



**Universidade Federal de São Carlos**  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Curso de Engenharia Agrônoma



**GIOVANA CABELLO DE MORAIS**

**Uma nova raça fisiológica de *Puccinia kuehnii* virulenta a variedade  
RB966928**



**Universidade Federal de São Carlos**  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Curso de Engenharia Agrônoma



**GIOVANA CABELLO DE MORAIS**

**Uma nova raça fisiológica de *Puccinia kuehnii* virulenta a variedade  
RB966928**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de engenharia agrônoma da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Engenheira agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Seiiti Urashima

**Dedico o meu trabalho a minha família, meus pais Luciane e João Carlos e a minha irmã Janaina, que sempre me deram apoio, incentivo, acreditaram no meu potencial, e não mediram esforços para eu chegar aonde estou.**

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço em primeiro lugar toda a minha família, principalmente minha mãe Luciane, meu pai João Carlos e minha irmã Janaina, por todo o amor e carinho que me proporcionaram em toda minha vida. Sou grata pela educação que me foi dada, que me fez ser a pessoa que sou hoje. Agradeço por estarem comigo em todos os momentos, mesmo à distância, me proporcionando apoio, ajuda, companheirismo, e me incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço também ao meu companheiro, André Luis Coral, por todo companheirismo, amizade e apoio em todos esses anos, me ensinando a ter mais paciência e perseverança para superar as dificuldades encontradas no caminho.

Agradeço a República Gaia, para todas as mulheres com quem morei ou as pessoas que pude conhecer devido a Gaia. Sou muito grata a todas por todo carinho, paciência, ajuda, companheirismo, aprendizados e momentos que tivemos durante esses anos, o qual teve um papel muito importante na minha formação profissional e me proporcionou um grande crescimento pessoal, e sei que são pessoas que levarei para toda a minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Alfredo Seiti Urashima por me aceitar me orientar, ter me proporcionado a oportunidade de conduzir esse trabalho, e todo ensinamento em todos esses anos. Agradeço as pessoas que fizeram parte do LAGEM nesse período, por todo apoio, ajuda e ensinamentos que me foram passados.

E por fim, agradeço a Universidade Federal de São Carlos e a todos os professores do curso, o qual foram fundamentais para a minha formação profissional.

Que nada nos defina, que nada nos sujeite.  
Que a liberdade seja a nossa própria  
substância, já que viver é ser livre.

Simone de Beauvoir

## RESUMO

O Brasil é, atualmente, o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, chegando a 677,6 milhões de toneladas de cana processada, na safra de 2022/23, o qual possui como principal produto o etanol e o açúcar. Para que atenda toda a demanda do setor é de extrema importância manter altas produtividades no campo, e um dos principais entraves seria a presença de doenças no campo, sendo uma das principais a ferrugem alaranjada. Ela é uma doença causada por um fungo *Puccinia kuehnii*, que possui como característica elevada disseminação e é responsável por diminuir a área fotossintética da planta, diminuindo a sua produtividade. Seu principal método de controle é a adoção de variedades resistentes, porém em alguns casos essa resistência pode ser quebrada, podendo causar grandes prejuízos ao setor. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo: I. Avaliar fenotipicamente se a *P. kuehnii* manifestada na variedade RB966928 é uma raça fisiológica nova. II. Se o objetivo I for comprovado, avaliar se existe um marcador molecular microssatélite capaz de diferenciar as diferentes raças fisiológicas testadas. A primeira parte do trabalho foi conduzida em ambiente fechado, com luz e clima controlado, o delineamento foi blocos ao acaso, onde testou duas variedades (RB966928 e SP89-1115) e dois isolados de origem distintas (ScPk01-207 e ScPk20-01), com 5 repetições por tratamento, realizado em duplicata. Seguindo para a parte molecular, extraíndo DNA de uma pústula por planta inoculada, e sua análise realizada através do PCR, seguido pela eletroforese. A avaliação da primeira parte foi realizada aos 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação dos tratamentos, realizando uma análise de porcentagem de área afetada, e aos 28 dias foi realizada uma análise de viabilidade dos urediniosporos. O trabalho concluiu a existência de uma nova raça fisiológica de *P. kuehnii* virulenta a variedade RB966928, o qual apresentou porcentagem de área foliar afetada superior a 1%, e os seus esporos se mostraram viáveis. Na segunda parte, não foi possível identificar um SSR capaz de evidenciar diferença genética entre os isolados avaliados.

**Palavra-chave:** Cana-de-açúcar, *Puccinia kuehnii*, variedade resistente, raça fisiológica, RB966928.

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Dados dos dois isolados de <i>Puccinia kuehnii</i> , contendo as respectivas informações: variedade, origem e data de coletada d'o material .....	17
<b>Tabela 2.</b> Lista de primers designados a <i>Puccinia kuehnii</i> .....	23
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de área foliar afetada na variedade de cana-de-açúcar RB966928, testadas com dois isolados de <i>Puccinia kuehnii</i> , ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliada em diferentes períodos após a inoculação (Ensaio 1 e 2).....	25
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de área foliar afetada na variedade de cana-de-açúcar SP89-1115, testadas com dois isolados de <i>Puccinia kuehnii</i> , ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliada em diferentes períodos após a inoculação (Ensaio 1 e 2).....	28
<b>Tabela 5.</b> Viabilidade dos esporos de origem da variedade RB966928 de cana-de-açúcar, testadas com dois isolados diferentes de <i>Puccinia kuehnii</i> , ScPk20-01 e ScPk01-207 (Ensaio 1 e 2).....	32
<b>Tabela 6.</b> Viabilidade dos esporos de origem da variedade SP89-1115 de cana-de-açúcar, testadas com dois isolados de <i>Puccinia kuehnii</i> , ScPk20-01 e ScPk01-207 (Ensaio 1 e 2).....	33

## Lista de figuras

- Figura 1.** 1. Coleta das folhas com sintomas de ferrugem alaranjada na variedade RB966928; 2. Preparo da suspensão de esporo, com o auxílio de uma escova de cerdas; 3. Contagem da quantidade de esporo presentes na suspensão de esporo com o Neubauer; 4. Plantas acopladas dentro do saco plástico após realizar a inoculação; 5. Ambiente controlado o qual as plantas permanecerem após a inoculação submetidas a luz artificial; 6. Temperatura do local onde as plantas permaneceram durante o experimento. .... 21
- Figura 2.** Coleta das pústulas individualizadas para a realização da avaliação de viabilidade dos esporos das pústulas classificadas como +4 e +5, de origem dos diferentes tratamentos realizados. .... 23
- Figura 3.** Programa Assess 2.0 Image Analysis Software utilizado para a avaliação de porcentagem de área foliar afetada. .... 24
- Figura 4.** Porcentagem de área afetada da variedade RB966928 ao isolados ScPk20-01 e ScPk01-207 de *Puccinia kuehnii*, em diferentes períodos de avaliação (14, 21, 28 e 35). ..... 28
- Figura 5.** Porcentagem de área afetada da variedade RB89-1115 ao isolados ScPk20-01 e ScPk01-207 de *Puccinia kuehnii*, em diferentes períodos de avaliação (14, 21, 28 e 35). ..... 30
- Figura 6.** Reação das duas variedades RB966928 e SP89-1115 de cana-de-açúcar, inoculadas aos diferentes isolados de *Puccinia kuehnii* ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliados nos dias 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação..... 32
- Figura 7.** Virulência dos dois diferentes isolados de *Puccinia kuehnii* na variedade SP89-1115, realizado em blocos casualizados, com cinco repetições, em duplicata. .... 33
- Figura 8.** Virulência dos dois diferentes isolados de *Puccinia kuehnii* na variedade RB966928, realizado em blocos casualizados, com cinco repetições, em duplicata. .... 33
- Figura 9.** Imagem do microscópio óptico, aumento 400x, da avaliação de viabilidade dos urediniósporos (análise aos 28 dias) das pústulas classificadas como +3 e +4, que surgiram na variedade RB966928, inoculadas com os diferentes isolados ScPk20-01 e ScPk01-207. .... 36



**Figura 10.** Imagem realizada com o auxílio de uma lupa, aos 28 dias após a inoculação. As folhas são dos diferentes tratamentos realizando, ambas da variedade RB966928, sendo 1, 2 e 3 inoculadas com o isolado ScPk20-01 e as 4, 5 e 6 inoculadas com os isolados ScPk01-207.

..... 37

**Figura 11.** Imagem realizada com o auxílio de uma lupa, aos 28 dias após a inoculação. As folhas são dos diferentes tratamentos realizando, ambas da variedade SP89-1115, sendo A, B e C inoculadas com o isolado ScPk20-01 e as D, E e F inoculadas com os isolados ScPK01-207.

..... 38

**Figura 12.** Amplificação do PCR em gel de agarose em 3%, onde os dois isolados de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207, obtiveram a mesma altura e não mostraram diferença a nível molecular com os primers testados..... 39

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3. OBJETIVO .....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1. I: Análise fenotípica .....	19
4.1.1. Coleta das amostras de ferrugem .....	19
4.1.2. Confirmação da doença .....	19
4.1.3. Hospedeiro .....	19
4.1.4. Inoculação .....	20
4.1.5. Delineamento estatístico .....	21
4.1.6. Teste de viabilidade do patógeno .....	21
4.1.7. Avaliação e análise dos dados .....	23
4.2. II: Análise molecular .....	24
4.2.1. Extração de DNA <i>Puccinia kuehnii</i> .....	24
4.2.2. PCR .....	25
5. RESULTADOS .....	27
5.1. I: análise fenotípica.....	27
5.1.1. Ocorrência da doença avaliada em quatro datas diferentes .....	27
5.1.2. Viabilidade dos urediniósporos .....	34
5.1.3. Visualização das pústulas aos 28 dias.....	36
5.2. II: Análise molecular .....	38
6. DISCUSSÃO .....	40
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS .....	43



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é, atualmente, o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, chegando a 677,6 milhões de toneladas de cana processada, na safra de 2022/23, totalizando uma área de 8,4 milhões de hectares de área colhida. O setor sucroalcooleiro é responsável por produzir importantes commodities voltados para o comércio interno e externo, sendo eles etanol e açúcar, além de ser responsável pela produção de energia elétrica durante o período da safra (CONAB, 2023). Além disso, o setor é responsável por colaborar para a redução de emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE), através da produção de energia limpa (Marra et al., 2021).

Assim, a produtividade da cana-de-açúcar é de extrema importância no setor, e depende de diferentes fatores, como adubação, solo, manejo, e um dos principais é a presença de doenças nos canaviais, sendo uma delas a ferrugem alaranjada. A doença é causada por um fungo chamado *Puccinia kuehnii*, apresenta como sintoma pequenas pontuações de cor alaranjada, distribuídas por toda a área abaxial da folha, e conforme há o aumento da doença as lesões evoluem causando necrose, diminuindo significativamente a área fotossintética da planta, prejudicando significativamente a produtividade da área (Ferrari et al., 2010).

O controle da doença pode ser feito por aplicação química, mas o seu principal método é a utilização de variedades resistentes, o qual se tornou uma característica primordial para o lançamento de novas variedades comerciais pelos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar. Porém, essa resistência a ferrugem pode ser quebrada ao longo do tempo, isso ocorre devido à alta variabilidade genética da espécie, havendo a presença de subpopulações de *P. kuehnii*, o qual apresentam patogenicidade diferente em relação as variedades presentes no mercado (Urashima et al., 2020). Essa quebra de resistência causa grandes perdas ao setor, como ocorreu em 2012, com a variedade RB82-3250, uma das principais variedades da época (Vinchi, 2013).

