maneiras de solucionar o problema é fazer a avaliação em grande escala no campo, depois testar somente os clones promissores em casa de vegetação. Atualmente os dois métodos adotados para testar a resistência das variedades são as escalas diagramáticas.

### 3.1.2 Escalas diagramáticas

A reação das variedades de cana-de-açúcar tem sido avaliada através de quatro escalas diagramáticas. A primeira foi proposta por Tai et al., (1981) em que a severidade da doença foi dividida em 9 notas considerando a quantidade e abertura de pústulas. As notas de 0 a 2 são classificadas como resistente, enquanto notas de 3 a 9 suscetíveis. A segunda escala foi elaborada por Amorim et al., (1987) para a ferrugem marrom e também é composta por 9 notas, no entanto o autor inseriu porcentagem de área afetada. A terceira escala foi criada com a necessidade de demonstrar uma maior exatidão para a avaliação da ferrugem alaranjada, já que os sintomas entre as duas ferrugens são diferentes o que poderia comprometer a avaliação. Recentemente Klosowski e colaboradores (2013) elaboraram e validaram uma escala diagramática para a ferrugem alaranjada, colocando outros valores para a porcentagem de área afetada. Posteriormente compararam sua eficiência com a escala da ferrugem marrom. O  $R^2$  obtido foi de 0,91 e ausência de erros. A quarta escala sugerida por Sood et al. (2009) foi proposta para avaliar a resistência das canas à *P. melanocephala* e *P. kuehni*, utilizando uma técnica de inoculação do patógeno nos cartuchos foliares das plantas. Nesta escala os autores consideraram a quantidade de pústulas esporulantes. No entanto nenhuma das escalas propostas leva em consideração a quantidade e viabilidade de esporos. Já que a doença é de ciclo secundário assim a qualidade dos esporos influencia na direta capacidade da doença em causar epidemias. Além disso, outro fator que garante a longevidade da resistência das variedades é a diversidade do patógeno.

### 3.2 Diversidade do patógeno

A longevidade da resistência das variedades está associada com a diversidade do patógeno. Estudos demonstraram que a resistência à ferrugem marrom é governada por dois genes de efeito maior, *Bru1* e *Bru2*. No primeiro estudo utilizando 141 progênies da cultivar R570, foi encontrada uma segregação 3:1 (resistente: suscetível), que é típico da presença de monogene, embora muitos genes menores com efeito quantitativo também tenham sido observados (DAUGROIS et al., 1996). A presença desse gene de efeito maior, denominado *Bru1*, foi posteriormente confirmada empregando-se 658 clones adicionais derivados da mesma progênie (R570) (ASNAGHI et al., 2004).

No segundo estudo, a existência do outro gene de resistência (*Bru2*) à ferrugem marrom foi comprovada através do cruzamento entre as cultivares R570 (reconhecida com o gene *Bru1*) e MQ76-53, ambas resistentes à ferrugem marrom, que deram origem a 166 progênies. Nessas progênies foram passados dois marcadores AFLP oriundos do *Bru1*. Das progênies, 90 não apresentaram o gene de resistência *Bru1*, confirmando a hipótese que havia mais um gene de resistência (RABOIN et al., 2006). Essa hipótese foi confirmada pelo cruzamento de 133 progênies das variedades B63-758 (suscetível) e MQ76-53 (resistente) que resultou na segregação de 1:1 (RABOIN et al., 2006).

Presença de resistência de gene de efeito maior e vários outros de efeito menor também foi sugerido para a ferrugem alaranjada em um estudo realizado no Colorado (PR) para examinar herança da resistência em genótipos brasileiros de cana-de-açúcar (KLOSOWSKI, 2013).

Portanto, para o sucesso do programa de melhoramento genético das cultivares de cana-de-açúcar, informações somente da virulência e incidência do patógeno não são suficientes. Esses dados precisam ser somados ao conhecimento sobre variabilidade genética e estrutura populacional do patógeno (POCOVI et al., 2010). Uma das maneiras de se estudar a diversidade genética de fungos fitopatogênicos é através de marcadores moleculares.

### 3.2.1 Marcadores moleculares – microssatélites

Os marcadores moleculares microssatélites ou simple sequence repeat (SSR) vem sendo muito empregados em estudos de diversidade genética de fungos fitopatogênicos, pois permitem uma análise mais detalhada a nível genético e por não sofrer influência do ambiente que os marcadores fenotípicos estão sujeitos.

Os SSR são sequências 1 a 8 bp. repetidas em tandem no DNA. São comum e amplamente distribuídos em organismos eucarióticos (RICHARD et al., 2008). Esse marcador apresenta muitas vantagens sobre os outros marcadores como, por exemplo, alta especificidade, não tem problemas com contaminação cruzada, a contaminação por microrganismos não alvos é rara (SWEET et al., 2012), apresenta alto nível de polimorfismo, fácil de ser analisado, portanto permite a obtenção de dados de maneira fácil e rápida (TARAMINO et al., 1996).

Esse marcador vem sendo amplamente utilizado em estudos para verificar a estrutura populacional, variações genéticas dentro e entre populações e analisar a

dinâmica populacional (MILGROOM; PEEVER, 2003). Um estudo empregando esse marcador em isolados de *P. melanocephala* detectou baixa variabilidade genética, onde a média da distância genética encontrada entre os isolados foi de somente 0.12 (PEIXOTO-JUNIOR, et al., 2014). Outro marcador utilizado em *P. melanocephala* foi o amplified fragment length polymorphism (AFLP) que encontrou alta porcentagem de loci polimórficos e 95% de variabilidade genética dentro das populações (POCOVI et al., 2010).

Em *P. kuehnii* foram comparadas regiões do espaço intergênico, uma porção da subunidade grande e espaço interno transcrito, e foram encontradas variações dentro dessas regiões, ou seja, também foi encontrada diversidade (BRAITHWAITE et al., 2009).

Em termos práticos, uma das informações mais importantes que os marcadores microssatélites podem dar é se a maior diversidade genética encontrada por ele vai refletir numa virulência mais ampla do patógeno, ou seja, atacar mais variedades. Este tipo de estudo ainda não foi abordado em Puccinias da cana-de-açúcar, no entanto esse assunto já foi investigado em outros patossistemas.

### 3.2.2 Correlação direta entre diversidade genética e fenótipos virulentos

Trabalhos que encontraram correlação direta entre a diversidade genética e fenotípica foram relatados com a ferrugem do trigo causada por *Puccinia triticina*. Na África do Sul isolados que apresentaram 70% de diversidade genética foram de uma nova raça (TEREFE et al., 2014). Na Ásia Central e no Cáucaso houve correspondência direta entre os genótipos SSR e fenótipos virulentos em nível de população e entre isolados individuais (KOLMER; ORDOÑEZ, 2007). Na Europa foram verificados 8 grupos genotípicos e 8 fenotípicos, assim havendo significativa associação entre o genotípico e o fenotípico (KOLMER et al., 2012). Na França duas populações de isolados foram separadas de acordo com os genótipos e os patótipos (GOYEAU et al., 2007). No Canadá um estudo empregando isolados de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* foi encontrado uma relação entre a virulência e o polimorfismo molecular (KOLMER et al., 1994).

Na prática a importância de encontrar correlação direta entre a diversidade genotípica e fenotípica implica na redução do número de isolados para realizar os ensaios fenotípicos, ou seja, testar a resistência das cultivares, pois seria escolhido um isolado representante de cada linhagem genotípica para os ensaios fenotípicos.

Além disso, se uma nova raça fosse introduzida poderia rapidamente ser detectada através de seu genótipo. Assim se a cultivar antes de ser liberada for testada contra toda a diversidade do patógeno a durabilidade da resistência da variedade será maior. Por outro lado, as desvantagens de utilizar somente ensaios fenotípicos são: idade e condições do hospedeiro, qualidade do inóculo, influências do meio ambiente e o mais difícil é encontrar um conjunto de variedades que consiga distinguir todas as raças presentes (LEVY et al., 1993).

## LITERATURA CITADA

AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. 2015. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 22 ago. 2015.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C.O.N.; MORAES, V.A.; FERNANDES, C.R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v.39, p.13-16, 1987.

ARAÚJO, K.L.; CANTERI, M.G.; GILIO, T.A.S.; NEUBAUER, R.A.; SANCHES, P.B.; SUMIDA, C.H.; GIGLIOTI, E.A. Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para a ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.4, p.217-275, 2013.

ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J.Y.; TÉLISMART, H.; GIRAD, J.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and RFLP markers. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v.108, n.4, p.759-764, 2004.

BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSANI, J. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.94, n.9, p.1170, 2010.

BOMBECINI, J.; GONÇALVES, C.R.N.; ASCENCIO, I.; URASHIMA, A.S. Resistance of sugarcane varieties to *Puccinia kuehnii* in Brazil. In: APS ANNUAL MEETING, 2012, Providence, Rhode Island. **Abstracts...** Disponível em: <[http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012\\_Meeting\\_Abstracts/aps12abP425.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012_Meeting_Abstracts/aps12abP425.htm)>. Acesso: 13 abr.2016.

BRAITHWAITE, K.S.; CROFT, B.J.; MAGAREY, R.C.; SCHARASCHKIN, T. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v.38, p.380-388, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-Açúcar**. 2016 Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso: 02 maio 2016.

CHAPOLA, R.G. **Reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada (*Puccinia Kuehnii*)**. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N.C.; DAVIDSON, R.W. Sugarcane rusts in Florida. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 27, 2010, Veracruz. **Proceedings...**Veracruz: ISSCT, 2010. v.27. p.1-8.

COMSTOCK, J.C.; SHINE, R.M.J.; RAID, R.N. Effect of rust on sugarcane growth and biomass. **Plant Disease**, Saint Paul, v.76, n.2, p.175-177, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2015/2016, quarto levantamento, abril 2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_14\\_09\\_06\\_31\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_4o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 30 maio 2016.

CRAGO, C.L.; KHANA, M.; BARTON, J.; GIULIANI, E.; AMARAL, W. Competitiveness of Brazilian sugarcane ethanol compared to US corn ethanol. **Energy Policy**, England, v.38, n.11, p.7404-7415, 2010.

DAUGROIS, J.H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J.C.; D’HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar “R570”. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v. 92, p.1059-1064, 1996.

ENERGIA produzida a partir do bagaço da cana-de-açúcar pode compensar falta de água dos reservatórios. Site Biomassa e Bionergia. 2015. Disponível em: <[http://www.biomassabioenergia.com.br/noticia/energia-produzida-a-partir-do-bagaco-da-cana-de-acucar-pode-compensar-falta-de-agua-dos-reservatorios/20140904173529\\_g\\_391](http://www.biomassabioenergia.com.br/noticia/energia-produzida-a-partir-do-bagaco-da-cana-de-acucar-pode-compensar-falta-de-agua-dos-reservatorios/20140904173529_g_391)>. Acesso em: 19 ago. 2015.

ETANOL. 2015. Disponível em: <<http://sugarcane.org/sugarcane-products/ethanol>>. Acesso em: 03 set. 2015.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, Surrey, v.36, n.6, p.2086-2097, 2008.

GOYEAU, H.; HALKETT, F.; MARIE-FRANÇOISE, Z. CARLIER, J.; LANNOU, C. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. **Fungal genetics and Biology**, Orlando, v.44, p.474-483, 2007.

HOY, J.W.; AVELLANEDA, M.C.; BOMBECINI, J. Variability in *Puccinia melanocephala* pathogenicity and resistance in sugarcane cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v.98, n.12, p.1728-1732, 2014.

HOY, J.W.; HOLLIER, C.A. Effect of brown rust on yield of sugarcane in Louisiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.11, p.1171-1174, 2009.

KLOSOWSKI, A.C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; RUARO, L.; FRAGOSO, R.B.; MAY DE MIO, L.L. Reação de cultivares e época de avaliação da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.31, n.2, p.489-498, 2015.

KLOSOWSKI, A.C.; BESPALHOK FILHO, J.C.; RUARO, L.; MAY DE MIO, L.L. Inheritance of resistance to orange rust (*Puccinia kuehni*) in sugarcane families from crosses between parents with different orange rust reactions. **Sugar Tech**, Lucknow, v.15, n.4, p.379-383, 2013.

KLOSOWSKI, A.C.; RUARO, L.; BESPALHOK FILHO, J.C.; MIO, L.L.M. Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.38, n.2, p.166-171, 2013.

KOLMER, J.A.; HANZALOVA, A.; GOYEAU, H.; BAYLES, R.; MORGOUNOV, A. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. **Plant Pathology**, London, v.62, n.1, p.1-11, 2012.

KOLMER, J.A.; ORDOÑEZ, M.E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. **Phytopathology**, Saint Paul v.97, n.9, p.1141-1149, 2007.



KOLMER, J.A.; LIU J.Q.; SIES, M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, n.3, p.276-285, 1994.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F.J.; ZEIGLER, R.S.; XU, S.; HAMER, J.E. Genetic Diversity of the Rice Blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.12, p.1427-1433, 1993.  
MAGAREY, R.C. Orange rust. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.SAUMTALLY, A.S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier:CIRAD; ISSCT, 2000 p.121-125.

MAGAREY, R.C.; NEILSEN, W.A.; BULL, J.I. The effect of Orange rust on sugarcane yield in breeding selection trials in Central Queensland: 1999-2001. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONFERENCE, 26, 2004, Brisbane. **Proceedings...** Mackay: ASSCT, 2004. v. 26.

MAGAREY, R.; WILLCOX, T.; CROFT, B.; CORDINGLEY, A. Orange rust, a major pathogen affecting crops of Q124 in Queensland in 2000. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONFERENCE, 24., 2001, Brisbane, **Proceedings...** Mackay: ASSCT, 2001. p.274-28.

MILGROOM, M.G.; PEEVER, T.L. Population biology of plant pathogens – The synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **Plant Disease**, Saint Paul, v.87, n.6, p.608-617, 2015.

PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR - PMGCA. **Censo varietal 2012**. Araras: CCA-UFSCar, 2013. 55 p.