Por isso, é de extrema importância os estudos de populações de uma espécie, para que ocorra o manejo varietal adequado, e evitar que aconteça grande epidemias de doenças causando elevadas perdas de produtividade ao setor.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

O setor sucroalcooleiro possui grande importância na economia brasileira, com a sua produção voltada ao biocombustível, açúcar e energia. Na safra de 2022/23, segundo a Conab, a Companhia Nacional de Abastecimento, o Brasil apresentou uma área de 8,4 milhões de hectares destinados a colheita de cana-de-açúcar, com uma produção média de 78.779 kg/ha. Na safra foi produzido 27,7 bilhões de litros de etanol, e 36 milhões de toneladas de açúcar, representando o maior produtor de açúcar no mundo. Segundo estimativas da safra de 2023/2024, haverá um aumento de 6,9% da área de cultivo no país, com acréscimo de 11,1% na produção de açúcar e 5,7% de etanol (CONAB, 2023).

Em relação a exportação brasileira da safra 2022/23, o país foi responsável por exportar 18,8 milhões de toneladas de açúcar, o qual registrou um aumento de 9,7% em relação à safra passada (2021/22), possuindo como principal comprador a China, seguido da Índia e Arábia Saudita, dados divulgados pelo Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC). Já o etanol, houve uma queda de 5,2% da exportação em relação à safra anterior, com um total de 1,44 bilhões de litros, possuindo como principais compradores Coreia do Sul, Estados Unidos e Holanda (CONAB, 2023).

Além da produção de etanol e açúcar, o setor é responsável por gerar bioenergia durante os meses da safra (abril - novembro), através do bagaço de cana, um subproduto proveniente do processo de extração do caldo para a produção de açúcar ou etanol. Dados da Oferta Interna de Energia, levantados pelo BEN (Balanço Energético Nacional), que engloba tanto energia elétrica quanto combustíveis, a energia de origem da biomassa de cana representou 15,4% de toda energia produzida no país em 2022, correspondendo a maior fonte de energia renovável no Brasil. Porém ainda está muito abaixo da energia de origem de petróleo e derivados, o qual corresponde a 35% da produção do país, uma fonte não renovável que possui alta emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Balanço Energético Nacional, 2023).

Visando a sustentabilidade, no ano de 2015, o Brasil assinou o Acordo de Paris, o qual o país se comprometeu a criar estratégias para manter a temperatura do mundo abaixo de 2°C, a partir da redução da emissão GEE (Gases de efeito estufa) (Marra et al., 2021). Com isso foi criado no país, uma política de comercialização de créditos de carbono, que proporciona unidades produtoras de biocombustíveis a adquirirem uma receita adicional através da comercialização de crédito de descarbonização (CBIO) de origem da produção de energia

limpa. Desta forma, proporcionou um novo mercado para o setor sucroalcooleiro, que está atualmente em crescente expansão e desenvolvimento (Marra et al., 2021).

Frente ao cenário atual, com a crescente valorização da cana-de-açúcar em diferentes setores, e a sua constante expansão no território do país, uma preocupação como entrave à altas produtividades seria a presença de doenças nos canaviais, sendo uma das principais a ferrugem alaranjada.

A ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar é uma doença causada por um Basidiomiceto, *P. kuehnii*, o qual trata-se de um fungo biotrófico, que possui hospedeiro específico, a cana-de-açúcar. Seus sintomas são pequenas manchas cloróticas, presentes na parte abaxial da folha, formando as urédias de cor alaranjada, chamadas de pústulas (Ferrari et al., 2010). O aumento dos sintomas na folha diminui a capacidade da planta de realizar a fotossíntese, logo interfere no seu crescimento, acúmulo de açúcar e conseqüentemente na produtividade (Zhao et al., 2011). A doença é disseminada através de vento, podendo ser levada a longas distâncias, e é favorecida por verão chuvoso, com umidade relativa do ar alta, e temperaturas entre 19° a 26° (Ferrari et al., 2010). O período de molhamento foliar necessário para infecção da *P. kuehnii* é de 12 horas, e há o aumento da severidade da doença conforme o aumento desse período (Urashima et al., 2018).

O primeiro relato da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar ocorreu no ano de 2000, na Austrália, onde causou grandes perdas econômicas no setor. Pois uma das variedades de grande importância no país, a Q124, foi considerada altamente suscetível, a qual chegou a ter perdas de até 40% de tonelada de cana por hectare (Magarey et al., 2001). Posteriormente, em 2007, foi relatada nos Estados Unidos, Florida, causando grandes perdas de produtividade na variedade CP 80-1743, a qual era muito utilizada na época (Comstock et al., 2010). No Brasil, foi reportada pela primeira vez em dezembro de 2009, no interior de São Paulo, o qual afetou variedades muito utilizadas pelo setor no período, como as SP89-1115, RB722454 e SP84-2025, que posteriormente foram classificadas como altamente suscetíveis à doença (Barbasso, 2010). Tais variedades correspondiam a 10% do total de cana no país, causando assim, grandes perdas de produtividade, tendo sido reportada uma perda de ATR de até 40% na variedade SP89-1115 (Zuza; Borsato, 2013). Posteriormente, no ano de 2012, ocorreu uma epidemia da doença na variedade RB81-3250, o qual nos primeiros estudos sobre a ferrugem no Brasil, realizados no ano de 2009, não constava como suscetível (Barbasso, 2010). Essa segunda

epidemia da doença causou maiores perdas ao setor, já que a variedade RB81-3250, era a segunda variedade mais importante do período, com uma área total de cultivo de 830 mil hectares (Chapola et al., 2014).

Os métodos de controle da ferrugem podem ser de duas maneiras, variedades resistentes e controle químico. O controle químico, através de fungicidas, são utilizados em situações emergenciais, principalmente em casos em que a resistência da doença na variedade é quebrada (Alves, 2019). Como aconteceu com a variedade SP81-3250 o qual houve uma necessidade imediata da aplicação química para que as perdas de produção não fossem elevadas (Vinchi, 2013). Além disso, a sua utilização proporciona a manutenção de variedades suscetíveis que trazem vantagens produtivas ao setor. Entretanto, é uma medida de controle de alto custo, pois é necessário realizar aplicações frequentes para que haja o controle efetivo, e possui o risco de impactos ambientais, se caso o fungicida for utilizado de maneira indevida (Chaulagain et al., 2019).

Assim, atualmente o principal método de controle é a utilização de variedades resistentes, com vantagens econômicas, devido a eliminação de operações no campo, e sustentáveis, pois não causam impactos ambientais (Amorim et al., 2011). A resistência das variedades depende de uma relação parasita-hospedeiro-ambiente, com a interação entre genes de resistência do hospedeiro e o gene de virulência do patógeno, havendo ou não a sua compatibilidade (Shahin, 2020). Estudos relatam que no caso da cana-de-açúcar esta resistência genética a *P. kuehni* ocorre devido a presença de um gene de efeito maior, e outros poucos genes de efeito menor (Klosowski et al., 2004). E essa resistência das variedades a ferrugem alaranjada pode ser quebrada ao longo do tempo, isso ocorre devido a existência de alta variabilidade genética do patógeno, causando diversidade genética dentro da população de *P. kuehni*, o qual já foi relatado em trabalho realizado por Urashima et al. (2020).

Portanto, essas variações genéticas que vão surgindo com o tempo dentro de uma mesma espécie de patógeno, dão origem as raças, e elas podem apresentar comportamentos distintos perante diferentes variedades de um mesmo hospedeiro, e isso explica a ocorrência da quebra de resistência de muitas variedades comerciais, em diversos países (Shine et al., 2005). Hoje já existem diferentes raças de *P. kuehni*, relatadas em diferentes países do mundo, como ocorreu na Austrália em 2000, o qual estima-se que foi o surgimento de uma nova raça que causou quebra de produtividade na variedade de cana-de-açúcar mais utilizada no país (Magarey et al.,

2001). No Brasil, estudos recentes realizados por Urashima et al. (2020) que confirmaram a existência de duas raças de *P. kuehni* a partir do método de inoculação de mono-pústula. Para ferrugem marrom da cana-de-açúcar, causada por *Puccinia melanocephala*, já foi relatada ocorrência de novas raças, como nos EUA por Shine et al. (2005), o qual indicaram a existência de pelo menos 4 raças em um trabalho com variedades resistentes.

Diversidade de raças de patógenos podem ser investigadas tanto de maneira fenotípica como genotípica, através de metodologias já realizada em outros trabalhos como de Urashima et al. (2020), Moreira et al. (2018), Sanjel et al. (2021). A análise fenotípica consiste em avaliar a reação de diferentes isolados a variedades de hospedeiro, quando são submetidas às mesmas condições climáticas. E para isso os critérios de avaliação considerados são, segundo Tai et al. (1981), o qual avaliou a severidade da doença, com notas de 0 a 9, conforme a abertura da pústula. Segundo critério, é de porcentagem de área foliar afetada (Klosowski et al., 2013), e o terceiro a viabilidade do urediniósporo, o qual avalia a segunda geração da *P. kuehni*, e a sua capacidade de causar novas pústulas, e conseqüentemente o aumento da doença no campo (Urashima et al., 2019). Para isso, é de extrema importância que os trabalhos de análise fenotípica sejam realizados em ambientes controlados, para que não haja interferência do ambiente nos resultados (Moreira et al., 2018).

No caso de uma avaliação genética, muitos estudos de diversidade genética de fungos fitopatogênicos, vem empregando os marcadores moleculares microssatélites (SSR) como ferramenta, pois através deles é possível realizar uma análise em nível genético, sem interferência fenotípica do meio ambiente em que se conduz a pesquisa (Meinhardt et al., 2002). Os SSR são uma sequência de 1 a 8 pares de bases repetidas no DNA, que possuem alta especificidade do patógeno, possibilitando examinar diversidade dentro de uma mesma espécie. A sua adoção é frequente em trabalhos para analisar a genética populacional de patógenos, como utilizado por Peixoto-Junior et al. (2014) o qual avaliou a diversidade genética de diferentes isolados de *P. melanocephala*.

Porém, alguns casos de incidência da doença podem não representar a ocorrência de diversidade da virulência do patógeno, mas sim agressividade, o qual ocorre principalmente devido a condições climáticas atípicas da região de ocorrência e ideais para o desenvolvimento da doença, como umidade relativa alta e temperaturas entre 22 e 24°C (Magarey et al., 2004). No Brasil, a junção entre diversidade climática entre as regiões produtoras de cana-de-açúcar e



a uniformidade genética dos hospedeiros, se torna propício para a ocorrência de novas raças ou o surgimento de variantes mais agressivas (Moreira et al., 2018).

Portanto, os estudos populacionais da *P. kuehnii* são de extrema importância para realizar o manejo varietal adequado e evitar grandes perdas econômicas do setor. A partir desses fatos apresentados, o presente trabalho buscou investigar a ocorrência de ferrugem alaranjada na variedade RB966928, o qual foi relatada no início de 2023, no interior do estado de São Paulo. A doença apresentou notas de severidade de 5 e 6 nas folhas +1 e +2, segundo a escala diagramática proposta por Amorim et al. (1987), contrariando muito estudos já realizados o qual a variedade RB966928 é considerada resistente a doença (Araujo et al., 2013; Chapola et al., 2013). Esta variedade é muito utilizada pelo setor, estando em primeiro lugar em área cultivada no estado de São Paulo com 16,2%, e em segundo lugar com 12,7% de toda área cultivada do Brasil, dados da safra 2021/2022 (Braga Junior et al., 2023). Por isso, o presente trabalho teve como objetivo investigar se a ocorrência da doença na variedade ocorreu devido a alguma condição ambiental adversa no local ou a presença de uma raça fisiológica do patógeno capaz de causar ferrugem alaranjada na variedade RB966928.

### 3. OBJETIVO

- I. Avaliar fenotipicamente se a *P. kuehnii* manifestada na variedade RB966928 é uma raça fisiológica nova.
- II. Se o objetivo I for comprovado, avaliar se existe um marcador molecular microssatélite capaz de diferenciar as diferentes raças fisiológicas testadas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. I: Análise fenotípica

#### 4.1.1. Coleta das amostras de ferrugem

No experimento foram testados dois isolados distintos de *P. kuehnii*. O primeiro isolado (ScPk20-01) coletado em uma usina na região central do estado de São Paulo, na data 07/03/2023, oriundos da variedade RB966928. A área apresentava alta incidência de ferrugem alaranjada, com uma estimativa de severidade de 5 e 6, segundo a escala de notas da ferrugem em cana-de-açúcar (Amorim et al., 1987), avaliadas nas folhas +1 e +2.

O segundo isolado (ScPk01-207) foi coletada na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Campus Araras, São Paulo, na data 08/03/2023, vindas da variedade SP89-1115, o qual é uma variedade classificada como suscetível à ferrugem alaranjada.

**Tabela 1.** Dados dos dois isolados de *Puccinia kuehnii*, contendo as respectivas informações: variedade, origem e data de coletada do material.

Isolado	Variedade	Origem	Data da coleta
ScPk20-01	RB966928	Usina-SP	07/03/2023
ScPk01-207	SP89-1115	Araras-SP	08/03/2023

#### 4.1.2. Confirmação da doença

As folhas coletas de ambas as variedades utilizadas no experimento, RB966928 e SP89-1115, foram levadas ao laboratório para que houvesse a confirmação de *P. kuehnii*, realizada através de suas características morfológicas como a formação da urédias de cor alaranjada, e urediniosporos unicelulares, ovóides de coloração alaranjada (Barbasso et al., 2010), que foram observados com o auxílio de um microscópio ótico, pelo aumento de 400x.

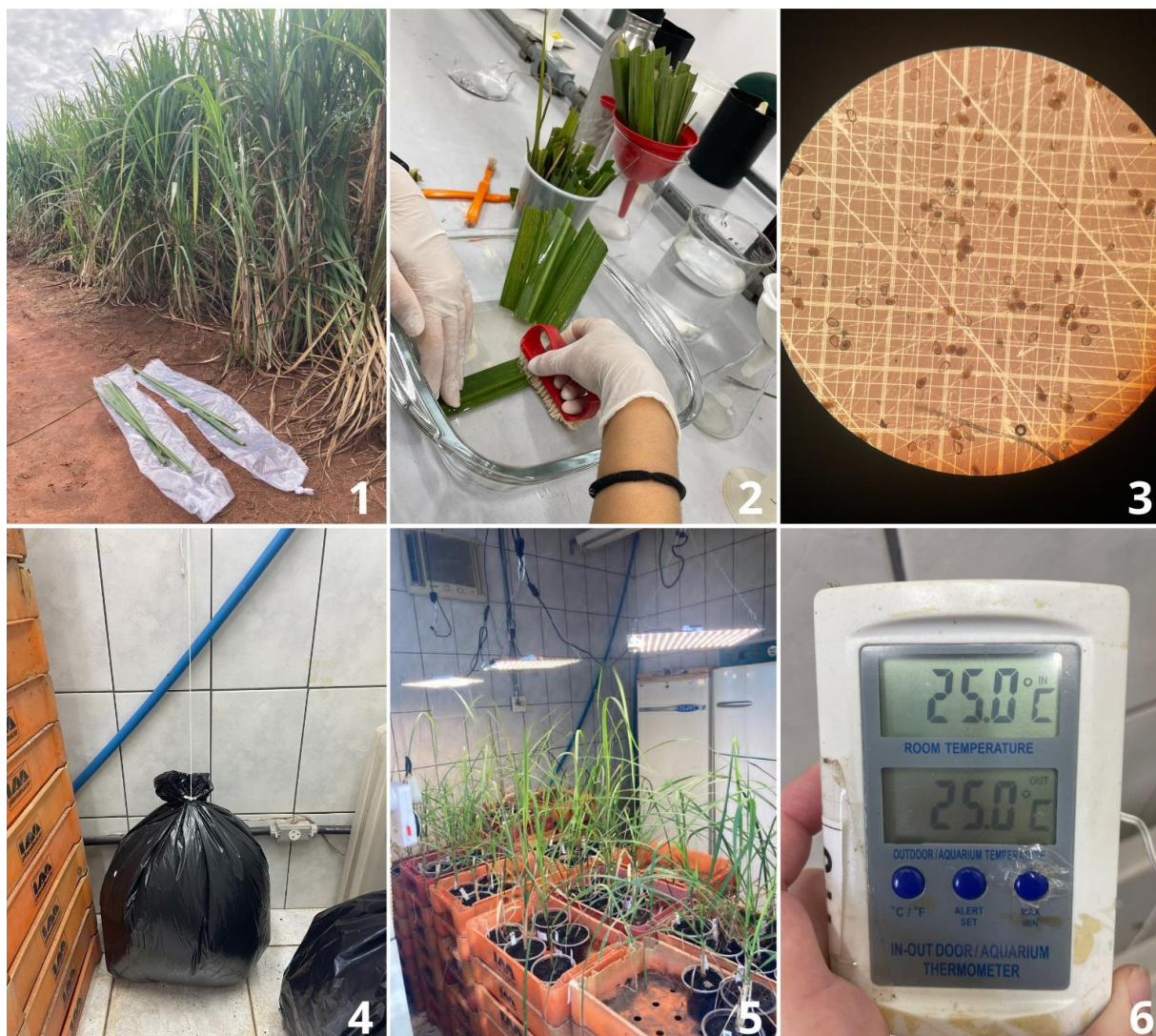
#### 4.1.3. Hospedeiro

Gemas das variedades RB966928 e SP89-1115, coletadas no campus da UFSCar- Araras, foram plantadas individualizadas em vasos de plástico de 500ml com substrato, e foram mantidas em casa-de-vegetação até apresentarem 3 folhas.

#### 4.1.4. Inoculação

A suspensão de esporos foi realizada com o auxílio de uma escova de cerdas, usada para a retirada dos esporos das folhas (figura 1), adicionada à 25 mL de água destilada e tween20 concentração 0,01%. A concentração da suspensão de esporo foi ajustada para  $10 \times 10^4$  urediniósporos/mL avaliada com Neubauer no microscópio óptico.

As plantas foram inoculadas com um spray manual, sendo uma suspensão de esporo para cada repetição, com uma planta da variedade RB966928 e uma SP89-1115 inoculadas juntas, e logo após foram mantidas em câmara úmida em um saco plástico preto por 24 horas, a 25°C. Após a retirada do saco, as plantas permaneceram em um ambiente fechado com a presença de luz artificial, com o auxílio de uma placa de luz led a 30 cm de distância das plantas, com intensidade de 240 a 280  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , e temperatura controlada de 25°C.



**Figura 1.** 1. Coleta das folhas com sintomas de ferrugem alaranjada na variedade RB966928; 2. Preparo da suspensão de esporo, com o auxílio de uma escova de cerdas; 3. Contagem da quantidade de esporo presentes na suspensão de esporo com o Neubauer; 4. Plantas acopladas dentro do saco plástico após realizar a inoculação; 5. Ambiente controlado no qual as plantas permanecerem após a inoculação submetidas a luz artificial; 6. Temperatura do local onde as plantas permaneceram durante o experimento.

#### 4.1.5. Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi blocos ao acaso, com cinco repetições, sendo uma planta por repetição. O experimento foi realizado em duplicata para haver maior confiabilidade nos resultados.

#### 4.1.6. Teste de viabilidade do patógeno

Foi realizado dois diferentes testes de viabilidade do patógeno, o primeiro foi durante o preparo da suspensão de inóculo, com origem das folhas que foram coletadas no campo, de

cada isolado ScPk20-01 e ScPk01-207. O qual retirou-se 150µl de cada suspensão de esporo utilizada na inoculação, totalizando 10 repetições por origem, e transferiu-se para uma placa Agar-água cada, onde foram mantidas por 24 horas, e posteriormente a germinação dos esporos foram avaliadas em um microscópio óptico, onde verificou-se a frequência de urediniósporos germinados, contando 100 por placa. Essa análise teve como objetivo avaliar a viabilidade dos esporos em situação de campo, visando conferir se a viabilidade dos esporos estava adequada para a inoculação do trabalho.

O segundo teste de viabilidade foi realizado 28 dias após a inoculação (figura 2), retirando-se 3 pústulas com base na escala de notas de Tai et al. (1981), sendo que nota 0= são folhas sem infecção, 1= manchas pequenas sem esporos, 2= pústulas pequenas com pouco esporos, 3= pústulas pequenas com maior quantidade de esporos, 4= pústulas mais abundantes, com início de margens, 5= pústulas de tamanho médio, esporuladas, 6= pústulas mais desenvolvidas, com margem bem definida, 7= pústulas grandes, esporuladas, início de coalescência, 8= pústulas grandes, coalescentes e densas, e 9= similar a oito, e seca. Portanto, retirou-se 3 lesões com pústulas classificadas com notas +3 e +4 de cada planta inoculada, dos dois isolados e as duas variedades (RB966928 e SP89-1115), para que houvesse a avaliação de viabilidade das lesões que originaram nas plantas que foram inoculadas no experimento. Para isso, utilizou-se placas de petri com meio Agar-água, e retirou-se, com o auxílio de um bisturi, 3 pústulas de cada planta do experimento, o qual foram alocadas em partes demarcadas da placa, para serem avaliadas de maneira separada posteriormente, e em seguida as placas foram mantidas 24 horas no escuro e depois realizada a sua avaliação, determinando a frequência de esporos germinados (porcentagem). O objetivo dessa análise foi avaliar a viabilidade dos urediniósporos dos diferentes isolados testados após germinarem nos diferentes hospedeiros (RB966928 e SP89-1115), sendo um parâmetro importante para diferenciar genótipos resistentes de suscetíveis.

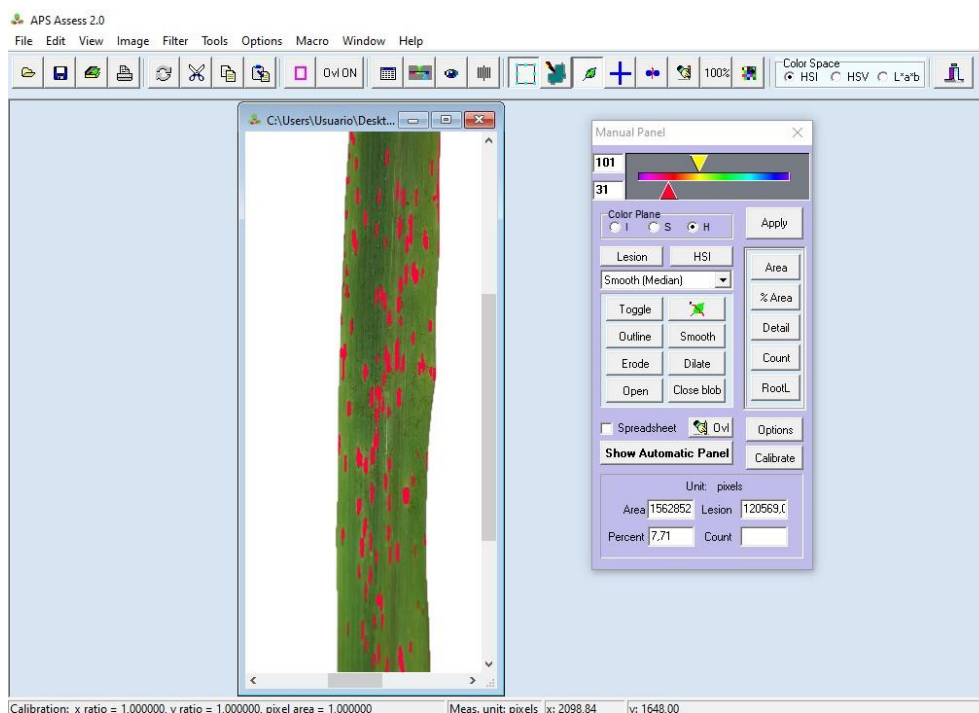


**Figura 2.** Coleta das pústulas individualizadas para a realização da avaliação de viabilidade dos esporos das pústulas classificadas como +3 e +4, de origem dos diferentes tratamentos realizados.