PEIXOTO-JUNIOR, R.F.; CRESTE, S.; LANDELL, M.G.A.; NUNES, D.S.; SANGUINO, A.; CAMPOS, M.F.; VENCOVSKY, R.; TAMBARUSSI, E.V.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity among *Puccinia melanocephala* isolates from Brazil assessed using simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.13, n.3, p.7852-7863, 2014.

POCOVI, M.I.; RECH, G.E.; COLLAVINO, N.G.; CARUSO, G.B.; RIOS, R.; MARIOTTI, J.A. Molecular diversity of *Puccinia melanocephala* populations. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.158, n.11-12, p.769-775, 2010.

PURDY, L.H.; LIU, L.J.; DEAN, J.L. Sugarcane rust, a newly important disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, n.11, p.1292-1296, 1983.

RABOIN, L.M.; OLIVEIRA, K.M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J.Y. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v.112, n.7, p.1382-1391, 2006.

RAID, R.N.; COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N. Yield loss incited by orange rust (*Puccinia kuehni*) on a highly susceptible sugarcane cultivar in Florida. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 31, n. 1, p. 66-67, 2011.

RICHARD, G.F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, Washington, v.72, n.4, p.686-727, 2008.

SETOR sucroenergético brasileiro supera PIB de mais de 100 países. 2014. Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/etanol/marketing/sucroenergetico-supera-pib-100-paises-290514/>>. Acesso: 08 ago. 2015.

SILVA, M.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; ALMEIDA, A.M.; CAMPANA, M.P.; COELHO, A.; LANDELL, M.G.A.; FIGUEIREDO, P.; PERECIN, D. Danos causados pela ferrugem, *Puccinia melanocephala* a variedades de cana-de-açúcar com diferentes níveis de resistência. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, n.1, p.39-43, 2001.

SYNGENTA. **Syngenta obtém registro para controle da ferrugem alaranjada da cana**. 2010. Disponível em: <<http://www.syngenta.com/country/br/pt/imprensa/releases/Documents/223.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2016.

SOOD, S.G.; COMSTOCK J.C.; GLYNN, N.C. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.12, p.1335-1340, 2009.

SWEET, M.J.; SCRIVEN, L.A.; SINGLETON, I. Microsatellites for microbiologists. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.81, n., p.169-207, 2012.  
TAI, P.Y.P.; MILLER, J.D.; DEAN, J.L. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.261-268, 1981.

TARAMINO, G.; TINGEY, S.V. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Bethesda, v.39, n.2, p.277-287, 1996.

TEREFE, T.G.; VISSER, B.; HERSELMAN, L.; PRINS, R.; NEGUSSIE, T.; KOLMER, J.A.; PRETORIUS, Z.A. Diversity in *Puccinia triticina* detected on wheat from 2008 to 2010 and the impact of new races on South African wheat germplasm. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.139, n.1, p.95-105, 2014.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. cap.21. p.185-196.

ZHAO, D.; GLYNN, N.C.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J.C.; SOOD, S. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v.95, n.6, p.640-647, 2011.

## CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA DOS PATÓGENOS CAUSADORES DAS FERRUGENS EM CANA-DE-AÇÚCAR

### 1. Resumo

O mais eficiente método de controle das ferrugens é o uso de variedades resistentes e a longevidade da resistência das variedades depende da diversidade do patógeno, porque quanto maior a diversidade genética maior é a chance de ocorrer fenótipos virulentos. Se a correlação entre diversidade genética e virulência for positiva os ensaios fenotípicos nos programas de melhoramento genético poderiam ser drasticamente diminuídos, porque um isolado de cada linhagem genética poderia ser escolhido. Além disso, se uma nova raça fosse introduzida poderia rapidamente ser detectada através de seu genótipo e conseqüentemente, a durabilidade da resistência seria maior. Os objetivos desse trabalho foram: (i-) examinar a diversidade genética e fenotípica de *P. kuehnii* e *P. melanocephala*; (ii-) examinar se existe correlação direta entre diversidade genética e fenotípica dos patógenos causadores das ferrugens marrom e alaranjada. Para tanto uma coleção de 31 isolados de *P. melanocephala* e 39 de *P. kuehnii* foram empregadas para genotipagem por 10 marcadores microsatélites. A diversidade genética foi verificada através da análise de grupamento UPGMA e pelo PCoA. A diversidade fenotípica foi investigada pela porcentagem de área afetada e reações incompatíveis/compatíveis entre o patógeno e o hospedeiro. Os resultados do presente trabalho mostraram que o agrupamento das populações pelo UPGMA foram similar ao do PCoA tanto para *P.kuehnii* quanto para *P. melanocephala*. Três raças foram detectadas em *P. kuehnii*, enquanto em *P. melanocephala* duas. Correlação direta entre diversidade genética e virulência fenotípica foi encontrada somente em *P. kuehnii*.

**Palavras-chave:** *Puccinia melanocephala*, *Puccinia kuehnii*, Marcadores Microsatélites, Virulência

## 2. Introdução

O método de controle mais eficiente e empregado para controlar ferrugem é a substituição de variedades suscetíveis por resistentes (TOKESHI; RAGO, 2005) e a longevidade da resistência das variedades depende da diversidade do patógeno. Alguns estudos já demonstraram que a resistência à *P. melanocephala* é governada por dois genes de efeito maior (DAUGROIS et al., 1996; ASNAGHI et al., 2004; RABOIN et al., 2006). Portanto para um programa de melhoramento genético é fundamental conhecer a diversidade do patógeno, tanto genética quanto fenotípica, porque quanto maior a diversidade genotípica em uma população maior é a chance de ocorrerem genótipos virulentos (CUBERO SALMERON, 2003 apud POCOVI et al., 2010). Se houver correlação entre diversidade genética e fenótipos virulentos somente com base nos dados genotípicos o número de isolados para testar a resistência das variedades seria extremamente reduzido, pois seria escolhido somente um representante de cada linhagem genética e, além disso, se uma nova raça fosse introduzida poderia rapidamente ser detectada através de seu genótipo. Porque os ensaios fenotípicos têm alguns problemas como a idade e condições do hospedeiro, qualidade do inóculo, sofre influências do meio ambiente, sendo que o mais difícil é encontrar um conjunto de variedades que consiga distinguir todas as raças presentes (LEVY et al., 1993). A durabilidade da resistência da variedade poderia ser maior, se antes da cultivar ser liberada sua resistência fosse testada contra todas as raças do patógeno. Portanto os objetivos deste capítulo foram: (i) examinar a diversidade genética de *P. kuehnii* e *P. melanocephala*; (ii) examinar a diversidade fenotípica de *P. kuehnii* e *P. melanocephala*; (iii) examinar se existe a correlação direta entre a diversidade genotípica e fenotípica de *P. melanocephala* e *P. kuehnii* no Brasil.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Isolados de *P. melanocephala* e *P. kuehnii*

Folhas de cana-de-açúcar apresentando sintomas das ferrugens, marrom e alaranjada foram coletadas conforme descrito na Tabela 1 e armazenadas em freezer -20°C para posterior extração de DNA.

A diferenciação das duas ferrugens foi feita pela morfologia dos urediniósporos no microscópio ótico, pelo aumento de 400 vezes. *P. kuehnii*

apresentou urediniósporos alaranjados, elipsoidais, com espinhos a sua volta e a parede apical espessa (Figura 1) conforme descrito por Comstock et al., (2008). Já a ferrugem marrom apresentou urediniósporos marrons e sem espessamento da parede apical (Figura 2), conforme descrito por Purdy et al., (1983)

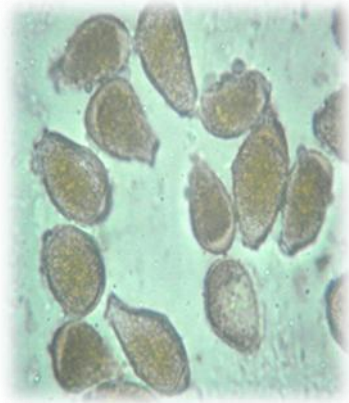


Figura 1. Esporos de *Puccinia kuehnii*

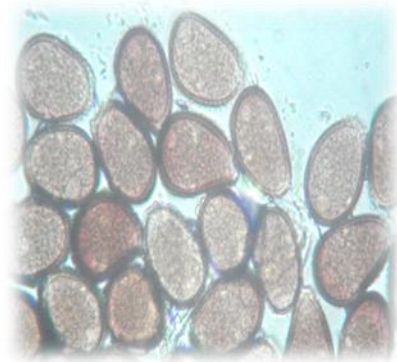


Figura 2. Esporos de *Puccinia melanocephala*

Tabela 1. Identificação e detalhes dos isolados utilizados de *Puccinia melanocephala* e *Puccinia kuehnii*

<b>Identificação do isolado</b>	<b>Variedade de cana-de-açúcar de origem</b>	<b>Ano da coleta</b>	<b>Local</b>
SCPM 01-01	RB835486	2014	Araras/SP
SCPM 02-01	Não informado	2014	Araras/SP
SCPM 01-03	RB925345	2014	Araras/SP
SCPM 01-04	RB833160	2014	Araras/SP
SCPM 01-05	RB83102	2014	Araras/SP
SCPM 01-06	RB865214	2014	Araras/SP
SCPM 01-07	RB815521	2014	Araras/SP
SCPM 01-08	CB3625	2014	Araras/SP
SCPM 01-09	CB45155	2014	Araras/SP
SCPM 01-10	SP70-1078	2014	Araras/SP
SCPM 01-11	SP79-2312	2014	Araras/SP
SCPM 01-12	SP79-2313	2014	Araras/SP
SCPM 01-13	SP70-1143	2014	Araras/SP
SCPM 01-14	SP71-799	2014	Araras/SP
SCPM 01-15	SP70-1423	2014	Araras/SP
SCPM 01-18	SP70-1284	2014	Araras/SP
SCPM 01-19	IAC51205	2014	Araras/SP
SCPM 01-20	CO270	2014	Araras/SP

SCPM 01-22	Q165	2014	Araras/SP
SCPM 01-23	F761762	2014	Araras/SP
SCPM 01-24	Cinca77316	2014	Araras/SP
SCPM 01-25	D625	2014	Araras/SP
SCPM 01-27	S277	2014	Araras/SP
SCPM 01-28	RB835486	2014	Araras/SP
SCPM 03-01	CTC04	2014	Leme/SP
SCPM 01-31	SP70-1078	2015	Araras/SP
SCPM 01-32	IAC51205	2015	Araras/SP
SCPM 01-33	SP70-1143	2015	Araras/SP
SCPK 01-13	RB72454	2014	Araras/SP
SCPK 01-14	SP89-1115	2014	Araras/SP
SCPK 01-15	RB855511	2014	Araras/SP
SCPK 01-16	RB855548	2014	Araras/SP
SCPK 01-17	RB845197	2014	Araras/SP
SCPK 01-18	RB995271	2014	Araras/SP
SCPK 01-19	RB995152	2014	Araras/SP
SCPK 01-20	404 (SP801816 x RB855206)	2014	Araras/SP
SCPK 02-03	SP81-3250	2014	Pradópolis/SP
SCPK 02-04	SP81-3250	2014	Pradópolis/SP
SCPK 07-01	SP81-3250	2014	Orindiuva/SP
SCPK 08-01	SP81-3250	2014	Sertãozinho/SP
SCPK 08-02	SP81-3250	2014	Sertãozinho/SP
SCPK 09-01	SP81-3250	2014	Descalvado/SP
SCPK 10-01	CTC20	2014	Descalvado/SP
SCPK 11-01	CTC15	2014	Descalvado/SP
SCPK 11-02	CTC15	2014	Descalvado/SP
SCPK 12-01	SP84-2025	2014	Descalvado/SP
SCPK 13-01	SP81-3250	2014	Descalvado/SP
SCPK 13-02	SP81-3250	2014	Descalvado/SP
SCPK 14-01	SP81-3250	2014	Descalvado/SP
SCPK 15-01	SP81-3250	2014	Macatuba/SP
SCPK 16-01	CTC15	2014	Leme/SP
SCPK 17-02	RB055508	2014	N.E./SP <sup>y</sup>
SCPK 17-03	RB055645	2014	N.E./SP
SCPK 18-01	SP81-3250	2014	Araras/SP
SCPK 01-27	SP86-155	2014	Araras/SP
SCPK 01-32	CO285	2014	Araras/SP
SCPK 01-33	MZ151	2014	Araras/SP
SCPK 01-29	CO285	2015	Araras/SP
SCPK 01-30	SP70-1005	2015	Araras/SP
SCPK 01-25	SP89-1115	2015	Araras/SP
SCPK 01-26	SP81-3250	2015	Araras/SP
SCPK 01-31	SP89-11115	2016	Araras/SP

---

<sup>y</sup> Nova Europa

### 3.2 Extração de DNA de *P. melanocephala* e *P. kuehnii*

Os DNAs totais foram extraídos de 31 isolados de *P. melanocephala* e de 39 de *P. kuehnii*, baseando-se no protocolo de Murray & Thompson (1980). Folhas de cana-de-açúcar, com pústulas de *P. melanocephala* e *P. kuehnii* foram picadas com lâminas de metal e colocadas em microtubos de 2 mL até atingir 1 mL. Após acondicionamento do material em tubo foi adicionado 1.400 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de tampão de extração, (0.7M NaCl, 1% CTAB, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA e 1% 2-mercaptoetanol) e as amostras foram levadas para o banho maria por 2 horas a 65°C. Após, esse período as amostras foram centrifugadas a 5939g x 5 minutos em temperatura ambiente. Retirou-se 800  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada amostra e transferiu-se para microtubo de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se volume igual de clorofórmio/etanol (24:1), e homogeneizou por 2 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 15203g x 5 minutos em temperatura ambiente. Retirou-se 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, e transferiu-se para microtubo de 1,5 mL, e adicionou-se 420  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após o período, as amostras foram colocadas no freezer por 1 hora. Depois as amostras foram centrifugadas a 15203g x 20 minutos a 4°C. Retirou-se a solução para visualização do pellet e adicionou-se 1 mL de álcool 70%. Posteriormente centrifugou-se a 15203g x 10 minutos a 4°C. A seguir o álcool foi retirado e o microtubo com DNA foi colocado em Speed Vacuum por 3 minutos para secar. Na etapa final o DNA foi dissolvido em 50  $\mu\text{L}$  de água destilada deionizada autoclavada e homogeneizado para uso posterior.