#### 4.1.7. Avaliação e análise dos dados

A avaliação da reação das variedades aos diferentes inóculos de *P. kuehni*, foram feitas aos 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação, através do programa Assess 2.0 Image Analysis Software (figura 3), o qual avalia a porcentagem de área afetada na folha, considerando a folha mais afetada, mostrando a severidade da doença em função das diferentes datas avaliadas. Os dados de porcentagem de área foliar afetada foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

O segundo parâmetro avaliado foi a viabilidade dos uredinósporos, sendo primeiramente durante a inoculação, avaliando a viabilidade dos esporos vindos do campo, e posteriormente aos 28 dias, metodologia utilizada no trabalho de Urashima et al. (2020), o qual teve como objetivo determinar se os esporos classificados com nota +4 e +5, que originaram de ambas as variedades inoculadas com os dois isolados distintos, eram viáveis, apresentando capacidade de germinar. Para a avaliação foi utilizado um microscópio óptico, com o aumento de 400x, e contou-se quantos esporos germinaram a cada 100. Os resultados da viabilidade aos 28 dias foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.



**Figura 3.** Programa Assess 2.0 Image Analysis Software utilizado para a avaliação de porcentagem de área foliar afetada.

## 4.2. II: Análise molecular

### 4.2.1. Extração de DNA *Puccinia kuehnii*

O DNA do patógeno foi extraído, baseando-se no protocolo de Murray & Thompson (1980), de pústulas isoladas de origem dos diferentes tratamentos, sendo primeiro do isolado ScPk20-01 inoculado na variedade RB966928 e o segundo isolado ScPk01-207 inoculado na variedade RB89-1115. As pústulas foram coletadas das folhas da primeira parte do experimento, conduzida em ambiente controlado. As pústulas individualizadas foram picadas com lâmina de metal, e colocadas em microtubos de 1,5 ml. posteriormente foi adicionado o 150 $\mu$ 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 direcionadas para o banho maria o qual permaneceram por 2 horas a 65°C. Após o banho maria, elas foram centrifugadas a 5939g por 5 minutos, e retirou-se 150 $\mu$ L da suspensão e transferiu para outro microtubo de 1,5mL e em seguida foi adicionada 150 $\mu$ L de clorofórmio/etanol (24:1), e homogeneizou-se por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15203g por 5 minutos em temperatura ambiente, em seguida foi realizada a retirada 100 $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra e transferidas para outro microtubo de 1,5ml, onde adicionou-se 70 $\mu$ L de isopropanol, e foi homogeneizada por 2 minutos. As amostras permaneceram no freezer por 1 hora, e posteriormente centrifugadas a 15203g por 20 minutos



a 4°C. A solução foi retirada para a visualização do pellet e adicionou-se 1ml de álcool 70%, seguindo para ser centrifugadas novamente a 15203g por 10 minutos a 4°C. Em seguida retirou-se o álcool e os microtubos com o DNA passaram para o Speed Vacuum por 3 minutos para haver a secagem. Finalizando o DNA foi dissolvido em 30µL de TE, e armazenados adequadamente.

#### 4.2.2. PCR

Os DNAs extraídos foram amplificados com volume de 10µL, o qual foram diluídos em água deionizada autoclavada, que consistiu 10 mM Tris-HCL pH 8.8, 50 mM KCL, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1µM de cada primer, 200µM dNTPs, 0.5 unidades de Taq DNA polimerase e 2 µL de DNA genômico. No processo de amplificação foi utilizada o 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). Seguindo para etapa de eletroforese, o qual adicionou-se 5µl de tampão de carregamento, e as amostras foram pipetadas em gel agarose 3%, diluído em 0,5X TBE. Para a sua avaliação o gel foi corado em brometo de etídio e observado com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

Foram selecionados 15 conjuntos de primers (Tabela 2), dentre os 19 já testados por Urashima et al. (2020), o qual apresentaram polimorfismo no trabalho de diversidade de isolados brasileiros de *P. kuehni*.

**Tabela 2.** Lista de primers designados a *Puccinia kuehni*.

Identificação	Orientação	Amplificação
NPRL_PK_108	Forward: GAGAAATGCAATCCAAGAGGACAG Reverse: AAATGACGACATTGGAGACGTTG	104-131
NPRL_PK_13	Forward: GATCCAGATCAACACCAGCCTC Reverse: ACTACCCATCATCATCCCATTGAG	177-419
NPRL_PK_132_spka	Forward: GATATCATCGGGAACATCACTTTTG Reverse: AGGAAGGAGTCCCTATCAATCCTC	151
NPRL_PK_135b	Forward: GAGGGAGCATCATATTCATCATCAC Reverse: CTCATCGACATCTTCATCACCAC	177
NPRL_PK_16	Forward: GAGGAGATCAGGCTGCTTATCG Reverse: ACGTCACCAGAAGGAATAAGATCG	167

NPRL_PK_162_spka	Forward: ACTTGTTGAGTTTGACTTGCTGGG Reverse: CACCCATCTTCGTTCCAAGTAGTG	124-180
NPRL_PK_221_spka	Forward: TTTCTGCTGACCGTTCATATCTTG Reverse: TGTAGAAGAGCAGGAAGAAGAGGG	177-179
NPRL_PK_28_spka	Forward: GAGATGATCACCATGGCATTCTTAG Reverse: CTCCGCAACTAAAACCCTACAAAC	116
NPRL_PK_28	Forward: TGATCCATTTCAAACGTCAATGC Reverse: AGAAGAAGGAAGAGAGGTGGAAGC	126
NPRL_PK_37	Forward: CTCTAGCCTGTTCTTACTTGCCTG Reverse: GAAACAATATTTGAACACTTTGACTCC	141-146
NPRL_PK_382_spka	Forward: GAAGGTTCCGATTGAATTTTATTTC Reverse: TAACTCTTCGTTCTTCCTTTCCCC	107-171
NPRL_PK_20	Forward: AGCTGCCAATAAACACTCTTCTGG Reverse: AGAAGGAAGGGTCTGAAGAAGGAG	140
NPRL_PK_60_spka	Forward: ATAGCAGGCTGTTGAAGATTCAGG Reverse: TCTGAGAGACCCACAAACAAAATG	261
NPRL_PK_19	Forward: ATCACTGCCTAATCCAAATTCCAC Reverse: AGAGGAAAACGTGAAGAAGGCAAC	140-248
NPRL_PK_89_spka	Forward: CAAGTATGGTCGTCCATCTCAACC Reverse: TGATTGATGATTGTGGAAGGATTG	166

## 5. RESULTADOS

### 5.1. I: análise fenotípica

#### 5.1.1. Ocorrência da doença avaliada em quatro datas diferentes

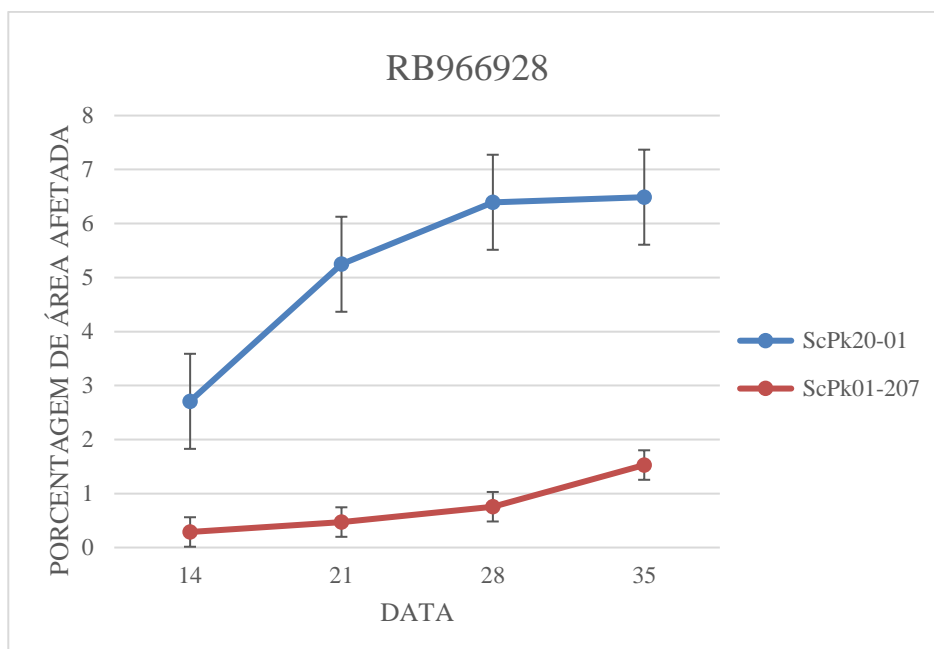
Os resultados da avaliação de ocorrência da doença nas duas variedades (RB966928 e SP89-1115) avaliadas nos diferentes períodos, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação, obtidos a partir da porcentagem de área foliar afetada com o auxílio da ferramenta Software ASSESS 2.0., estão presentes nas tabelas 3 e 4, e os mesmos dados estão representados nas figuras 4 e 5.

**Tabela 3.** Porcentagem de área foliar afetada na variedade de cana-de-açúcar RB966928, testadas com dois isolados de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliada em diferentes períodos após a inoculação (Ensaio 1 e 2).

<b>Variedade RB966928</b>				
<b>Área foliar afetada nos diferentes dias avaliados (%)</b>				
<b>ENSAIO 1</b>				
	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>35 dias</b>
<b>ScPk20-01</b>	2,708 a	5,246 a	6,394 a	6,408 a
<b>ScPk01-207</b>	0,288 a	0,472 b	0,756 b	1,528 b
	54,09%	31,59%	28,34%	32,02%
<b>ENSAIO 2</b>				
	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>	<b>28 dias</b>	<b>35 dias</b>
<b>ScPk20-01</b>	2,184 a	3,824 a	6,048 a	6,101 a
<b>ScPk01-207</b>	0,33 a	0,928 b	1,07 b	1,32 b
<b>CV</b>	41,67%	24,27%	24,95%	36,82%

\*Dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ . Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

Os dados presentes nas tabelas 3, de porcentagem de área foliar afetada estão demonstrados nas figuras 4, para que haja uma melhor visualização dos resultados.



1.1.

**Figura 4.** Porcentagem de área afetada da variedade RB966928 ao isolados ScPk20-01 e ScPk01-207 de *Puccinia kuehnii*, em diferentes períodos de avaliação (14, 21, 28 e 35).

Os resultados de área foliar afetada da variedade RB966928, evidenciam duas reações distintas em função aos dois isolados testados. A primeira reação foi ao isolado ScPk01-207 de origem de Araras, da variedade SP89-1115. O tratamento apresentou média de área foliar afetada baixa em todas as avaliações, iniciando aos 14 dias após a inoculação, com média de porcentagem de área afetada de 0,288%, havendo o aumento relativamente baixo, passando para 0,472% na avaliação aos 21 dias e 0,756% aos 28 dias, e apresentou média de 1,528% na última avaliação realizada, aos 35 dias após a inoculação, resultados o qual condiz com trabalho realizado por Chapola (2013), o qual foi conduzido em casa-de-vegetação, e sua avaliação de severidade foi realizada conforme o tempo de latência da doença nas variedades, variando de 18 a 22 dias após a inoculação, e apresentou severidade na variedade RB966928 de 0%. Entretanto, a reação da variedade RB966928 foi diferente ao testar com o segundo isolado (ScPk20-01). As plantas inoculadas apresentaram aos 14 dias, média de área foliar afetada 2,708%, havendo um aumento gradual da área afetada conforme as avaliações realizadas, apresentando média de 5,246% aos 21 dias, e chegou a 6,394% aos 28 dias, e posteriormente a doença se estabilizou, não apresentando crescimento da média de área afetada aos 35 dias após a inoculação, com porcentagem de 6,488%.