### 3.3 Amplificação por PCR

Os DNAs foram amplificados com um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , diluídos em água deionizada autoclavada, que consistiu 10 mM Tris-HCL pH 8.8, 50 mM KCL, 2.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 $\mu\text{M}$  de cada primer, 200 $\mu\text{M}$  dNTPs, 0.5 unidade de Taq DNA polimerase e 2  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. Para a amplificação utilizou-se o termociclador Bio-Rad C1000 programado para um pré-PCR: 95°C por 3 minutos, 95°C por 1 minuto, para desnaturação e 60°C por 1 minuto para hibridização dos primers e 26 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização dos primers a 60°C por 30 segundos, extensão a 68°C por 30 segundos, e 68°C por 4 minutos (TECHEN et al., 2010). Para a eletroforese foi utilizado todo o produto da PCR e adicionados 3  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento; estas amostras foram pipetadas em gel agarose 3%,



diluído em 0,5X TBE, em cuba de 35,5 x 20 x 9 cm, pente de 1,5 mm de espessura, em gel de 12 x 16 cm. A eletroforese teve duração de 3 horas a 100 V e 160 mA. Para a avaliação o gel foi corado em brometo de etídeo e visualizado em transluminador de luz ultravioleta. DNA ladder de 100bp (MBI Fermentas, Amherst, NY, USA) foi usado para estimar o tamanho do alelo. Os fragmentos amplificados foram de 100 a 200 bp. As seqüências dos primers não foram descritas nesse trabalho, porque elas não foram publicadas ainda.

### 3.4 Ajuste no PCR para *P. melanocephala*

Para que os primers de *P. kuehnii* pudessem ser empregados na análise genética de *P. melanocephala* foi necessário realizar um ajuste na temperatura de hibridização para cada um dos primers utilizados, pois com a temperatura original de 60°C, não foi possível amplificar os produtos. As temperaturas modificadas estão descritas na tabela 2. Após a modificação da temperatura de hibridização, o desempenho dos primers foi avaliado pela presença de fragmentos visualizados em forma de bandas e pelos parâmetros: conteúdo de informações polimórficas (PIC), poder discriminatório (PD) e heterozigosidade (He) (NAGY et al., 2012).

O PIC indica a qualidade do marcador, medindo o quanto os primers são informativos. O poder discriminatório mede a capacidade dos primers de diferenciar os indivíduos. A heterozigosidade é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no loco marcador na população (MCMANUS et al., 2011).

Para *P. kuehnii* não foi necessário fazer ajustes para a amplificação dos DNAs.

Tabela 2. Temperaturas de hibridização ajustadas para amplificação dos DNAs de *Puccinia melanocephala*

<b>Primers</b>	<b>Temperatura de hibridização °C</b>
RST 13, 16 e 20	52
RST 28 e 37	48,8
RST 108	51
RST 132 e 382	50
RST 221	57,4

### 3.5 Análise dos dados

A partir dos géis gerados pela amplificação dos SSR foi construída uma matriz binária atribuindo-se nota 0 para a ausência de bandas e 1 para a presença de bandas. Depois feita uma análise de grupamento UPGMA através do software NTSYSpc v.2.2 (Exeter Software, New York). O Nível de confiança do dendrograma foi medido pelo bootstrap com 1.000 repetições (FELSESTEIN, 1985; EFRON et al, 1996), usando o WINBOOT (YAP; NELSON, 1996). Para obter uma representação adicional das relações genéticas entre os isolados, e maior segurança nos dados apresentados pelo UPGMA foi realizado mais uma análise genética, o PCoA (principal coordinate analysis), a partir de uma matriz binária utilizando o programa GenAlex 6.501 (PEAKALL; SMOUSE 2006,2012).

### 3.6 Cultivares utilizadas para inoculação

As gemas individuais das cultivares de cana-de-açúcar RB835486, RB72454, RB935744, RB92579, RB867515 e RB825336 foram colocadas em copos plásticos de 250 mL com substrato, regadas, pulverizadas com uréia a 1% a cada 20 dias, para não amarelar e mantidas em casa de vegetação até emergirem de 3 a 4 folhas para serem inoculadas.

Para a inoculação da ferrugem marrom foi utilizado um conjunto com seis variedades (RB835486, RB72454, RB935744, RB92579, RB867515 e RB825336). Para a ferrugem alaranjada foi utilizado um conjunto com quatro variedades (RB935744, RB867515, RB92579, RB72454). As variedades foram escolhidas com base nos dados do trabalho Urashima et al., 2014, realizado anteriormente que verificou que não era necessário utilizar 8 variedades, porque as quatro eram as diferenciadoras de raças.

### 3.7 Preparação do inóculo e inoculação

De cada variedade (CO285, SP70-1005, SP89-1115 e SP81-3250) foi retirado um isolado de *P. kuehnii*, e das variedades (SP70-1078, IAC 51205 e SP70-1043) um isolado de *P. melanocephala* que foi composto de múltiplas pústulas. Os urediniósporos foram desalojados das pústulas em 25 mL de água destilada com auxílio de uma escova e contados em câmara de Neubauer.

As plantas do item 3.6 foram inoculadas após 30 a 40 dias da germinação com uma suspensão de  $10^5$  urediniósporos x mL<sup>-1</sup> total para cada ferrugem (SOOD et al., 2009) com spray manual. Depois mantidas em câmara úmida por 18 horas a 23°C dentro de sacos plásticos pretos para a abertura dos estômatos das plantas e conseqüentemente infecção dos urediniósporos.

### 3.8 Viabilidade dos urediniósporos

A viabilidade dos esporos foi verificada através do teste de germinação com 500 µL da suspensão de cada inóculo espalhada em meio de cultura ágar-água e deixados em temperatura ambiente por 24 horas. Depois a placa foi dividida em quatro campos, onde foram observados 25 esporos em microscópio ótico e através da média foi determinada a porcentagem de urediniósporos germinados. Os urediniósporos utilizados para a inoculação apresentaram de 60 a 70% de viabilidade.

### 3.9 Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições por variedade, sendo uma planta por repetição, totalizando 4 plantas. O ensaio foi realizado uma vez.

### 3.10 Avaliação

Para a análise da diversidade fenotípica, a folha mais afetada de cada repetição foi avaliada por dois parâmetros, após 21 dias da inoculação (Moreira, 2013). No primeiro parâmetro foi avaliada a capacidade dos isolados em esporular, reação compatível (+), ou não esporular reação incompatível (-). A partir da capacidade de esporulação de cada isolado foram comparadas as reações diferentes que os isolados produziram no conjunto de variedades de cana-de-açúcar, ou seja, raças fisiológicas. No segundo parâmetro foi avaliada a porcentagem de área afetada, pelo Assess 2.0 Image Analysis Software (American Phytopathological Society) que mede a porcentagem de área lesionada.

#### 4. Resultados e Discussão

##### Ajuste PCR e transferibilidade

Com as condições utilizadas para os primers de *P. kuehnii* não foi possível amplificar os DNAs de *P. melanocephala*, portanto foi necessário fazer ajustes na temperatura de hibridização para todos os primers, exceto RST 135, visando diminuir a especificidade. A temperatura alta não gera hibridização satisfatória do primer com o DNA, assim resultando em baixa quantidade do produto alvo do PCR. Quando a temperatura de hibridização de 60°C foi diminuída de 59 até 49°C houve a amplificação dos DNAs (Figura 3).

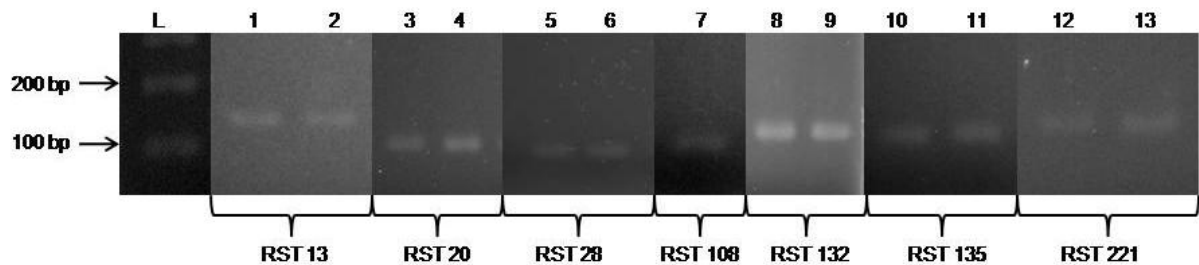


Figura 3. Produtos amplificados *Puccinia melanocephala*, após ajuste na temperatura de hibridização. L – marcador molecular 100bp, Fermentas; 1 a 13 isolados de *Puccinia melanocephala*

Dos 10 primers testados, sete tiveram transferibilidade para *P. melanocephala*, os outros três não amplificaram ou mostraram fragmentos de baixa qualidade, portanto não foram avaliados. Em todos os primers o número de alelos variou de 0 a 1 e todos foram polimórficos.

A transferibilidade dos primers de *P. kuehnii* para *P. melanocephala* permitiu a avaliação do desempenho dos primers por três parâmetros: conteúdo de informação polimórfica (PIC), poder discriminatório (PD) e Heterozigidade (He).

Dos três parâmetros, o PIC foi o que apresentou os valores mais baixos em relação aos outros dois, exceto para o primer RST 135. A média do PIC foi de 0,25 e variação de 0,15 a 0,36 (Tabela 3). Os primers RST 13 e 135 foram os menos eficientes com os valores de 0,15 e 0,16, pois esse valor deve ser próximo de 1, para ter maior capacidade de detectar polimorfismo. Os outros primers variaram de 0,20 a 0,36, mostrando que 80 e 64% dos indivíduos foram monomórficos.

No outro parâmetro de avaliação dos primers, PD, que mede a capacidade de diferenciar os indivíduos e quanto mais perto de 1, melhor, a média foi de 0,30, com variação de 0,06 (primer RST 135), a 0,50 (primer RST 132). Essa variação mostrou que o primer RST 135 foi menos eficiente, pois foi quase zero e o RST 132 mostrou um bom desempenho, porque conseguiu diferenciar a metade dos indivíduos. Os outros primers variaram de 23 a 47%, portanto esses primers não conseguiram diferenciar nem a metade da população.

No terceiro parâmetro de avaliação, He, os primers RST 13 e 135 mostraram 0,17, ou seja, He quase nula, indicando que praticamente todos os isolados foram homozigotos. Os primers RST 132 e 221 tiveram He de 0,48 e 0,45 respectivamente, portanto conseguiram diferenciar quase a metade dos indivíduos em heterozigotos. Os outros primers apresentaram He de 0,22 e 0,34 mostrando que a maioria dos indivíduos foram homozigotos.

As qualidades dos produtos da PCR amplificados após a diminuição da temperatura de hibridização não foram boas, e em nenhum dos parâmetros avaliadas os primers conseguiram valor maior que 0,5. De acordo com Botstein et al., 1980, valores próximos de 1,0 são os mais desejáveis, superiores a 0,5 são considerados muito informativos, entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos e abaixo de 0,25 pouco informativos, portanto nesse caso os primers foram mediamente informativos, exceto o RST 13 e o RST 135 que foram pouco informativos.

Na literatura existem 16 primers SSR desenvolvidos para *P. melanocephala* e somente quatro foram polimórficos, num estudo realizado no Brasil empregando 34 isolados (PEIXOTO-JUNIOR et al., 2014). É importante verificar se os primers desenvolvidos para *P. kuehnii* podem ser transferidos para *P. melanocephala*, pois existem algumas dificuldades para o desenvolvimento de marcadores microssatélites, como necessidade de ter conhecimento do genoma, alto custo e demanda de tempo (ZUCCHI et al., 2003). Além disso, há trabalhos mostrando que é possível a transferibilidade de primers SSR. Conforme ocorreu com 21 primers EST-SSR desenvolvidos para a ferrugem da folha do trigo (*P. triticina*) em que oito tiveram transferibilidade para *Puccinia coronata* e *Puccinia graminis* (WANG et al., 2010). Em outro trabalho dos trinta e dois pares de primers EST-SSR desenvolvimentos para *P. graminis* f. sp. *tritici* nove amplificaram *P. triticina*, nove

amplificaram 8 raças de *P. hordei*, e sete amplificaram o isolado de *P. coronata* f. sp. *hordei* (ZHONG et al., 2009).

Tabela 3. Primers transferidos de *Puccinia kuehnii* para *Puccinia melanocephala* com os parâmetros avaliados heterozigosidade (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e poder discriminatório (PD)

<b>Nome do primer</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>	<b>PD</b>
RST 13	0,17	0,15	0,18
RST 20	0,34	0,28	0,36
RST 28	0,22	0,20	0,23
RST 108	0,34	0,28	0,36
RST 132	0,48	0,36	0,50
RST 221	0,45	0,35	0,47
RST 135	0,17	0,16	0,06

#### Análise da diversidade genética de *P. kuehnii*

Os dados gerados pelos diferentes primers foram transformados em matriz binária e gerado um grupamento UPGMA (Figura 4) para melhor visualização da diversidade genética de *P. kuehnii*.

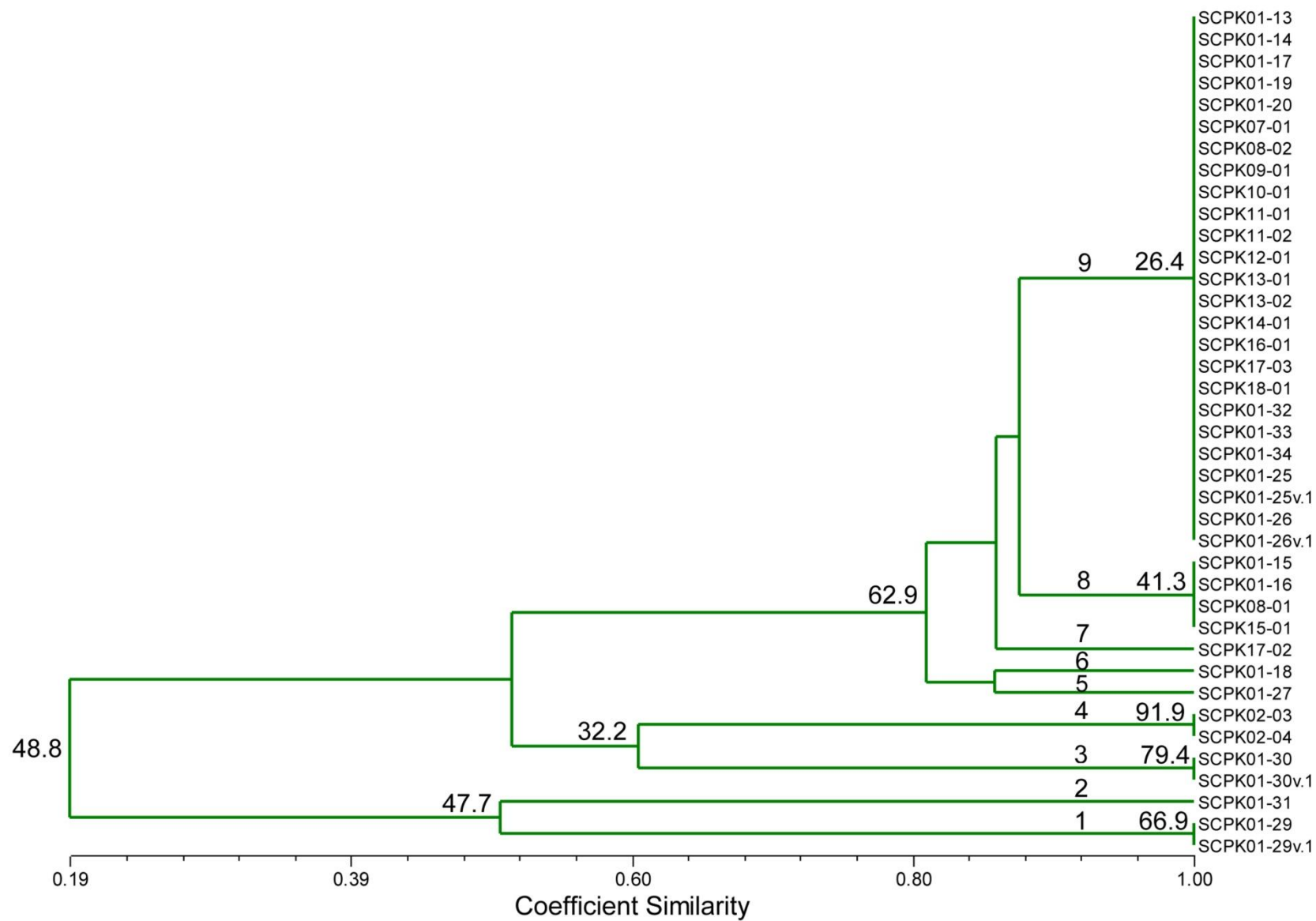


Figura 4. Análise de agrupamento UPGMA de *Puccinia kuehnii*

A análise do UPGMA de *P. kuehnii* mostrou duas populações com 19% de similaridade genética entre elas, portanto a diversidade genética das populações foi de 81%. A população, 1 foi composta por três isolados SCPK 01-29, SCPK 01-29v.1 e SCPK 01-31 da mesma localidade, mas de diferentes variedades e anos de coleta. Os isolados denominados como versão 1 (v.1), SCPK 01-25v.1, SCPK 01-26v.1, SCPK 01-29v.1 e SCPK 01-30v.1 foram reisolados dos sintomas da doença, após a inoculação. Através da análise de UPGMA foi verificado que os isolados, versão 1, apresentaram o mesmo perfil genético do isolado inoculado, ou seja, o isolado inoculado foi o mesmo que causou doença e, portanto, o experimento não foi contaminado. Esse cuidado foi tomado, porque esporos da ferrugem alaranjada são facilmente disseminados pelo vento e poderiam contaminar todo o ensaio.

Dentro da população 1 houve duas subpopulações com diversidade de 50% entre os isolados SCPK 01-29, SCPK 01-29v.1 e SCPK 01-31. Já a população 2 foi constituída por 36 isolados de diferentes cidades, cultivares e anos de coleta. Nessa população foi encontrada três subpopulações diversas. A primeira teve somente 1 isolado SCPK 01-30 que se diferenciou da segunda, com dois isolados, SCPK 02-03 e SCPK 02-04, com 40% e essas duas populações se distinguiram da terceira por 20%.

Variabilidade genética também foi encontrada em *P. kuehnii* num estudo que comparou intergenic spacer (IGS) de oito isolados da Austrália com uma coleção de indivíduos da Indonésia, Papua Nova Guiné e China onde foi encontrada maior diversidade de nucleotídeos entre os isolados da coleção do que da Austrália (BRAITHWAITE et al., 2009). Esse resultado já era esperado, porque os isolados da coleção são do centro de origem da cana-de-açúcar onde a diversidade do patógeno é maior. Na população 2 houve quatro grupos de clones genéticos que foram compostos por isolados de diferentes cultivares, cidades, e época de coletada.

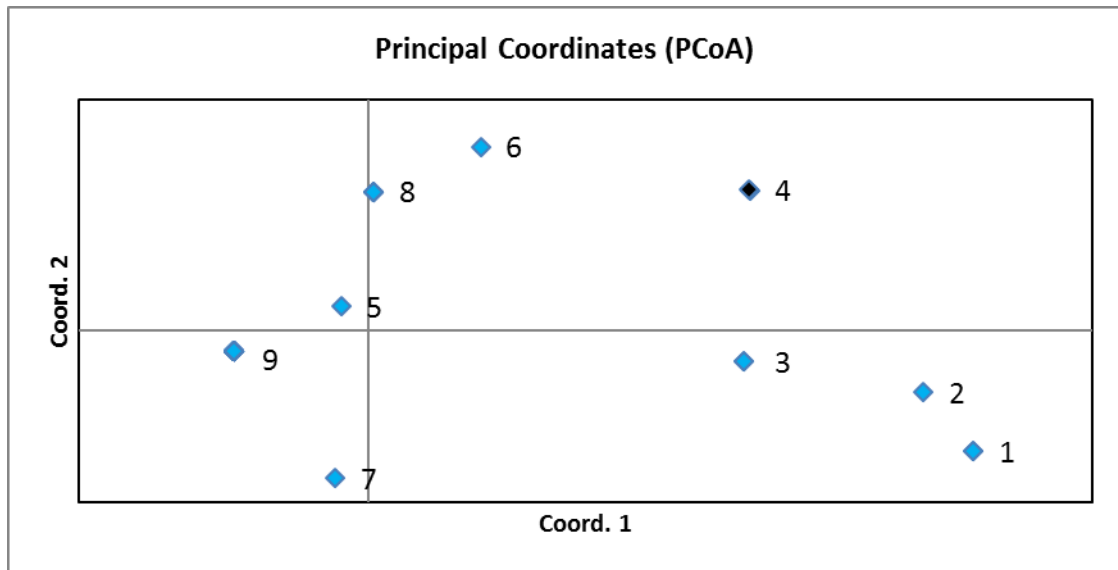
O interessante é a observação dos isolados com mesmo perfil genético de diferentes anos de coleta, porque esse fungo é biotrófico, ou seja, ele precisa do hospedeiro vivo para sobreviver. Um dos fatos que pode explicar essa observação é que há variedades de cana-de-açúcar com diferentes fases de maturação precoce, média e tardia, ou seja, temos plantas no campo o ano todo com folhas verdes proporcionando a perpetuação dos urediniosporos de um ano para outro.

A identificação de clones genéticos de cidades com 250 km de distância prova o quão é eficiente a disseminação de esporos de ferrugem pelo vento. Outro



fato que reforça a eficácia da disseminação foi a entrada da ferrugem alaranjada nas Américas em 2007, pela Flórida, depois para o México, Guatemala, El Salvador, Nicarágua, Panamá, Colômbia e no Brasil em 2009. Um trabalho que comprova que o isolado da Flórida foi disseminado para as Américas comparou as regiões ITS 1 e ITS 2 dos isolados encontrados na Flórida até o Brasil e verificou 100% de similaridade entre eles (MISTURA et al., 2015).

O PCoA (Figura 5) revelou um agrupamento de nove populações, a primeira foi constituída de dois isolados (SCPCK 01-29 e SCPCK 01-29v.1); a segunda de um (SCPCK 01-31); a terceira de dois (SCPCK 01-30 e SCPCK 01-30v.1); a quarta de dois (SCPCK 02-03 e SCPCK 02-04); a quinta de um (SCPCK 01-27); a sexta de um (SCPCK 01-18); a sétima de um (SCPCK 17-02); a oitava de três (SCPCK 01-15; SCPCK 01-16, SCPCK 08-01); a nona de 25 (SCPCK 01-13, SCPCK 01-14, SCPCK 01-17, SCPCK 01-19, SCPCK 01-20, SCPCK 01-25, SCPCK 01-25v.1, SCPCK 01-26, SCPCK 01-26v.1, SCPCK 01-32, SCPCK 01-33, SCPCK 01-34, SCPCK 07-01, SCPCK 08-02, SCPCK 09-01, SCPCK 10-01, SCPCK 11-01, SCPCK 11-02, SCPCK 12-01, SCPCK 13-01, SCPCK 13-02, SCPCK 14-01, SCPCK 16-01, SCPCK 17-03, SCPCK 18-01). As três coordenadas explicaram uma variação de 90,43%. A primeira e segunda coordenadas explicaram 80,74% (69,21% para a primeira e 11,53% para a segunda coordenada). As populações do PCoA (Figura 5) foram similares ao do UPGMA (Figura 4) que estão representadas pelos números arábicos. O total de variação genética, 90,43% indica o quanto à análise é confiável e que as 9 populações são verdadeiramente diferentes. Embora o bootstrap da análise de UPGMA tenha apresentado alguns valores baixos, o PCoA confirmou o mesmo número de populações constituídos dos mesmos isolados, assim dando segurança aos dados obtidos pelo UPGMA.



**Figura 5.** Análise de coordenadas principais (PCoA) para *Puccinia kuehnii*; 1 a 9 populações de *P. kuehnii*

#### Análise fenotípica da ferrugem alaranjada

A porcentagem de área afetada para *P. kuehnii* variou de 0,00 a 8,15% (Tabela 4), dependendo da resistência da cultivar inoculada, como pode ser visto na RB867515 e na RB72454 com o isolado SCPK 01-25. Além desse extremo, numa mesma variedade (RB867515) foi observada imunidade ao isolado SCPK 01-25, pois a variedade não apresentou nenhum sintoma (0,0%), entretanto quando essa mesma cultivar foi inoculada com os outros dois isolados SCPK 01-29 e SCPK 01-30 a porcentagem de área lesionada foi de 1,30 e 2,22% respectivamente. Fato semelhante ocorreu com a RB935744 quando essa variedade foi inoculada com o isolado SCPK 01-25 a porcentagem de área afetada foi de 0,02% e com o isolado SCPK 01-29 a porcentagem de área lesionada subiu para 5,66%. Na variedade RB72454 a porcentagem de área lesionada foi de 1% com o isolado SCPK 01-26, com o inóculo SCPK 01-25 a área afetada foi de 8,15%.

A variedade RB72454 foi a que apresentou maior porcentagem de área lesionada a todos os isolados (8,15; 5,77 e 6,91%), exceto ao SCPK 01-26 (1,00%). Já as variedades RB935744, RB867515 e RB92579 foram as que mostraram a menor porcentagem de área afetada com o isolado SCPK 01-25 (0,02; 0,00 e 0,10%).

Situação em que diferentes variedades apresentaram praticamente a mesma porcentagem de área afetada também aconteceu com o isolado SCPK 01-29 que foi capaz de causar 5,77% na RB72454 e 5,66% na RB935744.

No outro parâmetro de avaliação pela capacidade de esporulação, ou seja, interação compatível (+) e incompatível (-), não houve nenhuma cultivar resistente a todos os isolados, no entanto a RB935744 foi a mais resistente, visto que só foi suscetível ao isolado SCPM 01-29.

A cultivar RB92579 mostrou o mesmo padrão de reação que a RB72454, sendo as duas variedades compatíveis a todos os isolados. As cultivares RB935744 e a RB867515 quando comparadas entre si possuíram reações diferentes aos isolados, portanto essas duas variedades podem ter genes de resistência vertical diferentes.

As variedades RB867515 e a RB935744 foram as diferenciadoras no conjunto de variedades testadas. Os isolados SCPK 01-29 e 01-30 causaram reação compatível na RB867515 e o isolado SCPK 01-29 causou reação compatível somente na RB935744.

Os quatro isolados de *P. kuehnii* foram capazes de produzir três padrões de virulência nas variedades diferenciadoras (Tabela 4). A primeira reação encontrada foi com o isolado SCPK 01-29 que foi capaz de causar lesões esporulantes ou relação compatível em todas as variedades. Já o isolado SCPK 01-30 quando comparado com o isolado SCPK 01-29 causou a segunda reação, pois não esporulou na variedade RB935744. Os outros dois isolados SCPK 01-25 e SCPK 01-26 quando comparados com os isolados citados acima, produziram a terceira reação incompatível na variedade RB867515, portanto por esse parâmetro foram identificadas três raças fisiológicas em *P. kuehnii*.

Quando a avaliação foi feita utilizando os dois parâmetros, porcentagem de área afetada em conjunto com a reação compatível ou incompatível a mesma raça foi identificada entre os isolados SCPK 01-25 e SCPK 01-26, mas apresentaram agressividades diferentes. Um causou 8,15% de área lesionada e o outro 1,00 % na RB72454.