Segundo a metodologia adotada pelo melhoramento genético da cana-de-açúcar que define se uma variedade é resistente ou suscetível a um patógeno, o qual se baseia na interação do patógeno e o hospedeiro classificando como compatível e incompatível. O qual é considerada

compatível quando a área foliar afetada for superior que 1%, e incompatível quando a área afetada for inferior (Urashima et al., 2020). Logo, a partir dos dados obtidos podemos observar que a interação da variedade RB966928 ao isolado ScPk20-01 foi compatível em todas as avaliações, apresentando área foliar afetada aos 14 dias de 2,708% e chegando aos 6,488% na última avaliação aos 35 dias, portanto apresentou comportamento de variedade suscetível, logo o isolado se mostrou ser virulento em relação a variedade RB966928. Já observando os dados obtidos do segundo isolado ScPk01-207, de origem da UFSCar, nas três primeiras avaliações, 14, 21 e 28 dias, apresentou porcentagem de área foliar inferior a 1%, mostrando uma interação incompatível com a variedade RB966928, reação de variedade resistente, se mostrando não virulento em relação a variedade testada. Porém na avaliação aos 35 dias a porcentagem chegou a 1,5% de área foliar afetada no primeiro ensaio e 1,3% no segundo, o qual pode ter ocorrido devido a uma coalescência das lesões, já que a ferrugem possui como característica período de latência curto, e não teria como surgir novas lesões na planta aos 35 dias após a inoculação, em situação de ambiente controlado. Com isso, conclui-se que aos 35 dias após a inoculação não é uma data adequada para estudar diversidade de raças.

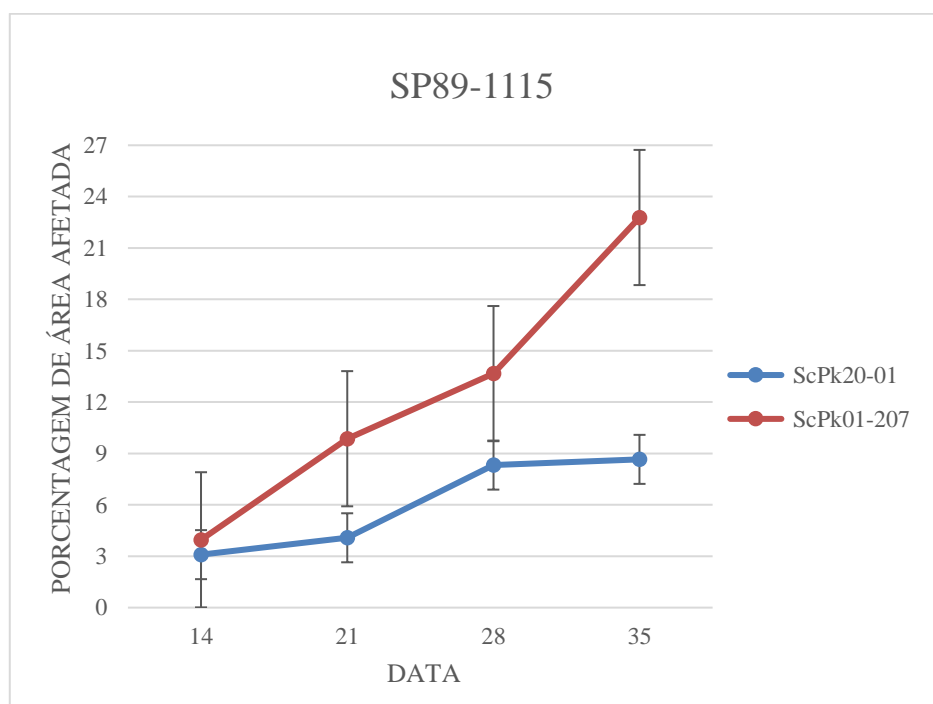
Ao avaliar estatisticamente os resultados, presentes na tabela 3, mostra que na primeira avaliação não houve diferença estatística entre os dois isolados na variedade RB966928, porém a compatibilidade dos dois isolados a variedade foi diferente, apresentando compatibilidade ao isolado ScPk20-01 e incompatibilidade ao isolado ScPk01-207. Já aos 21 dias após a inoculação os resultados mostraram diferença estatística entre os isolados ScPk20-01 e ScPk01-207, o qual obteve-se área foliar afetada, no primeiro ensaio, de 5,246% quando inoculada com o ScPk20-01 e 0,472% no tratamento com o inoculo ScPk01-207, apresentando resultados semelhantes no ensaio 2, com médias de 3,824% (isolado ScPk20-01) e 0,928% (isolado ScPk01-207), o qual mantêm a relação incompatível entre os isolados até os 28 dias após a inoculação. Nas demais avaliações, 28 e 35 dias, os resultados permaneceram apresentando diferença estatística entre os isolados, nos dois ensaios realizados, evidenciando assim diferente comportamento da variedade testada (RB966928) quando inoculada aos diferentes isolados, testada em ambiente controlado.

**Tabela 4.** Porcentagem de área foliar afetada na variedade de cana-de-açúcar SP89-1115, testadas com dois isolados de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliada em diferentes períodos após a inoculação (Ensaio 1 e 2).

Variedade SP89-1115				
Área foliar afetada nos diferentes dias avaliados (%)				
ENSAIO 1				
	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
ScPk20-01	3,09 a	4,078 a	8,324 a	8,858 a
ScPk01-207	3,96 a	9,864 b	13,666 a	22,7825 b
	54,09%	31,59%	28,34%	32,02%
ENSAIO 2				
	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
ScPk20-01	1,844 b	3,52 b	7,06 b	9,882 a
ScPk01-207	8,64 a	9,864 a	14,698 a	17,955 a
CV	41,67%	24,27%	24,95%	36,82%

\*Dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ . Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey 5%.

Os dados presentes nas tabelas 4, de porcentagem de área foliar afetada na variedade SP89-1115 estão demonstrados nas figuras 5, para que haja uma melhor visualização dos resultados.

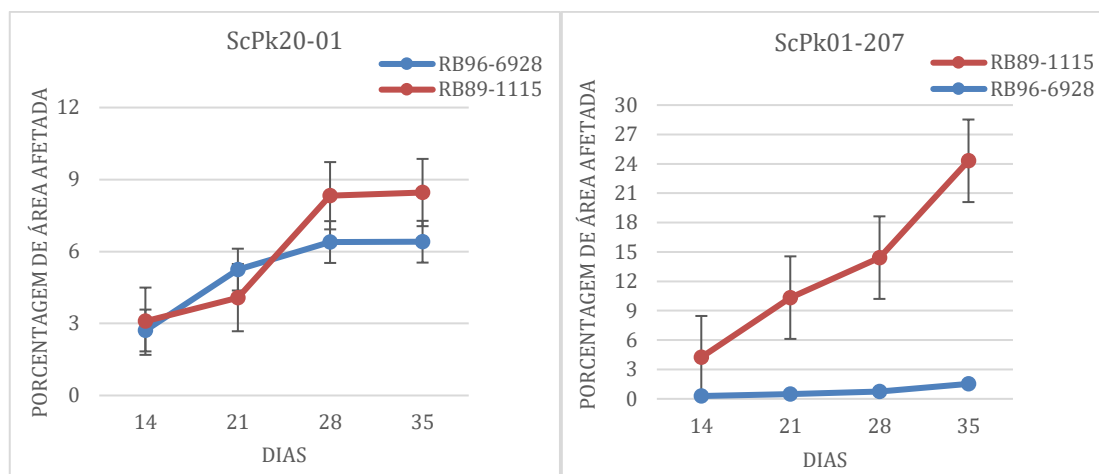


**Figura 5.** Porcentagem de área afetada da variedade RB89-1115 ao isolados ScPk20-01 e ScPk01-207 de *Puccinia kuehnii*, em diferentes períodos de avaliação (14, 21, 28 e 35).

Nos tratamentos com a variedade SP89-1115 ambos os isolados apresentaram a mesma compatibilidade em relação a variedade em todas as avaliações realizadas, apresentando área foliar superior a 1%, portanto relação compatível. Para o primeiro isolado ScPk01-207, a porcentagem de área foliar afetada foi elevada, apresentando aumento da doença conforme as avaliações, começando com 4% aos 14 dias, e chegando a, aproximadamente, 25% na avaliação aos 35 dias, um comportamento comum de uma variedade considerada suscetível (Chapola et al., 2016). Já os resultados do segundo isolado ScPk20-01, apresentou médias de área foliar afetada inferiores ao tratamento anterior, iniciando com 3% aos 14 dias após a inoculação, havendo um aumento gradual da área afetada conforme as avaliações realizadas, chegando a aproximadamente 9% aos 28 dias, havendo uma estabilidade da doença, permanecendo com 8% de área afetada aos 35 dias, comportamento semelhante a reação da variedade RB966928 ao mesmo isolado (ScPk20-01).

Na análise estatística dos dados, tabela 4, no primeiro ensaio na avaliação aos 14 dias, os resultados não apresentaram diferença estatística entre os isolados, apresentando médias de 3,09% no tratamento com o isolado ScPk20-01 e 3,96% no tratamento com o isolado ScPk01-207, porém no ensaio dois já houve diferença entre os isolados desde a primeira avaliação, com médias de 1,844% no tratamento com o isolado ScPk20-01 e 8,64% o tratamento com o isolado ScPk01-207. Nas avaliações subsequentes, ambos os tratamentos apresentaram aumento da doença, porém com diferentes níveis, apresentando diferença estatística na média de área afetada em todos os dias avaliados, 21, 28 e 35 dias, em ambos os ensaios, com ressalva da avaliação aos 28 dias, no ensaio 1. Portanto, mesmo apresentando diferentes porcentagens de área foliar afetada ambos os isolados apresentaram interação compatível em relação a variedade SP89-1115, assim o isolado ScPk01-207 e ScPk20-01 são considerados virulentos a ela, mostrando que a variedade SP89-1115 não pode ser considerada uma variedade diferenciadora para o isolado testado.

Quando avaliamos ambas as variedades com o mesmo isolado, figura 6, podemos observar que as duas variedades RB966928 e SP89-1115 tiveram comportamentos iguais perante o isolado ScPk20-01, e comportamento distintos no tratamento com o isolado ScPk01-207. Evidenciando, assim, a diferença entre os dois isolados o qual o primeiro foi capaz de causar doença na variedade RB966928, assim como causou na variedade suscetível testada, e o segundo isolado não foi capaz de causar ferrugem alaranjada na RB966928, apresentando o comportamento de variedade resistente.



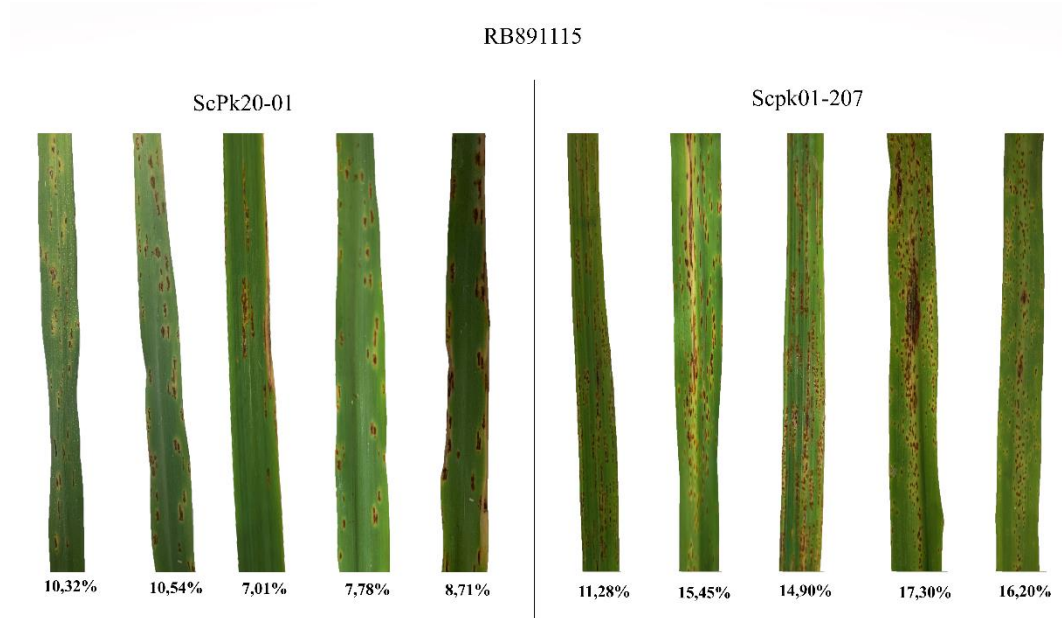
**Figura 6.** Reação das duas variedades RB966928 e SP89-1115 de cana-de-açúcar, inoculadas aos diferentes isolados de *Puccinia kuehni* ScPk20-01 e ScPk01-207, avaliados nos dias 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação

Portanto, ao comparar os dois isolados testados, eles apresentaram diferença na virulência em relação a variedade RB966928, pois o primeiro isolado (ScPk01-207) não causou a doença e o segundo (ScPk20-01) apresentou a doença, com média de área foliar afeada semelhante a de variedades suscetíveis, no caso do trabalho, a SP89-1115.

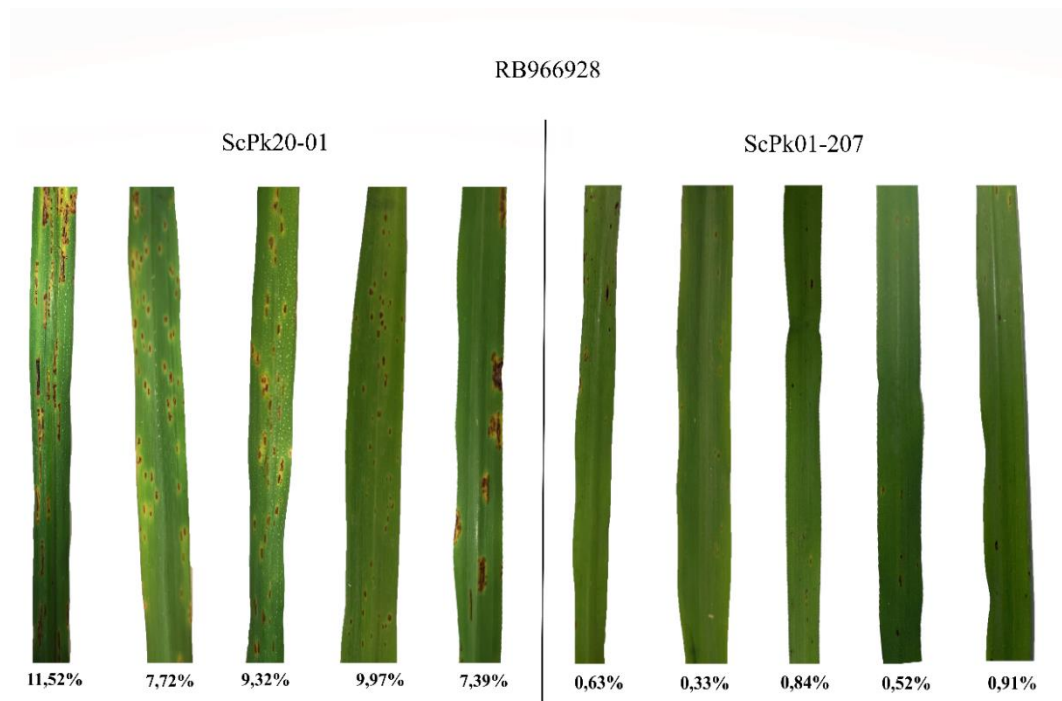
A variedade RB966928 é considerada resistente a ferrugem alaranjada, apresentando médias de severidade da doença em trabalhos realizados por Araujo et al. (2013); Chapola, (2013), de aproximadamente ou igual a zero. No presente trabalho os resultados não foram iguais, ao testar o isolado ScPk20-01 em laboratório, com condições de clima e iluminação controlada, houve a ocorrência da doença, apresentando uma reação igual a variedade SP89-1115, a qual é considerada uma variedade suscetível a ferrugem alaranjada. Porém essa reação foi diferente no tratamento com o isolado ScPk01-207, de origem da UFSCar- Araras, o qual foi testado na mesma época e com as mesmas condições, e apresentou valores de área foliar afetada significativamente menor, próximos de 0 a 1%.

Os resultados obtidos da porcentagem de área foliar afetada avaliada nas diferentes datas, podem ser observados nas figuras 7 e 8, em que exemplifica as diferentes reações da variedade RB966928 perante os isolados testados, com destaque ao isolado ScPk20-01, o qual apresentou ferrugem alaranjada, se mostrando compatível com a variedade.





**Figura 7.** Virulência dos dois diferentes isolados de *Puccinia kuehnii* na variedade SP89-1115, realizado em blocos casualizados, com cinco repetições, em duplicata.



**Figura 8.** Virulência dos dois diferentes isolados de *Puccinia kuehnii* na variedade RB966928, realizado em blocos casualizados, com cinco repetições, em duplicata.

### 5.1.2. Viabilidade dos urediniósporos

O teste de viabilidade realizada durante a inoculação, onde os esporos tiveram origem do campo, apresentaram médias de porcentagem de germinação de aproximadamente 50%, em ambos os ensaios realizados, o qual mostra que os urediniósporos estavam aptos para serem inoculados e realizar o trabalho.

Aos 28 dias foi avaliado a viabilidade das pústulas +3 e +4 que surgiram nas duas variedades inoculadas com os dois isolados distintos, ScPk20-01 e ScPk01-207, e suas médias estão representadas nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5.** Viabilidade dos esporos de origem da variedade RB966928 de cana-de-açúcar, testadas com dois isolados diferentes de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207 (Ensaio 1 e 2).

<b>Viabilidade dos urediniósporos (%)</b>		
<b>Inóculo</b>	<b>RB966928</b>	
	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>
<b>ScPK20-01</b>	43,5 a	22,6 a
<b>ScPk01-207</b>	3,3 b	2,75 b
CV	52,83%	77%

\*Viabilidade: médias em cada coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

O resultado obtido mostra grande diferença de germinação entre os dois isolados das pústulas que originaram na variedade RB966928. No tratamento com o isolado ScPk20-01, a porcentagem de viabilidade dos esporos foi de 43,5% no primeiro ensaio e 22,6% no segundo ensaio, o qual ambos apresentaram diferença estatística a 5% de significância, ao isolado ScPk01-207 de origem da UFSCar Araras. O qual apresentou média de viabilidade significativamente inferior, com 3,3% no ensaio 1 e 2,75% no ensaio 2. Logo evidencia a diferença entre ambos os isolados na variedade RB966928, pois mesmo que no tratamento com o isolado ScPk01-207 surgiu um pequeno número de pústulas esporulantes, elas foram incapazes de germinar, apresentando um comportamento de variedade resistente. Porém com o isolado ScPk20-01, o seu comportamento já foi de variedade suscetível, com alta viabilidade dos urediniósporos, além de apresentar porcentagens de germinação semelhantes da variedade SP89-1115 (tabela 6), o qual é considerada suscetível a ferrugem alaranjada.

**Tabela 6.** Viabilidade dos esporos de origem da variedade SP89-1115 de cana-de-açúcar, testadas com dois isolados de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207 (Ensaio 1 e 2).

<b>Viabilidade dos urediniósporos (%)</b>		
<b>SP89-1115</b>		
<b>Inóculo</b>	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>
<b>ScPk20-01</b>	38,5 a	18,3 a
<b>ScPk01-207</b>	48,1 a	14,9 a
CV	53%	77%

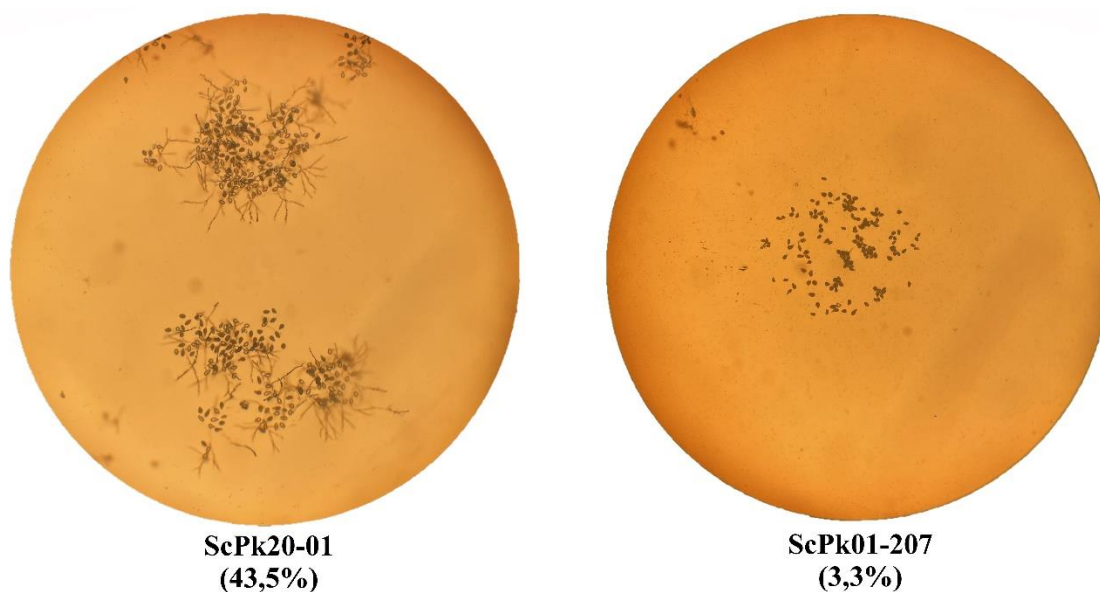
\*Viabilidade: médias em cada coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Já nos tratamentos com a variedade SP89-1115, os valores de germinação de ambos os inóculos não apresentaram diferença estatística a 5% de significância, apresentando germinação de 38,5% no ensaio 1 e 18,3% no ensaio 2 do inóculo ScPk20-01. E para o segundo tratamento, com o inóculo ScPk01-207 apresentou germinação de 48,1% no ensaio 1 e 14,9% no ensaio 2. Assim, reafirma o qual a variedade SP89-1115 não é considerada diferenciadora para o isolado estudado. A duplicata do parâmetro viabilidade apresentou médias inferiores de viabilidade, porém ainda apresentaram as mesmas diferenças estatísticas que o ensaio 1.

A viabilidade de um esporo é um parâmetro o qual pode auxiliar na classificação da resistência de uma variedade, pois em alguns casos há presença de pústulas esporulantes na planta, porém elas não são capazes de germinar, logo não completam o ciclo secundário do patógeno, não causando o aumento da doença em situação de campo. Ademais, uma característica da ferrugem alaranjada é a capacidade de completar o seu ciclo rapidamente, sendo assim necessário o controle da doença por fungicidas, o qual é muito empregado pelo setor. Porém, se os esporos não forem viáveis, esse ciclo é quebrado, e não há a progressão da doença com o tempo.

Como a ferrugem alaranjada é uma doença policíclica, capaz de realizar inúmeros ciclos em um curto período de tempo, assim, quanto mais ciclos secundários o patógeno realizar maior será a fonte de inóculo na área, portanto maior a intensidade da doença (Kranz, 2003). No caso de experimentos com ferrugem alaranjada em ambiente controlado, ocorre apenas um ciclo, pois não há condições propícias para que ocorra a infecção do patógeno na planta, já que no ambiente controlado não há umidade nas folhas devido à falta de molhamento foliar, assim não fornece condições adequadas para que o esporo germine. Por isso a porcentagem de área foliar

afetada não se compara com situações de campo, porém o fato de o esporo ser viável ou não, é um indicador de que haveria ou não o aumento da intensidade da doença em situação de campo.