Algumas incongruências foram verificadas quando a avaliação foi conjunta, por exemplo, maior porcentagem de área lesionada não significa que a reação seja compatível, como ocorreu com o isolado SCPK 01-30, que causou maior porcentagem de área lesionada, 3,83 %, na variedade RB935744 e menor, 2,22 %, na RB72454.

na RB867515. No entanto, a capacidade de esporulação na RB935744 foi incompatível (-) e na RB867515 foi compatível (+), portanto a reação do patógeno foi diferente para as duas variedades, pois estas têm resistências diferentes.

Tabela 4. Padrão de virulência de *Puccinia kuehnii* no conjunto de variedades de cana-de-açúcar, medido pela porcentagem de área afetada e capacidade de esporulação

Identificação do patógeno	Cultivar inoculada			
	RB935744	RB867515	RB92579	RB72454
SCPCK 01-25	0,02 (-)	0,00 (-)	0,10 (+)	8,15 (+)
SCPCK 01-26	0,13 (-)	0,01 (-)	0,54 (+)	1,00 (+)
SCPCK 01-29	5,66 (+)	1,30 (+)	0,66 (+)	5,77 (+)
SCPCK 01-30	3,83 (-)	2,22 (+)	1,37 (+)	6,91 (+)

Análise da diversidade genética de *P. melanocephala*

Para *P. melanocephala* também foi construído um grupamento UPGMA para melhor visualização da diversidade genética (Figura 6).

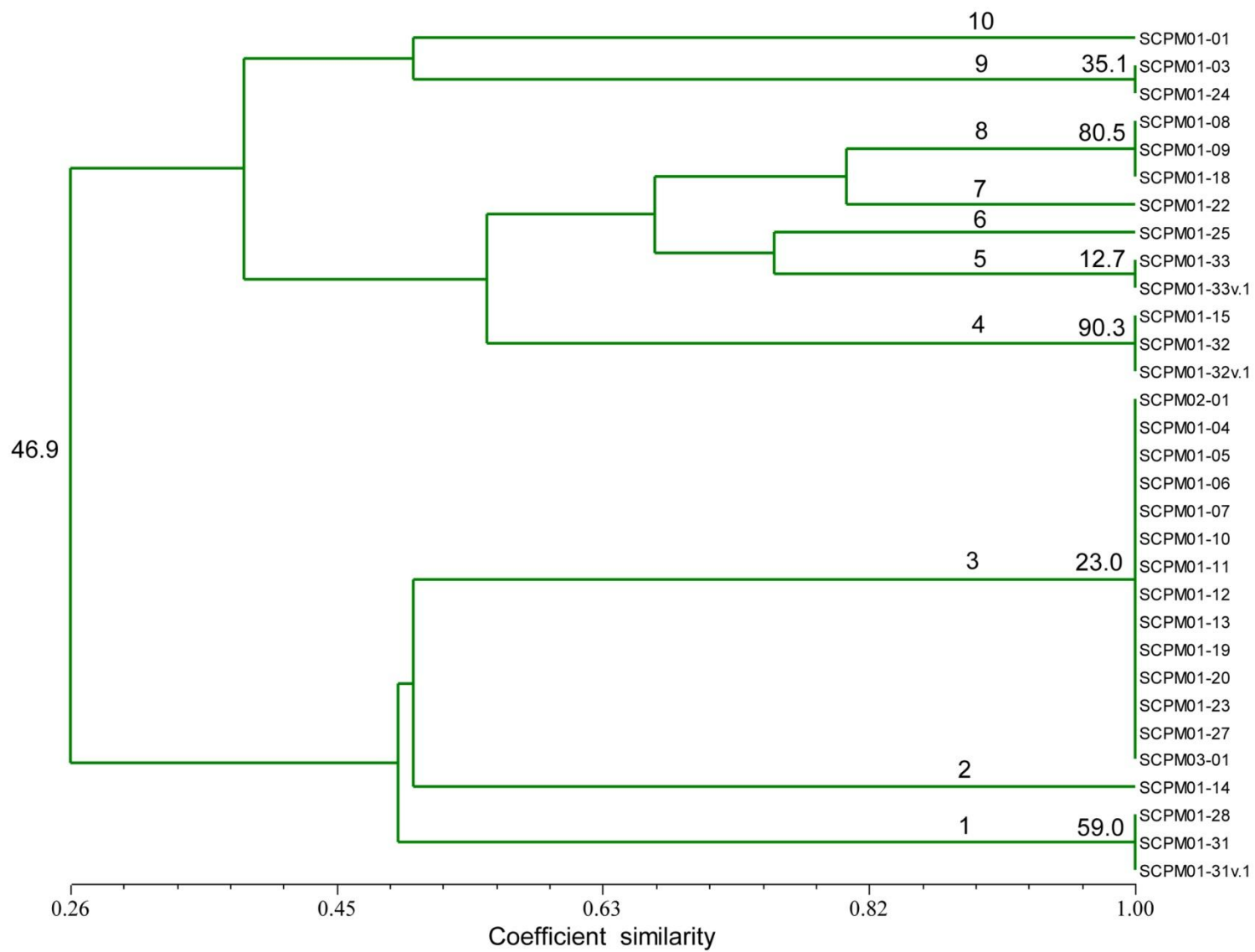


Figura 6. Análise de agrupamento UPGMA de *Puccinia melanocephala*

A análise do UPGMA de *P. melanocephala* revelou também duas populações geneticamente distintas com 74% de diversidade entre elas, dentro de um mesmo campo (Figura 6). A primeira população foi constituída de 18 indivíduos e a segunda por 13. Os isolados das duas populações foram de diferentes variedades e época de coleta e do mesmo talhão, exceto o isolado SCPM 03-01 que é da cidade de Leme. Dentro da população 1 foram encontradas duas subpopulações com 50% de diversidade e na segunda população também duas subpopulações com 59,75% de variabilidade.

Resultado semelhante foi observado na Argentina entre nove populações de *P. melanocephala* com 95% de variação dentro delas (POCOVI et al., 2010). Em contraste em um estudo realizado no Brasil com 34 isolados de *P. melanocephala* de quatro estados brasileiros foi encontrada baixa variabilidade genética entre os isolados e a maior distância genética foi de 0.31 (PEIXOTO-JUNIOR et al., 2014). Duas hipóteses podem explicar porque a diversidade dos isolados de *P. melanocephala* foi um pouco mais baixa que a de *P. kuehnii*. A primeira é que praticamente todos os isolados de ferrugem marrom foram coletados de único talhão. A segunda pode ser porque há relatos de *P. melanocephala* causando doença em cana há muito tempo, ou seja, o período de convivência pode ter contribuído para a co-evolução do patógeno.

Dentro da população 1 houve dois grupos de clones. O primeiro foi constituído de isolados de diferentes cultivares e época de coleta. O segundo grupo com isolados de diferentes variedades e cidades. Já a população 2 teve três grupos de clones, duas com diferentes cultivares, e a outra com diferentes variedades e época de coleta. Os isolados clones foram de épocas diferentes assim como ocorreu também em *P. kuehnii*.

Após a inoculação os DNAs dos isolados denominados de versão 1, SCPM 01-31 v.1, SCPM 01-32 v.1 e SCPM 01-33 v.1 foram extraídos e amplificados para verificar se tinha o mesmo perfil genético dos isolados que foram inoculados. Este ensaio foi realizado porque os esporos de ferrugem são facilmente dispersos pelo vento e poderiam contaminar o experimento.

O PCoA (Figura 7) revelou um agrupamento de 10 populações, a primeira foi constituída de três isolados (SCPM 01-28, SCPM 01-31 e SCPM 01-31v.1); a segunda de um (SCPM 01-14); a terceira de 13 (SCPM 01-04, SCPM 01-05, SCPM 01-06, SCPM 01-07, SCPM 01-11, SCPM 01-12, SCPM 01-13, SCPM 01-19, SCPM 01-20, SCPM 01-23, SCPM 01-27, 02-01 e SCPM 03-01); a quarta de três (SCPM

01-15, SCPM 01-32 e SCPM 01-32v.1); a quinta de dois (SCPM 01-33 e SCPM 01-33v.1); a sexta de um (SCPM 01-25); a sétima de um (SCPM 01-22); a oitava de três (SCPM 01-08, SCPM 01-09 e SCPM 01-18); e a nona de dois (SCPM 01-03 e SCPM 01-24) e a décima de um (SCPM 01-01). As três coordenadas do PCoA explicaram uma variação de 87,13%. A primeira e segunda coordenadas explicaram 78,6% (59,63% para a primeira e 18,97% para a segunda coordenada). O total de variação genética, 87,13% indica o quanto à análise é confiável e que as 9 populações são verdadeiramente diferentes. Embora o bootstrap da análise de UPGMA tenha apresentado alguns valores baixos, o PCoA confirmou o mesmo número de populações constituídos dos mesmos isolados, assim dando segurança aos dados obtidos pelo UPGMA.

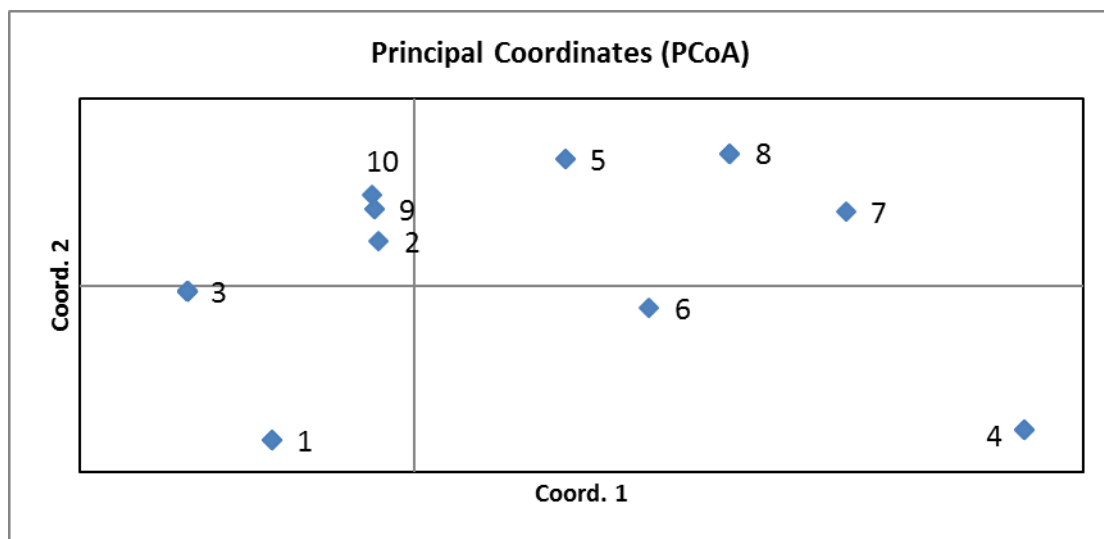


Figura 7. Análise de coordenadas principais (PCoA) para *Puccinia melanocephala*; 1 a 10 populações de *P. melanocephala*

#### Análise fenotípica da ferrugem marrom

Para *P. melanocephala*, a porcentagem de área afetada variou de 0,00 a 7,21% dependendo do isolado utilizado e da resistência das variedades, como ocorreu com RB92579 e isolado SCPM 01-32 e com RB835486 e isolado SCPM 01-31 respectivamente.

A variedade RB92579 foi imune ao isolado SCPM 01-32, porque apresentou 0,00% de área afetada, entretanto quando essa mesma cultivar foi inoculada com os

isolados SCPM 01-31 e SCPM 01-33 as áreas lesionadas foram de 0,15 e 0,28%. A RB835486 com o inóculo SCPM 01-32 a porcentagem de área foi de 0,86%, já com o isolado SCPM 01-31 aumentou para 7,81%.

Para todas as variedades o isolado SCPM 01-32 foi o que causou menor porcentagem de área afetada, o SCPM 01-33 o intermediário, exceto na variedade RB92579 e o SCPM 01-31 a maior porcentagem de área afetada. O isolado SCPM 01-31 foi o mais agressivo e o SCPM 01-32 o menos nas variedades RB835486 e RB825336.

Com a avaliação de reação compatível e incompatível as variedades RB72454, RB935744 e RB867515 foram consideradas resistentes e as RB835486 e RB825336 as suscetíveis a todos os isolados, já a cultivar RB92579 foi suscetível somente ao isolado SCPM 01-33 e, portanto, a diferenciadora.

Em *P. melanocephala* foram identificadas duas raças fisiológicas (Tabela 5). A primeira com os isolados SCPM 01-31 e SCPM 01-32 que apresentaram as mesmas reações ao conjunto de variedades e a segunda raça com o isolado SCPM 01-33, porque este quando comparado com os outros dois isolados produziu uma reação compatível na cultivar RB92579.

Tabela 5. Padrão de virulência de *Puccinia melanocephala* no conjunto de variedades de cana-de-açúcar, medido pela porcentagem de área afetada e capacidade de esporulação

Identificação do patógeno	Cultivar inoculada					
	RB835486	RB72454	RB935744	RB92579	RB867515	RB825336
SCPM 01-31	7.21 (+)	1.48 (-)	1.55 (-)	0.15 (-)	0.87 (-)	6.42 (+)
SCPM 01-32	0.86 (+)	0.09 (-)	0.06 (-)	0.00 (-)	0.03 (-)	1.44 (+)
SCPM 01-33	2.00 (+)	0.39 (-)	0.55 (-)	0.28 (+)	0.08 (-)	2.78 (+)

Algumas incongruências também foram verificadas quando a avaliação foi conjunta, para *P. melanocephala*, por exemplo, maior porcentagem de área lesionada não significou que a reação foi compatível, como ocorreu com o isolado SCPM 01-33 que causou maior porcentagem de área lesionada, 0,55%, na variedade RB935744 e menor, 0,28%, na RB92579. No entanto a capacidade de esporulação na RB935744 foi incompatível (-) e na RB92579 foi compatível (+), portanto a reação do patógeno foi diferente para as duas variedades, indicando que estas têm resistências diferentes. A mesma porcentagem de área afetada também produziu reações diferentes (Figura 8).





Figura 8. Diferentes cultivares com valores de porcentagem de área lesionada iguais, mas com diferentes reações.