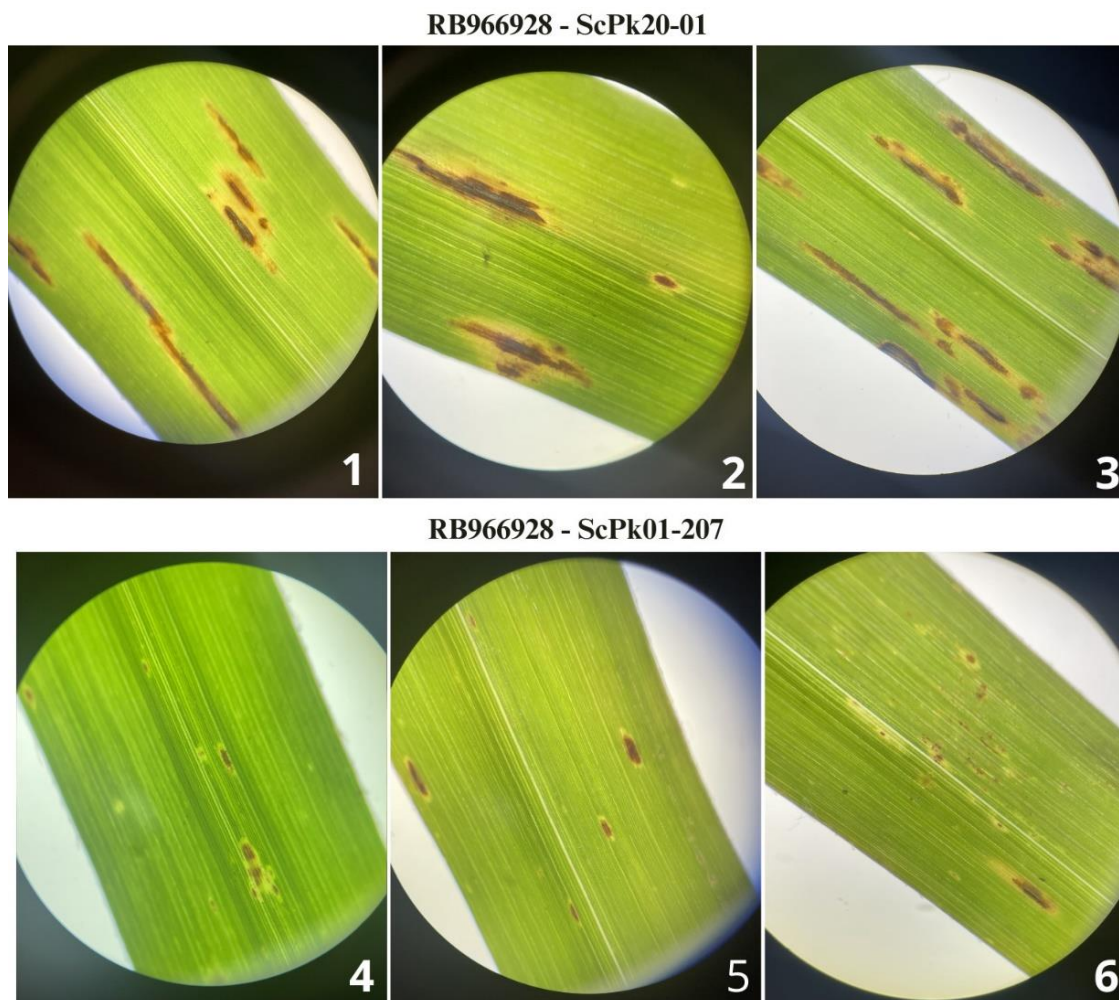


**Figura 9.** Imagem do microscópio óptico, aumento 400x, da avaliação de viabilidade dos urediniósporos (análise aos 28 dias) das pústulas classificadas como +3 e +4, que surgiram na variedade RB966928, inoculadas com os diferentes isolados ScPk20-01 e ScPk01-207.

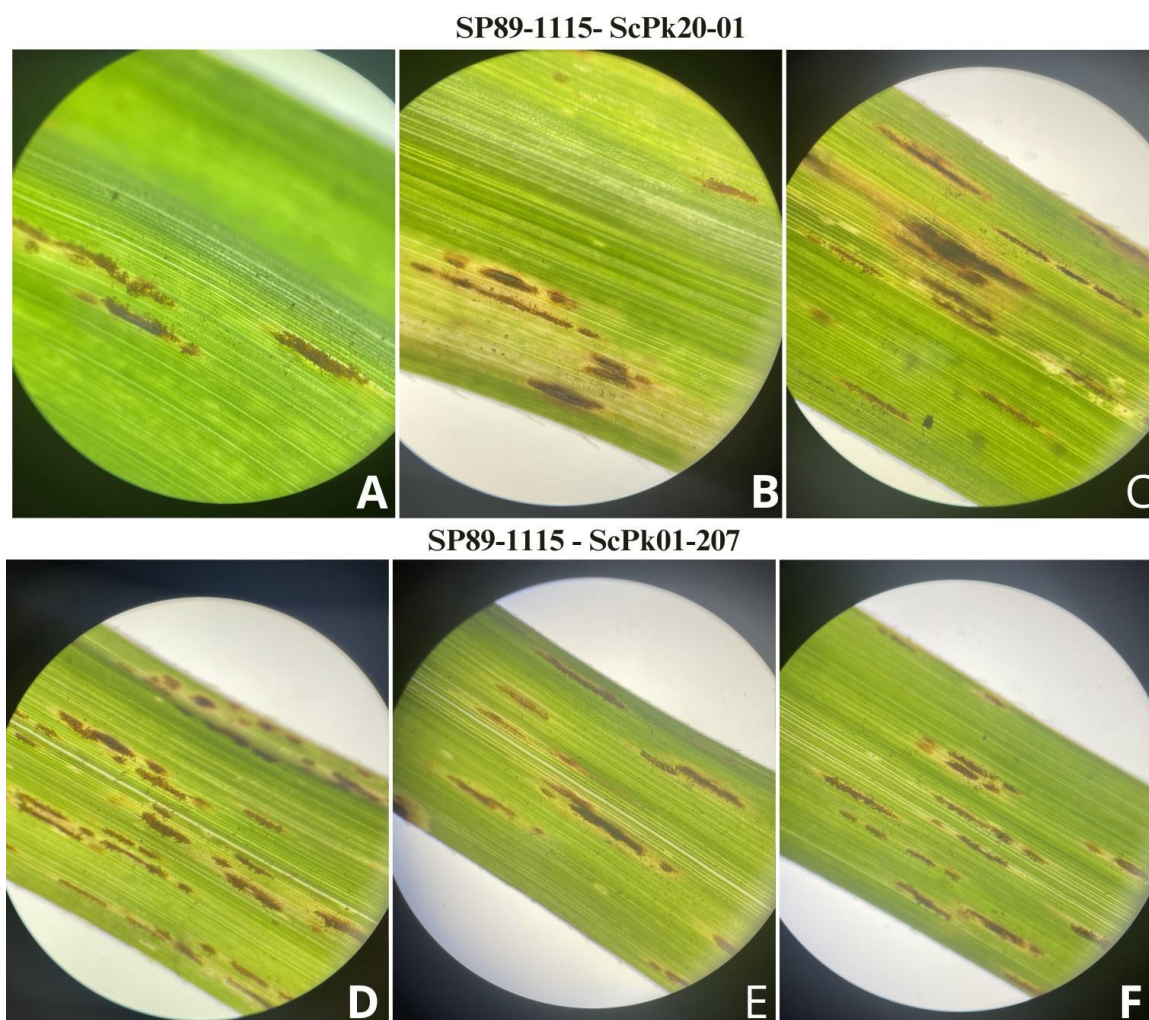
### 5.1.3. Visualização das pústulas aos 28 dias

Aos 28 dias após a inoculação foi visualizada as diferentes pústulas presentes nas variedades (RB966928 e SP89-1115), inoculadas com os diferentes isolados (ScPk20-01 e ScPk01-207), os quais estão presentes nas figuras 10 e 11.

Observa-se que as pústulas que surgiram na variedade RB966928, a partir da inoculação com o isolado ScPk20-01 (imagem 1, 2 e 3), apresentaram notas de +5 e +6, com muita esporulação e grande extensão, o qual não se diferem das pústulas que surgiram na variedade SP89-1115 (imagem A, B e C). Já a variedade RB966928 quando inoculada com o isolado ScPk01-207, de origem da UFSCar, as pústulas que surgiram apresentaram pouco ou quase nenhum esporo, chegando no máximo a nota +3 (imagem 4, 5 e 6), evidenciando a diferença de reação da variedade RB966928 aos diferentes isolados testados no trabalho.



**Figura 10.** Imagem realizada com o auxílio de uma lupa, aos 28 dias após a inoculação. As folhas são dos diferentes tratamentos realizados, ambas da variedade RB966928, sendo 1, 2 e 3 inoculadas com o isolado ScPk20-01 e as 4, 5 e 6 inoculadas com os isolados ScPk01-207.



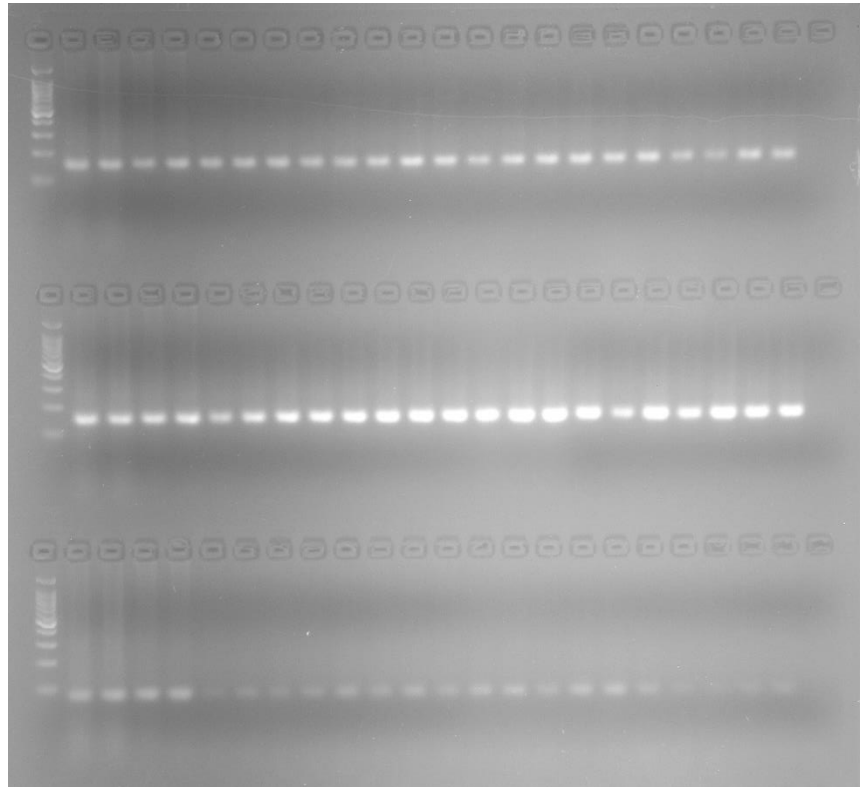
**Figura 11.** Imagem realizada com o auxílio de uma lupa, aos 28 dias após a inoculação. As folhas são dos diferentes tratamentos realizados, ambas da variedade SP89-1115, sendo A, B e C inoculadas com o isolado ScPk20-01 e as D, E e F inoculadas com os isolados ScPK01-207.

## 5.2. II: Análise molecular

A partir dos dados obtidos na primeira parte do trabalho, o qual mostra que os dois isolados testados são diferentes. Foi realizada a segunda parte da pesquisa, avaliando se existe algum SSR (Simple Sequence Repeats) que evidencie a diferença molecular entre os isolados. Para isso, foi realizada a extração de mono-pústula para que houvesse maior confiabilidade nos resultados.

Foram testados 15 primers no presente trabalho, porém nenhum deles foi capaz de identificar variação genética entre os isolados, apresentando fragmentos de mesmo tamanho. Logo os microssatélites já publicados testados no presente trabalho, não possuem condições de diferenciar as duas raças de *P. kuehnii* avaliadas no estudo.

Os marcadores moleculares são uma ferramenta muito importante para identificação de polimorfismo no DNA, evidenciando diversidade genética entre as populações, através de tamanho distintos de fragmentos, podendo ocorrer em nível de qualquer nucleotídeo, gene, cromossomo ou todo o genoma do organismo (Hoshino et al. 2012). Porém, os SSR utilizados no trabalho não foram capazes de identificar diferenças entre isolados de uma mesma espécie a nível de 2 a 8 nucleotídeos, assim seria necessário continuar os estudos utilizando o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), o qual é um marcador mais sensível capaz de identificar diferença em apenas um nucleotídeo do DNA (Glynn et al. 2010).



**Figura 12.** Amplificação do PCR em gel de agarose em 3%, realizado com os primers *NPRL\_PK\_108*, *NPRL\_PK\_135b* e *NPRL\_PK\_382\_spka*, onde os dois isolados de *Puccinia kuehnii*, ScPk20-01 e ScPk01-207 obtiveram a mesma altura e não mostraram diferença a nível molecular com os primers testados.

## 6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi identificada diversidade fenotípica entre os isolados de *P. kuehni* de origem de duas variedades distintas, RB966928 e SP89-1115, e coletados em duas localidades diferentes no estado de São Paulo. Na primeira parte do trabalho, de análise fenotípica, quando a variedade resistente (RB966928) foi inoculada com o isolado ScPk1-207, de origem da variedade suscetível, a reação foi incompatível, apresentando baixa porcentagem de área foliar afetada, e os esporos oriundos de suas pústulas não apresentaram viabilidade, um resultado comum para uma variedade considerada resistente. Entretanto, quando a inoculação foi com o isolado ScPk20-01, de origem da RB966928, houve compatibilidade, havendo porcentagem de área foliar afetada superior a 1%, e os seus esporos eram viáveis, não havendo diferença estatística entre o tratamento com a variedade SP89-1115, considerada suscetível, logo o isolado ScPk20-01 se mostrou virulento em relação a variedade RB966928.

Porém, na segunda parte do trabalho não foi encontrada variação em nível molecular entre os dois isolados, pois os marcadores moleculares microssatélite testados não evidenciaram bandas polimórficas. Para isso seria necessário estender o trabalho e testar outros tipos de microssatélite, utilizando os SNP, o qual avalia a diversidade de patógenos de uma mesma espécie a nível de um nucleotídeo, diferente do utilizado o qual avalia de 2 a 8 nucleotídeos.

Portanto, a partir dos dados coletados no trabalho nas análises fenotípicas, foi possível identificar uma nova raça de *P. kuehni*, com diferente virulência em relação a variedade RB966928, o qual foi capaz de causar ferrugem alaranjada, e havia perspectiva de ocorrer o aumento da doença em condições de campo, já que os seus esporos apresentaram viabilidade. Portanto, a variedade RB966928 pode ser considerada diferenciadora para essa raça de *P. kuehni*, o qual evidenciou a diferença de virulência entre os dois isolados.

Além disso, podemos concluir as datas ideais para avaliar raça fisiológica de *P. kuehni* é até aos 28 dias, pois ao levar em consideração apenas a área foliar afetada avaliada aos 35 dias o isolado ScPk01-207 apresentou porcentagem de área foliar afetada maior que 1%, o qual é considerada interação compatível. Entretanto, esse não seria um dado verdadeiro, já que a porcentagem de área afetada não chegou aos 1,5% devido ao número de pústula, mas sim pela coalescência das existentes.



Atualmente, a variedade RB966928 é considerada resistente a ferrugem alaranjada, o qual já foi testada em trabalhos anteriores, apresentando incompatibilidade com a doença (Araujo et al., 2013; Chapola, 2013). Porém, já foi relatado em trabalho realizado por Urashima et al. (2020) que de 25 inoculações realizadas a partir de pústulas individualizadas, uma apresentou compatibilidade com a variedade, o qual já evidenciava que dentro da população de *P. kuehni* há subpopulações que são capazes de causar doença na variedade RB966928.

A existência de raças dentro da população de *P. kuehni* é um dos principais motivos de quebra de resistência de variedades antes consideradas resistentes (Prasad et al., 2017). Como há suposições de ter ocorrido na Austrália no ano de 2000 (Magarey et al., 2001), e na Florida onde houve quebra de resistência de muitas variedades comerciais, antes consideradas resistentes, em poucos anos (Rott et al. 2016). Por isso, a determinação se um isolado é virulento ou agressivo é de suma importância para que haja o manejo varietal adequado, pois genótipos agressivos ocorrem exclusivamente devido a condições do ambiente, condições atípicas de clima que favorecem a doença no campo, como tempo de molhamento foliar, temperatura ideal, e umidade relativa do ar. Já genótipos virulentos eles possuem a capacidade genética de causar doença na variedade, e são responsáveis epidemias de doenças no setor (Kover, 1998).

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos pelos diferentes parâmetros avaliados, conclui-se que o isolado ScPk20-01 pode ser considerado uma raça fisiológica diferente de *P. kuehni*, o qual é virulento à variedade RB966928, se mostrando capaz de causar ferrugem alaranjada na variedade.

Na análise molecular, não foi encontrado variação genética entre os isolados com os primers testados no presente trabalho, apresentando fragmentos do mesmo tamanho.

## 8. REFERÊNCIAS

ALVES, Thales Cassemiro et al. Fungicide application technology for controlling the sugarcane orange rust. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 49, 2019.

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 (*Pucciniamelanocephala*). *Boletim Técnico Copersucar*, São Paulo, v.39, p.13-16, 1987

AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) Manual de fitopatologia, 4 ed. v1: princípios e conceitos. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

ARAÚJO, Kelly Lana et al. Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, v. 39, p. 271-274, 2013.

BARBASSO, D. et al. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. *Plant Disease*, v. 94, n. 9, p. 1170-1170, 2010.

Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2021/22 Rubens Leite do Canto Braga Junior, Marcos Guimarães de Andrade Landell, Mauro Alexandre Xavier, et al. Campinas: Instituto Agronômico, 2023. 56p. (Série Tecnologia APTA. Boletim Técnico IAC, 230). Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/media/publicacoes/iacbt230.pdf>.

CHAPOLA, Roberto G.; HOFFMANN, Hermann P.; MASSOLA, Nelson S. Reaction of sugarcane varieties to orange rust (*Puccinia kuehnii*) and methods for rapid identification of resistant genotypes. *Tropical Plant Pathology*, v. 41, p. 139-146, 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTCIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 11, n. 2, agosto, 2023. Balanço Energético Nacional 2023: Ano base 2022 / Empresa de Pesquisa Energética. – Rio de Janeiro: EPE, 2023. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dadosabertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2023>

FERRARI, J. T.; HAKAKAVA, R.; DOMINGUES, R. J.; TERÇARIOL, I. M. L. Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. Documento Técnico 005. 2010. P. 1-8. Shahin, A.A. Occurrence

of new races and virulence changes of the wheat rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) in Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53, 552-569. 2020.

GLYNN, N. C. et al. PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehnii* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical distribution in *P. kuehnii*. *Plant Pathology*, v. 59, n. 4, p. 703-711, 2010.

HOSHINO, A. A., Bravo, J. P., Nobile, P. M. N., and Morelli, K. A. "Microsatellites as tools for genetic diversity analysis," in *Genetic Diversity in Microorganisms*, ed. M. Caliskan. 2012.

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.

KOVER, Paula X.; CLAY, Keith. Trade-off between virulence and vertical transmission and the maintenance of a virulent plant pathogen. *The American Naturalist*, v. 152, n. 2, p. 165-175, 1998.

KRANZ, Jürgen. **Comparative epidemiology of plant diseases**. New York: Springer, 2003.

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.

CHAULAGAIN, Bhim et al. Application timing of fungicides for the management of sugarcane orange rust. *Crop Protection*, v. 119, p. 141-146, 2019.

MAGAREY, R.C.; Neilsen, W.A.; Magnanini, A.J. Environmental requirements for spore germination in the three sugarcane leaf pathogens. In: Conference of the Australasian Society of Sugar Cane Technologists held at Brisbane, Queensland, 2004. p. 1-7.

MARRA, L. A. F.; MIYAMOTO, B. C. B.; SILVA JUNIOR, J. J. da. Acordo de Paris e a política nacional de biocombustíveis: estimativa da receita gerada na agroindústria da cana com a comercialização de créditos de descarbonização. *Revista Terceira Margem Amazônia*, v. 7, n. 17, p. 93-109, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.36882/2525-4812.2021v7i17.p93-109>

MEINHARDT, L.W., WULFF, N.A., BELLATO, C.M. & TSAI, S.M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27:211-215. 2002.

MOREIRA, A. S. et al. Pathogenic and molecular comparison of *Puccinia kuehnii* isolates and reactions of sugarcane varieties to orange rust. *Plant Pathology*, v. 67, n. 8, p. 1687-1696, 2018.

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.

PEIXOTO-JUNIOR, Rafael Fávero et al. Genetic diversity among *Puccinia melanocephala* isolates from Brazil assessed using simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 13, n. 3, p. 7852-7863, 2014.

PRASAD, P., Bhardwaj, S. C., Gangwar, O. P., Kumar, S., Khan, H., Kumar, K., ... Sharma, T. R. Population differentiation of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in South Asia. *Current Science*, 112, 2073–2084. 2017.

ROTT PC, Kaye C, Naranjo M, Shine JM Jr, Sood S, Comstock JC, Raid RN (2016) Controlling sugarcane diseases in Florida: a challenge in constant evolution. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol* 29:595–600

SANJEL, Santosh et al. Occurrence of two races of *Puccinia kuehnii* causing orange rust of sugarcane in Florida. **Plant Pathology**, v. 70, n. 7, p. 1616-1625, 2021.

SHINE JR, J. M.; COMSTOCK, J. C.; DEAN, J. L. Comparison of five isolates of sugarcane rust and differential reaction on six sugarcane clones. In: **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** 2005. p. 638-647.

SHINE, M. S. Jr, Comstock, J. C., & Dean, J. L. (2005). Comparison of five isolates of sugarcane brown rust and differential reaction on six sugarcane clones. *Proceedings of International Society Sugar Cane Technology*, 25, 638–646.

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.

URASHIMA, A.S.; Mistura, T.F.; Porto, L.N.R. Como avaliar reação de variedades de cana-deaçúcar à *Puccinia kuehnii*? *Summa Phytopathologica*, v.45, n.4, p.387-392, 2019.

URASHIMA, Alfredo S. et al. Effect of pathogen concentrations and period of leaf wetness on orange rust severity in Brazilian sugarcane cultivars. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, p. 506-513, 2018.

URASHIMA, Alfredo Seiti et al. Genetic diversity of *Puccinia kuehnii*, the causal agent of orange rust of sugarcane, from Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 168, n. 10, p. 581-590, 2020.

VINCHI, Rodrigo Rodrigues. Incidência e impactos da ferrugem alaranjada – Raízen. *Revista STAB*. 2013. Disponível em: [http://www.stab.org.br/sem\\_agroind\\_stab\\_2013/incidencia\\_impactos\\_ferrugem\\_alaranjada\\_unidades\\_raizen.pdf](http://www.stab.org.br/sem_agroind_stab_2013/incidencia_impactos_ferrugem_alaranjada_unidades_raizen.pdf).

ZHAO, Duli et al. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease*, v. 95, n. 6, p. 640-647, 2011.

ZUZA, Joedes Luiz Marques Ferreira; BORSATO, Jaluza Maria Silva Lima. Análise de perdas agrícolas e econômicas ocasionada pela doença ferrugem alaranjada em canaviais comerciais de uma empresa de bioenergia no interior de São Paulo. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Custos-ABC*. 2013