Um dos fatos que pode evidenciar a não existência de correlação entre tamanho da área afetada e a compatibilidade foi que em alguns casos observou-se que pústulas grandes não esporulavam (Figura 9), observada em reação incompatível. O contrário também foi encontrado, pústulas pequenas esporulantes (Figura 10), verificadas em materiais suscetíveis com reação compatível. A avaliação pela reação compatível ou incompatível leva em consideração a resistência das variedades, ou seja, a capacidade do isolado em causar lesões esporulantes e conseqüentemente completar o ciclo das relações patógeno hospedeiro. Já a porcentagem de área afetada não considera essa característica, mas consegue diferenciar qual isolado é o mais agressivo e as outras vantagens são que as imagens têm uma precisão maior, não tem problemas com cansaço, porque é medida pelo computador. As incongruências e vantagens evidenciam que é necessário empregar os dois parâmetros de avaliação.



Figura 9. Variedade RB935744 inoculada com *Puccinia melanocephala* mostrando pústulas grandes e fechadas



Figura 10. Variedade RB92579 inoculada com *Puccinia melanocephala* mostrando pústula pequena e esporulante

### Correlação entre genotípico e fenotípico

Reprodução sexual e mutação são as duas principais formas de se ter diversidade genética em populações de fitopatógenos (KOLMER; ORDOÑEZ, 2007). Dentre esses dois tipos de variabilidade, a recombinação sexual em *P. melanocephala* e *P. kuehnii* não se conhece e também não há relatos de hospedeiro

intermediário. Já que para haver reprodução sexual em ferrugem é necessária a presença do hospedeiro intermediário, assim a única forma de reprodução que se tem conhecimento em *P. melanocephala* e *P. kuehnii* é através dos urediniósporos assexuais. Portanto, a mutação provavelmente é o que está gerando variação genética em *P. kuehnii* e *P. melanocephala*. Esta afirmação corrobora com um estudo realizado com a ferrugem do trigo agente causal *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* na América do Norte, em que a diversidade genética encontrada foi atribuída a mutações, porque não havia relatos de hospedeiro intermediário na região, conseqüentemente picnidiósporos e aeciósporos nunca foram observados (CHEN et al., 1993). Um estudo comparando as regiões ITS1 e ITS2 de *P. kuehnii* verificou inserções e deleções de nucleotídeos, assim evidenciando que a mutação está envolvida no processo de diversidade (MISTURA et al., 2015).

A conseqüência de ter maior variabilidade genética aumenta as chances de ocorrer genótipos virulentos (CUBERO SALMERON, 2003 apud POCOVI et al., 2010). Conforme ocorreu na África do Sul, que em 362 isolados coletados nos anos de 2008 a 2010 de *P. triticina* foram identificadas oito raças. Dessas oito raças duas foram recentemente introduzidas, pois foi verificado que as duas raças novas tinham 70% de variabilidade genética em relação às outras seis (TEREFE et al., 2014). Outro estudo com a mesma hipótese utilizando isolados de *P. triticina* mostrou que a população da Ásia Central teve 71 fenótipos virulentos e 75 genótipos e a população Norte-Americana 16 fenótipos virulentos e 14 genótipos, ou seja, as populações foram distinguidas genotipicamente e pelos fenótipos virulentos dentre os isolados e em nível de população assim havendo correspondência (KOLMER; ORDOÑEZ, 2007). Outra pesquisa no mesmo sentido na Europa empregou 121 isolados de *Puccinia triticina* que foram diferenciados em oito grupos genotípicos e oito fenótipos virulentos em linhagens de trigo Thatcher com genes de resistência à ferrugem da folha, assim havendo significativa correlação entre genótipos e fenótipos de virulência (KOLMER et al., 2012).

A importância de determinar se a diversidade genotípica tem correspondência com os padrões de virulência é que os programas de melhoramento poderiam saber contra quais e quantos patótipos a resistência da cultivar está sendo testada, ou seja, se a população está sendo totalmente representada em toda sua diversidade, identificar qual patótipos estão predominando e desenvolver cultivares com resistência a todas as raças que estão dominando (TWIZEYIMANA et al., 2011). Se houver a correlação entre genótipo e

virulência, somente com os dados genotípicos o número de isolados a serem testados poderia ser extremamente reduzido, pois seriam utilizados somente os isolados representantes de cada linhagem genética e, além disso, se uma nova raça fosse introduzida poderia rapidamente ser detectada através de seu genótipo. Os ensaios fenotípicos por si só têm alguns problemas como a idade e condições do hospedeiro, qualidade do inóculo, sofre influências do meio ambiente e o mais difícil é encontrar um conjunto de variedades que consiga distinguir todas as raças presentes (LEVY et al., 1993). Se a resistência da variedade for testada contra todas as raças a durabilidade será maior da cultivar liberada.

Em contrapartida há estudos que não encontraram correlação entre a diversidade genotípica e a virulência, como ocorreu com 115 isolados de *P. striiformis* f. sp. *tritici* nos quais foi verificado que raças avirulentas a uma determinada cultivar (Chinês 166) foram agrupadas junto com raças virulentas a esta cultivar, o que resultou em uma matriz de similaridade baixa, 0.20, entre genótipos e fenótipos, ou seja, não houve associação entre grupos de genótipos e grupos de virulência (CHEN et al., 1993). Outro estudo que também não encontrou correlação testou a virulência de 743 isolados de *Melampsora larici-populina* em cultivares selvagens e comerciais de álamos. No teste de virulência os patótipos foram divididos em duas populações, os que atacaram álamos selvagens e os que atacaram cultivares comerciais; no entanto, nos genótipos não foi encontrada essa diferenciação (GÉRARD et al., 2006).

Como mostram os trabalhos citados não há um consenso se a variabilidade genética encontrada vai ter correlação com a virulência. Não existe nenhum estudo anterior com *P. kuehnii* e *P. melanocephala* mostrando se há correlação entre diversidade genética e virulência, sendo este o primeiro estudo nessa linha.

A diversidade genotípica encontrada nos isolados de *P. kuehnii* do presente trabalho se refletiu na virulência. Os isolados de *P. kuehnii* SCPK 01-25, SCPK 01-26 tiveram 100% de similaridade genética e apresentaram o mesmo fenótipo. O isolado SCPK 01-30 mostrou 50% de diversidade genética e foi de outra raça. O isolado SCPK 01-29 foi 81% diverso dos demais isolados e mostrou ser de outra raça e capaz de causar doença nas quatro cultivares testada.

Já a variabilidade genética de *P. melanocephala* não teve associação com a virulência. Os isolados de *P. melanocephala* SCPM 01-31 e SCPM 01-32 foram geneticamente distintos (51.4%), mas tiveram a mesma virulência. O isolado SCPM

01-33 foi 25,6% diferente dos isolados SCPM 01-32 e SCPM 01-33 e foi de outra raça.

Os isolados SCPM 01-31, SCPM 01-32 e SCPM 01-33 coletados em 2015 foram 51,4; 46,0 e 25,6% geneticamente diversos dos isolados SCPM 01-10, SCPM 01-19 e SCPM 01-13 coletados em 2014, apesar desses isolados terem sido retirados da mesma touceira, o perfil genético mudou de 2014 para 2015. O mesmo comportamento foi observado com o isolado SCPK 01-32 e SCPK 01-29, embora foram retirados da mesma cultivar e cidade, o perfil genético foi diferente de 2014 para 2015. Uma explicação para esse fato pode ser que haja alta diversidade numa mesma folha, ou seja, toda a variabilidade do patógeno está representada em uma folha.

Os dados obtidos no presente trabalho são preliminares, pois é necessário serem validados empregando-se um número maior de isolados.

## 5. Conclusões

Diversidade genética e fenotípica foi encontrada em *P. kuehnii* e *P. melanocephala*.

Houve correlação direta entre a diversidade genotípica e os fenótipos virulentos somente em *P. kuehnii*.

## 6. Literatura citada

ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J.Y.; TÉLISMART, H.; GIRAD, J.C.; RABOIN, L.M.; RISTERUCCI, A.M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (*Bru1*) using bulked segregant analysis and RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.108, n.4, p.759-764, 2004.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Maryland Heights, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

BRAITHWAITE, K.S.; CROFT, B.J.; MAGAREY, R.C.; SCHARASCHKIN, T. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v.38, n.4, p.380-388, 2009.

CHEN, X.; ROLAND, F.L.; LEUNG, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.12, p.1489-1497, 1993.

COMSTOCK, J.C.; SOOD, S.G.; GLYNN, N.C.; SHINE, JR.J.M.; MCKEMY, J.M.; CASTLEBURY, L.A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in the United States and Western Hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v.92, n.1, p.175, 2008.

DAUGROIS, J.H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar "R570". **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart v.92, n.8, p.1059-1064, 1996.

EFRON, B.; HALLORAN, E.; HOLMES, S. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n.23, p.13429-34, 1996.

Felsenstein, J. Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, n.4, p.783-91, 1985.

GÉRARD, P.R.; HUSSON, C.; PINON, J.; FREY, P. Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. **Phytopathology**, Saint Paul, v.96, n.9, p.1027-1036, 2006.

KOLMER, J.A.; HANZALOVA, A.; GOYEAU, H.; BAYLES, R.; MORGOUNOV, A. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. **Plant Pathology**, London, v.62, n.1, p.1-11, 2012.

KOLMER, J.A.; ORDOÑEZ, M.E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. **Phytopathology**, Saint Paul v.97, n.9, p.1141-1149, 2007.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F.J.; ZEIGLER, R.S.; XU, S.; HAMER, J.E. Genetic Diversity of the Rice Blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83, n.12, p.1427-1433, 1993.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P.S.; SEIXAS, L.; MELO, S.B. **Estatísticas para descrever genética de populações**. Belo Horizonte: INTC Pecuária, 2011. (Série Técnica: Genética). Disponível em:

<[http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie\\_tecnica\\_genetica\\_populacoes.pdf](http://inctpecuaria.com.br/images/informacoes-tecnicas/serie_tecnica_genetica_populacoes.pdf)>. Acesso em: 13 nov. 2015.

MISTURA, T.F.; TAKITA, M.A.; URASHIMA, A.S. Rota da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar até o Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, n. 41, resumo 020, 2015. Suplemento.

MOREIRA, A.S. **Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal**. 2013. 87f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Murray, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, n.19, p.4321-4325, 1980.

NAGY, S.; POCZAI, P.; CERNÁK, I.; GORJI, A.M.; HEGEDŰS, G.; TALLER, J. PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. **Biochemical Genetics**, Oklahoma, v.50, n.9, p.670-672, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.

\_\_\_\_\_. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, Oxford, v.28, p.2537-2539, 2012.

PEIXOTO-JUNIOR, R.F.; CRESTE, S.; LANDELL, M.G.A.; NUNES, D.S.; SANGUINO, A.; CAMPOS, M.F.; VENCOVSKY, R.; TAMBARUSSI, E.V.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity among *Puccinia melanocephala* isolates from Brazil assessed using simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.13, n.3, p.7852-7863, 2014.

POCOVI, M.I.; RECH, G.E.; COLLAVINO, N.G.; CARUSO, G.B.; RIOS, R.; MARIOTTI, J.A. Molecular diversity of *Puccinia melanocephala* populations. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v.158, n.11-12, p.769-775, 2010.

PURDY, L.H.; LIU, L.J.; DEAN, J.L. Sugarcane rust, a newly important disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, n.11, p.1292-1296, 1983.

RABOIN, L.M.; OLIVEIRA, K.M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J.Y. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. **Theoretical Applied Genetics**, Stuttgart, v.112, n.7, p.1382-1391, 2006.

SOOD, S.G.; COMSTOCK J.C.; GLYNN N.C. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.12, p.1335-1340, 2009.

TECHEN, N.; ARIAS, R.S.; GLYNN, N.C.; PAN, Z.; KHAN, I.S.; SCHEFFLER, B.E. Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Molecular Ecology Resources*, Shawn Narum, v.10, p.508–515, 2010.

TEREFE, T.G.; VISSER, B.; HERSELMAN, L.; PRINS, R.; NEGUSSIE, T.; KOLMER, J.A.; PRETORIUS, Z.A. Diversity in *Puccinia triticina* detected on wheat from 2008 to 2010 and the impact of new races on South African wheat germplasm. **European Journal Plant Pathology**, Netherlands, v.139, n.1, p.95-105, 2014.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. cap.21. p.185-196.

TWIZEYIMANA, T.M.; OJIAMBO, P.S.; HAUDENSHIELD, J.S.; CAETANO-ANOLLE´S, G.; PEDLEY, K.F.; BANDYOPADHYAY, R.; HARTMAN, G.L. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**, London, v.60, n.4, p.719-729, 2011.

URASHIMA, A.S.; SAKUNO, C.; PIOTTO, F. Physiologic races explained the recent outbreaks of Orange rust disease on major sugarcane cultivars in Brazil. In: APS ANNUAL MEETING, 2014, Providence, Rhode Island. **Abstracts...** Disponível em: <[http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2014\\_meeting\\_abstracts/aps2014abP286.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2014_meeting_abstracts/aps2014abP286.htm)>. Acesso: 13 ago. 2016.

ZHONG, S.; LENG, Y.; FRIESEN, T. L.; FARIS, J. D.; SZABO, L. J. Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.99, n.3, p.282-289, 2009.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.26, n.4, p.449-457, 2003.



Wang, X.; Mulock, B.; Guus, B.; Mccallum, B. Development of EST-derived simple sequence repeat markers for wheat leaf rust fungus, *Puccinia tritici* Eriks. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v.32, n.1, p.98-107, 2010.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **WinBoot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: IRRI, 1996. (IRRI Discussion Paper Series, n. 14). Disponível: <<http://www.irri.org/science/software>>. Acesso em: 02 out. 2016.

## **CAPÍTULO 2: PROGRESSO DA FERRUGEM ALARANJADA NO TEMPO EM CINCO VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

### 1. Resumo

Ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) tem prejudicado o aumento da produtividade da cana-de-açúcar no Brasil. Variedades resistentes são o melhor método de seu controle. Escala da doença e porcentagem de área lesionada são os parâmetros mais empregados para avaliar linhagem de clones promissores e sua correta reação para o sucesso do controle da ferrugem baseado na resistência de genótipos. Quantidade e viabilidade de urediniósporos não têm sido consideradas para reação da doença. Além disso, falta de avaliação da reação de variedades pode explicar a diferença entre dados de casa de vegetação e o início da doença no campo. Portanto, o presente trabalho objetivou examinar a reação de algumas variedades comerciais de cana-de-açúcar à *P. kuehnii* em diferente período de tempo assim como viabilidade e quantidade de urediniósporos. Três isolados do patógeno foram inoculados uma vez em cinco variedades de cana-de-açúcar e sua reação examinada aos 21, 28, 35 e 42 dias depois da inoculação pela escala de notas. A quantidade e viabilidade de esporos foram verificadas 42 dias depois da inoculação em dois diferentes ensaios: primeira lesão diversa da RB855156: tipo 2 (resistente) e tipo 3 (suscetível); segundo, mesmo tipo de reação em duas variedades diferentes: RB855156 (suscetível) e RB975201 (resistente). Nosso dado mostrou que a reação mudou de resistente para suscetível na RB855156 à medida que o tempo avançou.

Além disso, a quantidade de urediniósporos na RB855156 foi similar entre a lesão de tipo 2 (resistente) e tipo 3 (suscetível), mas a viabilidade diferiu estatisticamente. Nenhuma diferença estatística ocorreu na quantidade de esporo se a reação da lesão foi similar independentemente da resistência do genótipo, mas a viabilidade diferiu significativamente.

**Palavras-chave:** *Puccinia kuehnii*, resistência, urediniósporos, *Saccharum* spp.

## 2. Introdução

O melhor e mais eficiente método de controle da ferrugem é a substituição de variedades suscetíveis por resistentes (TOKESKI; RAGO, 2005). Mas para que essa medida seja efetiva é imprescindível avaliar corretamente a resistência das variedades.

A resistência pode ser avaliada em campo, onde ocorrem infecções naturais do patógeno por vários isolados e um grande número de genótipos pode ser testado e/ou em casa de vegetação em que se tem o controle do ambiente e do patógeno, pois se pode escolher quais isolados inocular (SOOD et al., 2009), além disso em casa de vegetação a resistência pode ser avaliada com mais precisão, principalmente aquelas com reação intermediária como a RB855156 conforme foi descritas pelos autores Bombecini et al., 2012 e Chapola, 2013.

Tanto em campo como em casa de vegetação a resistência das variedades pode ser avaliada através de escalas de reações. Atualmente há três escalas: a primeira considera nota e porcentagem de área afetada (AMORIM et al., 1987; KLOSOWSKI et al., 2013), a segunda a abertura e quantidade de urédia (TAI et al., 1981), e a terceira pela quantidade de pústulas esporulantes (SOOD et al., 2009). No entanto, nenhuma delas leva em consideração a quantidade e a viabilidade dos esporos produzidos pelo patógeno nos diferentes genótipos.

Deste modo, é relevante a correta avaliação da resposta das variedades para que não haja equívoco ao classificar um material como resistente, sem que isso resulte num falso resistente, o que acarretaria num grave prejuízo a toda indústria canieira nacional. Portanto, o presente trabalho objetivou examinar a reação de algumas variedades comerciais de cana-de-açúcar à *P. kuehnii* em diferente período de tempo assim como viabilidade e quantidade de urediniósporos provenientes da infecção primária.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Hospedeiro

Gemas individuais das variedades de cana-de-açúcar SP89-1115, RB855156, RB867515, RB935744, RB975201 foram plantadas em copos plásticos de 250 mL com substrato e mantidas em casa de vegetação até atingirem 3 a 4 folhas. As variedades foram escolhidas com base em observações de campo.

#### 3.2 Patógeno

O isolado SCPK 01-31 foi retirado de folhas infectadas com *P. kuehnii* da variedade SP89-1115, e os outros dois isolados, SCPK 18-02 e SCPK 18-03, da variedade SP81-3250 de diferentes locais. Os esporos foram identificados pelo microscópio ótico, com o aumento de 400 vezes. *P. kuehnii* apresentou urediniósporos alaranjados, elipsoidais, com espinhos a sua volta e a parede apical espessa conforme descrito por Comstock et al. 2008.

#### 3.3 Viabilidade dos urediniósporos

O teste de germinação foi feito com 500 µL da suspensão de inóculo de cada isolado, o qual foi espalhado em meio de cultura ágar água e deixado em temperatura ambiente por 24 horas. Depois, em quatro campos da placa foram contados 25 esporos no microscópio ótico e visto a frequência de germinação (porcentagem) dos urediniósporos. A viabilidade foi de 80%.

#### 3.4 Inoculação

Com o auxílio de uma escova os esporos foram retirados das pústulas em 25 mL de água destilada. As plantas foram inoculadas com uma suspensão de  $10^5$  urediniósporos/mL (SOOD et al. 2009), determinado pelo hemacitômetro. As plantas foram inoculadas com spray manual e mantidas dentro de sacos plásticos pretos em câmara úmida por 18 horas a 23°C. Após esse procedimento, as plantas foram mantidas em ambiente de baixa umidade para prevenir novas infecções do fungo.

#### 3.5 Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo uma planta por repetição, totalizando 4 plantas. Cada experimento foi realizado duas vezes, em dias diferentes.

### 3.6 Avaliação

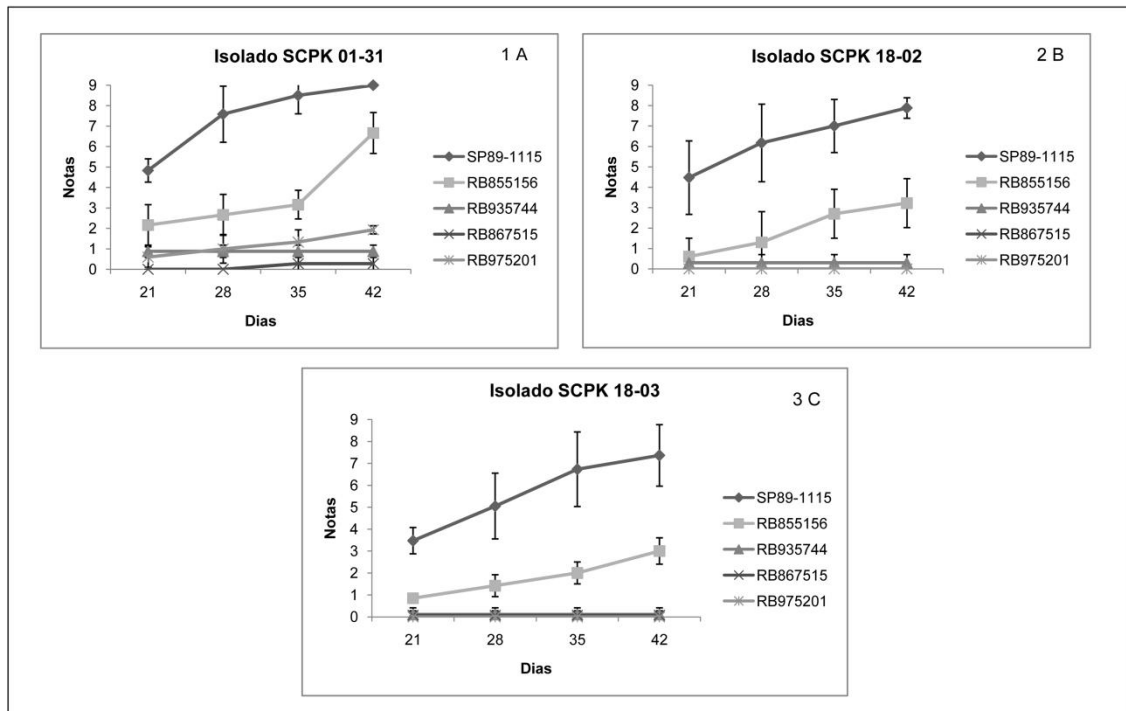
Para atingir o objetivo da avaliação da doença ao longo de diversos períodos, a reação das variedades foi medida após os 21, 28, 35 e 42 dias da inoculação, pela escala de notas proposta por Tai et al., 1981. Em que nota 0 = folhas sem infecção, 1 = manchas sem esporulação, 2 = pústulas fracamente esporulantes e identificáveis através de lupa de mão, 3 = pústulas pequenas facilmente identificáveis, 4 = pústulas mais abundantes e largas, 5 = pústulas de tamanho médio distribuídas nas folhas velhas, 6 = pústulas de tamanho médio, podendo se estender até as folhas menos maduras, 7 = similar a 6, mas com as pontas das folhas mortas e secas, 8 = pústulas grandes, coalescentes e densamente coberta de pústulas, 9 = similar a 8, mas todas as folhas velhas estavam secas. Depois a média das notas foi calculada a partir de todas as folhas que apresentaram sintomas da doença. O número de folhas avaliadas foi: RB855156: 6; SP89-1115: 14; RB935744: 9; RB867515: 7 e RB975201: 15.

Para o ensaio de viabilidade e quantidade de urediniósporos foram utilizadas as variedades RB851556 e a RB975201. Destas foram retirados os esporos de 4 pústulas por cultivar por nota. Dentro da variedade RB855156 foram comparadas as reações 2 e 3 e entre as cultivares apenas a reação 3, utilizando a escala de notas elaborada por Tai et al., 1981. A viabilidade foi determinada pela frequência de esporos germinados (porcentagem) enquanto a quantidade de urediniósporos, pelo número. Os dados de viabilidade e quantidade de urediniósporos foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

## 4. Resultados e Discussão

### Progresso da ferrugem alaranjada no tempo

Na avaliação da doença em função do período de avaliação de cinco variedades de cana foram encontrados três padrões de reações diferentes: suscetível, resistente e resistente que se tornou suscetível (Figura 1).



**Figura 1.** Progresso da ferrugem alaranjada no tempo com três isolados diferentes em cinco variedades de cana-de-açúcar. Nota 0 = folhas sem infecção, 1 = manchas sem esporulação, 2 = pústulas fracamente esporulantes e identificáveis através de lupa de mão, 3 = pústulas pequenas facilmente identificáveis, 4 = pústulas mais abundantes e largas, 5 = pústulas de tamanho médio distribuídas nas folhas velhas, 6 = pústulas de tamanho médio, podendo se estender até as folhas menos maduras, 7 = similar a 6, mas com as pontas das folhas mortas e secas, 8 = pústulas grandes, coalescentes e densamente coberta de pústulas, 9 = similar a 8, mas todas as folhas velhas estavam secas.

A cultivar SP89-1115 na primeira avaliação (21 dias), mostrou pústulas abundantes, largas, tamanho médio e distribuído nas folhas velhas, com nota entre 4 e 5. Na segunda e terceira avaliações (28 e 35 dias) a doença aumentou, mostrando pústulas de tamanho médio, grandes e coalescentes, a ponta das folhas velhas secas e mortas (necrose), densamente coberto de pústulas que foram classificadas como notas 7 e 8. Na última coleta de dados (42 dias) atingiu a nota máxima 9, todas as folhas estavam secas e mortas (Figura 1A). Esse foi o primeiro padrão de reação encontrado de suscetibilidade. Um segundo padrão de reação foi o de resistência, observado nas variedades RB935744, RB867515 e RB975201 cuja primeira e segunda avaliação (21 e 28 dias) foi verificada folhas sem infecção e manchas sem esporulação, classificadas como notas 0 e 1. Na terceira e última avaliações (35 e 42 dias) somente pústulas fracamente esporulantes foram notadas (nota 2), assim formando o grupo das variedades com resposta resistente (Figura 1A). Por fim a terceira reação, do tipo resistente que se torna suscetível observada na variedade RB855156, exibindo um comportamento diferenciado em função dos períodos de avaliação. Na primeira e segunda avaliação aos 21 e 28 dias ocorreram somente pústulas fracamente esporulantes (nota 2). No entanto, na terceira avaliação (35 dias) essa variedade passou de resistente para suscetível, pois a

doença progrediu, mostrando pústulas pequenas facilmente identificáveis (nota 3). Na última análise (42 dias) a doença aumentou consideravelmente, com pústulas de tamanho médio estendendo até as folhas menos maduras, ou seja, atingindo nota 6 (Figura 1A). Portanto, a cultivar RB855156 passou de resistente para suscetível em função dos períodos de avaliação. O mesmo padrão de reação das variedades (resistente, suscetível e resistente para suscetível) foi observado para os outros dois diferentes isolados do patógeno testados. A única discrepância observada foi que a variedade RB855156 inoculada com os isolados SCPK 18-02 e SCK 18-03 mudou de reação na última avaliação (42 dias), enquanto que com o isolado SCPK 01-31 a mudança ocorreu na terceira observação (35 dias) (Figura 1B e 1C).

Este estudo verificou que podem ter variedades resistentes que se tornam suscetíveis à medida que a colonização/reprodução se desenvolve (Figura 1), comportamento observado na RB855156. Os ensaios em casa de vegetação têm classificado essa variedade como intermediária, conforme ocorreu no estudo que comparou a severidade da doença após os 22 dias da inoculação, onde essa variedade não diferenciou estatisticamente nem das suscetíveis quanto das resistentes, razão pela qual foi classificada como intermediária (Chapola et al. 2013). Em outro estudo que analisou o número e comprimento das pústulas depois de 14 dias da inoculação, a RB855156 também foi intermediária, sem, no entanto, fornecer maiores detalhes (Bombecini et al. 2012). O motivo pelo qual esses trabalhos não classificaram a variedade RB855156 como suscetível pode estar na avaliação da reação que foi feito numa única vez (14 e 22 dias) (Bombecini et al. 2012; Chapola et al. 2013).

Identificar variedades com mudança de reação (que mudam de reação à medida que a colonização/reprodução avança), ou seja, não tem um comportamento definido já nas primeiras avaliações, seja de resistência ou suscetibilidade, como observado nas variedades SP89-1115, RB867515, RB975201 e RB935744 é essencial tanto em ensaios de casa de vegetação como 'in vitro', seja para examinar diversidade do patógeno ou testar resistência de variedades. Geralmente, os ensaios fazem as avaliações 14 ou 21 dias após a inoculação, como ocorreu com a cultivar R570 que teve sua resistência testada contra *P. melanocephala* de diferentes países e avaliados depois dos 10 e 14 dias da inoculação pela observação de pústulas esporulantes (ASNAGHI et al. 2001); em outro estudo sobre variabilidade patogênica na população de *P. melanocephala*, a resposta de resistência dos diferentes genótipos de cana-de-açúcar também foi avaliada aos 14

dias da inoculação (HOY et al. 2014). Em *P. kuehnii*, a variabilidade patogênica e genética, além da reação de genótipos de cana-de-açúcar de *P. kuehnii* também foi verificada 21 dias após inoculação (MOREIRA, 2013). Portanto, quando é realizada uma única avaliação existe a possibilidade de a variedade mudar de reação, de resistente para suscetível como observado no caso da variedade estudada, RB855156, que quando inoculada com o isolado SCPK 01-31 mudou de reação aos 35 dias e com os isolados SCPK 18-02 e SCPK 18-03, modificou de reação aos 42 dias. Se esse tipo de reação não for identificado nos ensaios de seleção, os resultados terão um falso resistente.

#### Viabilidade e Quantidade de urediniósporos

Avaliando a reação das variedades com maiores detalhes, quando a quantidade de urediniósporos das pústulas de notas 2 e 3 da variedade RB855156 foram comparadas, não houve diferença estatística, pois as urédias produziram 21,75 e 24,50 esporos, respectivamente. Para o segundo parâmetro analisado (viabilidade de urediniósporos), os esporos produzidos pelas urédias fracamente esporulantes e identificáveis através de lupa (nota 2) tiveram 4,25% de viabilidade, assim diferindo estatisticamente dos esporos das pústulas pequenas e facilmente identificáveis (nota 3) que obtiveram 26,96% de esporos germinados.

Tabela 1. Diferentes reações da variedade RB855156 à *Puccinia kuehnii* medida pela quantidade e viabilidade de urediniósporos.

Nota <sup>y</sup>	Quantidade	Viabilidade (%)
2	21,75a	4,25b
3	24,50a	26,96a
CV (%)	20,64	35,68

<sup>y</sup> nota 2 - pústulas fracamente esporulantes e identificáveis através de lupa de mão; nota 3 - pústulas pequenas facilmente identificáveis. Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No outro teste, quando se comparou esporos produzidos em pústulas pequenas e facilmente identificáveis (nota 3) em variedades com resistência diferenciada (RB975201 – resistente), e (RB855156 – suscetível), a quantidade de esporos não diferiu estatisticamente, 16,75 e 24,40 respectivamente. Já para



viabilidade, a variedade suscetível, RB855156 diferenciou estatisticamente com 16,63% de esporos viáveis, enquanto que a variedade RB975201 não teve nenhum esporo germinado.

Tabela 2. Quantidade e viabilidade de urediniósporos em duas variedades de cana-de-açúcar com resistência diferenciada.

<b>Reação 3</b>		
	<b>Quantidade</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
RB855156 <sup>y</sup>	24,40a	16,63a
RB975201 <sup>w</sup>	16,75a	0,00b
CV (%)	22,69	25,89

<sup>y</sup> Variedade suscetível; <sup>w</sup> Variedade resistente.

Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Embora, o ensaio comparando quantidade e viabilidade de urediniósporos de diferentes lesões, e entre variedades tenham sido realizados separadamente, os resultados da RB855156 foram similares para a lesão 3 nos dois ensaios. No primeiro, a quantidade de esporos foi 24,50 e no segundo 24,40. Já a viabilidade foi de 26,96 no primeiro e 16,63% no segundo ensaio. O fato de não ter havido diferença entre esses valores para uma mesma variedade é mais um fator que mostra segurança dos dados.

Quando a reação das canas foi avaliada com mais detalhes, considerando quantidade e viabilidade dos urediniósporos, os genótipos com a mesma reação (nota), mas com resistência diferenciada, RB855156 (suscetível) e RB975201 (resistente) obtiveram igual quantidade de esporos, mas viabilidade diferente. Já era esperado que duas variedades com a mesma reação (nota) produzissem igual quantidade de urediniósporos porque a urédia (nota 3) são lesões de mesmo tamanho, pequenas e facilmente identificáveis, conseqüentemente tivessem a mesma quantidade de esporos. Estes dados são consistentes com os encontrados na ferrugem da folha do trigo, causada pela *P. triticina*, onde foi verificado que a produção de esporos por lesão está intimamente ligada ao tamanho da lesão e a produção de esporos por unidade de tecido esporulante (AZZIMONTI et al. 2013). Outro estudo que corrobora os dados do presente trabalho foi verificado com a ferrugem marrom da cana-de-açúcar (*P. melanocephala*) na Louisiana, em que

houve pouca diferença no tamanho da lesão entre as variedades suscetíveis e resistentes (HOY et al. 2014).

Nos programas de melhoramento genético as escalas de notas utilizadas para avaliar a resistência dos genótipos de cana-de-açúcar à ferrugem são baseadas na porcentagem de área afetada (AMORIM et al. 1987; KLOSOWSKI et al. 2013), no tamanho e abertura de pústulas (TAI et al. 1981), ou no número de pústulas esporulantes (SOOD et al. 2009) não considerando quantidade e viabilidade de esporos. No entanto, o resultado desse trabalho mostrou que a germinação dos esporos de uma variedade resistente (RB975201) foi estatisticamente menor quando comparada com uma suscetível (RB855156) (Tabela 2). Portanto, se um genótipo for avaliado por qualquer uma das escalas existentes atualmente a variedade pode ser classificada como suscetível, mas a germinação dos seus esporos pode ser baixa (Figura 2). Assim, o parâmetro viabilidade foi melhor que a quantidade de urediniósporos do ponto de vista fitopatológico, pois a doença é de ciclo secundário, assim a qualidade dos esporos influencia na propagação da espécie, ou seja, na direta capacidade da doença em causar epidemias. Esse é o primeiro trabalho que tenha empregado germinação de esporos para avaliar a resistência do hospedeiro, não é do nosso conhecimento nenhum estudo com esse enfoque.

### **Visualização de lesões tipo 2 e tipo 3**

Com o software ASSESS 2.0 foi medida a área das pústulas fracamente esporulantes (nota 2) e pústulas pequenas e facilmente identificáveis (nota 3) (Figura 2), pois estas lesões diferenciavam variedades resistentes das suscetíveis. A área das lesões variou de 11 a 39 mm<sup>2</sup>, assim não havendo diferença entre as lesões.

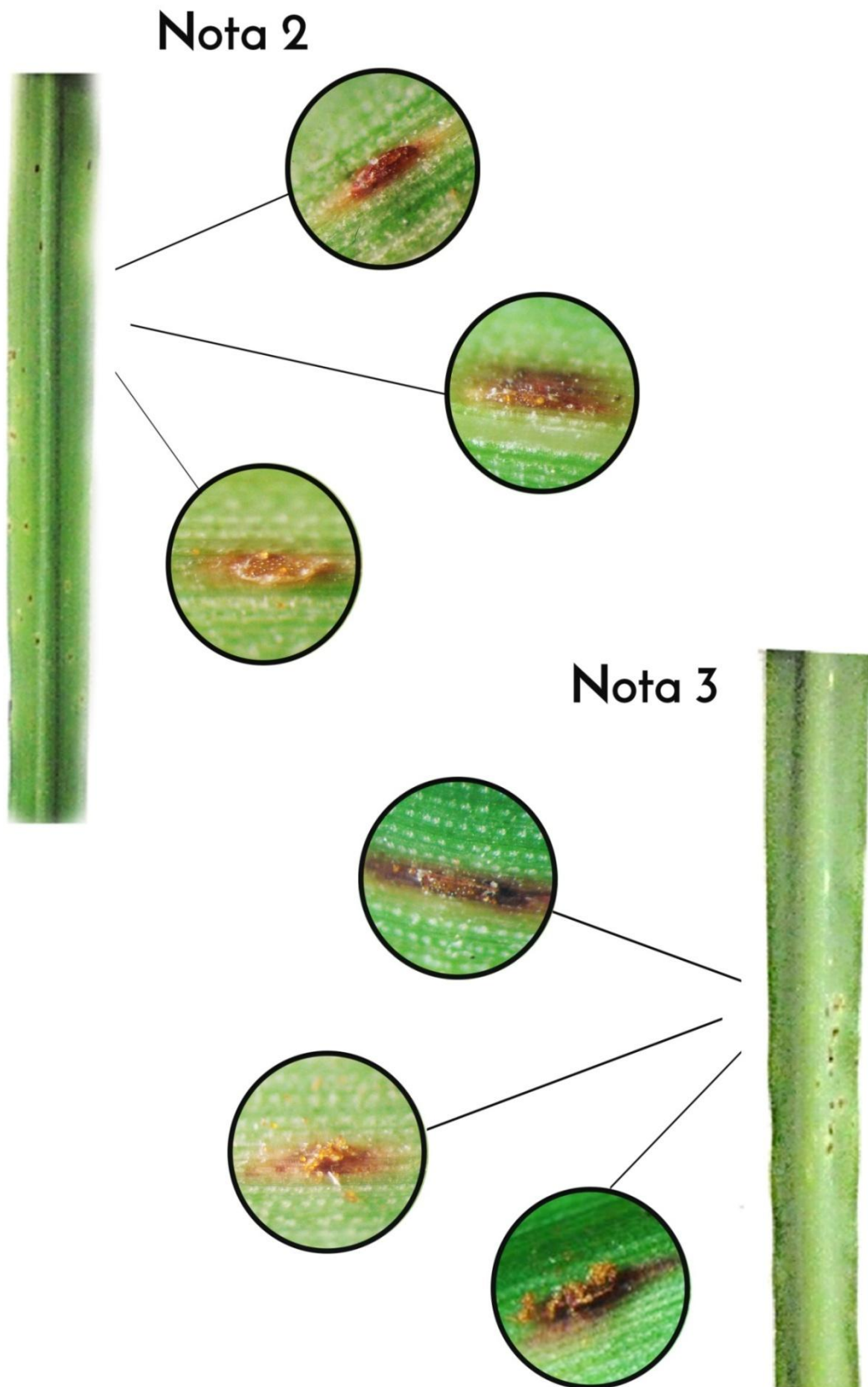


Figura 2. Visualização de pústula de reações diferentes causadas por *Puccinia kuehnii* na variedade RB855156

Um fato que pode explicar por que pústulas fracamente esporulantes e identificáveis com lupa (nota 2) da RB855156 tenha tido mesma quantidade de urediniósporos que pústulas pequenas facilmente identificáveis (nota 3) (Tabela 2), pode estar na dificuldade prática de distinguir nota 2 da 3 (Figura 2). As duas lesões possuíam áreas cloróticas/necróticas de igual tamanho com a diferença que na lesão nota 2 uma fina película recobria a pústula, o que impedia a disseminação dos urediniósporos. No entanto, essa película era rompida facilmente por qualquer ação mecânica, por exemplo, durante ensaio de quantificação dos urediniósporos, resultando em igual número de esporos entre a lesão 2 e 3, mas maturação/viabilidade distinta.

## 5. Conclusões

Os dados do presente trabalho permitiram concluir que a variedade RB855156 muda de reação de resistente para suscetível e a viabilidade dos urediniósporos de uma variedade suscetível é maior que de uma variedade resistente.

## 6. Literatura Citada

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C.O.N.; MORAES, V.A.; FERNANDES, C.R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v.39, p.13-16, 1987.

ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n.3, p.282-286, 2001.

AZZIMONTI, G.; LANNOU, C.; SACHE, I.; GOYEAU H. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. **Plant Pathology**, London, v.62, n.5, p.970-981, 2013.

BOMBECINI, J.; GONÇALVES, C.R.N.; ASCENCIO, I.; URASHIMA, A.S. Resistance of sugarcane varieties to *Puccinia kuehnii* in Brazil. In: APS ANNUAL MEETING, 2012, Providence, Rhode Island. **Abstracts...** Disponível em: <[http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012\\_Meeting\\_Abstracts/aps12abP425.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012_Meeting_Abstracts/aps12abP425.htm)>. Acesso: 13 abr.2016.

CHAPOLA, R.G. **Reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehni*)**. 2013. 77f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COMSTOCK, J.C.; SOOD, S.G.; GLYNN, N.C.; SHINE, JR.J.M.; MCKEMY, J.M.; CASTLEBURY, L.A. First report of *Puccinia kuehni*, causal agent of orange rust of sugarcane, in the United States and Western Hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v.92, n.1, p.175.1-175.1, 2008.

HOY, J.W.; AVELLANEDA, M.C.; BOMBECINI J. Variability in *Puccinia melanocephala* pathogenicity and resistance in sugarcane cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v.98, n.12, p.1728-1732, 2014.

KLOSOWSKI, A.C.; RUARO, L.; BESPALHOK FILHO, J.C.; MIO, L.L.M. Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.38, n.2, p.166-171, 2013.

MOREIRA, A.S. **Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal**. 2013. 87f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOOD, S.G.; COMSTOCK J.C.; GLYNN N.C. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v.93, n.12, p.1335-1340, 2009.

TAI, P.Y.P.; MILLER, J.D.; DEAN, J.L. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.261-268, 1981.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2. cap.21. p.185-196.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi investigar fatores que influenciam no sucesso e longevidade do controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades resistentes, podendo ser os dois principais: diversidade do patógeno e correta avaliação da reação das variedades. Dados do presente trabalho mostraram alta

diversidade genética e fenotípica tanto em *P. kuehnii* quanto em *P. melanocephala* e, além disso, correlação direta entre a diversidade genotípica e os fenótipos virulentos em *P. kuehnii*. Também foi observado que existem variedades onde a avaliação da sua resistência deve ser cuidadosa, pois em uma das cinco variedades estudadas mostrou reação atípica que pode levar a uma falsa resistência em função do período de avaliação. Para evitar um falso resistente sugerem-se outros parâmetros ainda não considerados: viabilidade e quantidade de urediniosporos. O presente trabalho objetivou contribuir com uma maior eficácia do controle das ferrugens por variedades resistentes.