Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal

Alécio Souza Moreira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

Alécio Souza Moreira
Engenheiro Agrônomo

Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal

Orientador:
Prof. Dr. **ARMANDO BERGAMIN FILHO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2013

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

Moreira, Alécio Souza
Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal / Alécio Souza Moreira.- - Piracicaba, 2013.
87 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. *Saccharum* sp. 2. *Puccinia kuehnii* 3. Diversidade genética 4. Variabilidade patogênica 5. Raça 6. Agressividade I. Título

CDD 633.61
M838f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Àqueles que são a minha fonte de vida:

pais: Claudio e Cledna

irmãos: Alessandra e André

tia Ana Valéria

avós José Vitor, Silvana, 'Nina' e Custódio (in memoriam)

madrinha Cidinha

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os dias vividos com saúde e paz que possibilitaram o cumprimento de mais uma missão.

Ao professor Dr. Armando Bergamin Filho pela valiosa oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos e ajuda ao longo dos anos de mestrado e doutorado.

À pesquisadora Dra. Cassiara Regina Noventa Correa Bueno Gonçalves pelo apoio e colaboração direta e essencial no trabalho realizado, principalmente pelos ensinamentos e auxílio com as análises moleculares.

Ao pesquisador Eng. Agrônomo Adhair Ricci Junior pela valiosa contribuição na definição dos locais de coletas de esporos e contatos com a equipe 'Muda Sadia' do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pela concessão de variedades de cana-de-açúcar e colaboração imprescindível para conclusão da tese.

Ao Msc. Roberto Giacomini Chapola, do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/UFSCAR), pela colaboração com variedades de cana-de-açúcar e populações de *P. kuehnii*.

Ao Eng. Agrônomo Rafael Voss, pela importante contribuição com informações de campo sobre a ferrugem alaranjada ao longo do doutorado.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, em especial ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pela oportunidade de cursar o doutorado e ao CNPq pela bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia pela dedicação e empenho em transmitir os conhecimentos ao longo das disciplinas e pela excelente contribuição na minha formação profissional.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia: Sílvia Lourenço, Fernanda Groppo, José Rodolfo Groppo, Dra. Maria Heloísa Duarte, Fabiana Nunes, Jeferson Brajão, Dra. Liliane Teixeira, Vera Durrer (*in memoriam*), José Edivaldo Buriola e Pedro Arthuso, pela colaboração nos momentos necessários.

Aos funcionários do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC): Dr. Enrico Arigoni, Noemia Souza, Isabela Ascencio, Fabiana Almeida, Deodato e Sidney pela ajuda ao longo do trabalho.

Aos funcionários do programa “Muda Sadia” do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC): Fernando Pattaro, William Arnt, Joedes Zuza e Rodrigo Mahlmann de Almeida, pela importante ajuda na coleta das populações de *Puccinia kuehnii*.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Epidemiologia, Dra. Maria Cândida Gasparoto, Msc. Juliana Baggio, Dr. Ana Raquel Soares, Eng. Agr. Paula Panosso, Dra. Caroline Rabelo, Eng. Agr. Isabela Primiano, Msc. Juan Edwards, pelo apoio e amizade. Em especial aos amigos Msc. Antônio Nogueira Jr e Msc. Guilherme Frare pelo apoio e as discussões envolvendo as análises moleculares. Aos estagiários do Laboratório de Epidemiologia Pedro Gava e André Bueno, pela ajuda nos experimentos.

Aos demais colegas da Pós-Graduação em Fitopatologia, pela amizade.

Aos pesquisadores Dr. Geraldo Silva Júnior, Dr. Fabrício Packer, Prof. Dr. Júlio Cesar Barbosa e Prof. Dr. Marcel Spósito, pela grande amizade.

Ao Prof. Antônio Bianchi pela revisão do *abstract*.

Aos colegas de república Eng. Agr. Antônio Delgado, Msc. Mauro Bonfim e Msc. Daniel Chiaradia, pelo bom convívio e amizade.

À tia e pesquisadora Dr. Ana Valéria Vieira de Souza e ao Prof. Dr. Flávio Oliveira, pela amizade, apoio e incentivo constante.

Aos pesquisadores Dr. Jadir Borges Pinheiro, Dr. Eudes Arruda Carvalho e Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, pela amizade e por muito contribuírem para a minha formação durante a iniciação científica na Universidade Federal de Lavras.

A todos, que de alguma forma contribuíram para o cumprimento deste trabalho, MUITO OBRIGADO !

"It is through science that we prove, but through intuition that we discover."

Jules Henri Poincare

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 DESENVOLVIMENTO 17
2.1 Revisão bibliográfica 17
2.1.1 A recente expansão da cana-de-açúcar no Brasil.....17
2.1.2 Doenças em cana-de-açúcar no Brasil: problema histórico ou pequeno incômodo?.....19
2.1.3 *Puccinia kuehnii*: recente disseminação no mundo e detecção no Brasil 22
2.1.4 Novas raças de *Puccinia kuehnii*: breve análise histórica do risco.....23
2.1.5 Manejo da ferrugem alaranjada.....25
2.2 Material e Métodos.....26
2.2.1 Localização dos experimentos 26
2.2.2 Coleta das populações de *P. kuehnii* 26
2.2.3 Seleção e cultivo das variedades de cana-de-açúcar 27
2.2.4 Preparo do inóculo e inoculação das variedades de cana-de-açúcar 28
2.2.5 Avaliação da doença 30
2.2.6 Caracterização e análise da diversidade genética de *P. kuehnii*.....30
2.2.6.1 Extração de DNA.....31
2.2.6.2 Reação de PCR 31
2.2.6.3 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas.....32
2.2.7 Análise dos dados 36
2.2.7.1 Períodos de incubação e latência, severidade, número total de pústulas e porcentagem de pústulas abertas 36
2.3 Resultados 36
2.3.1 Período de incubação.....36
2.3.2 Período de latência 38
2.3.3 Severidade da ferrugem alaranjada 39
2.3.4 Número total de pústulas.....41
2.3.5 Porcentagem de pústulas abertas (%PA).....46
2.3.6 Diversidade genética entre as populações de *P. kuehnii* 52
2.4 Discussão.....55

3 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS 65
APÊNDICES 75
ANEXOS 81

RESUMO

Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil: estudo de populações do patógeno e comportamento varietal

A ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, apesar de ser centenária, foi detectada no Brasil apenas no final de 2009, após causar uma grande epidemia na Austrália em 2000. Pela recente detecção, não há estudos que comparam as populações brasileiras de *P. kuehnii* e a reação, em condições controladas, de importantes variedades de cana-de-açúcar ao patógeno. Assim, este trabalho analisou e comparou o comportamento de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com seis diferentes populações de *P. kuehnii* coletadas em diferentes locais no Brasil, além de verificar a variabilidade patogênica e genética destas populações. Para isso, inoculou-se populações de *P. kuehnii* coletadas em Piracicaba (SP), Araras (SP), Ribeirão Preto (SP), Paranacity (PR), Nova Alvorada do Sul (MS) e Dourados (MS). As variedades de cana-de-açúcar utilizadas foram: SP89-1115, SP81-3250, RB85-5156, RB86-7515, RB92-5211, RB96-6928, CTC 3, CTC 6, CTC 8, CTC 9, CTC 13, CTC 15 e CTC 18. Em todas as inoculações avaliaram-se os períodos de incubação e de latência da doença, a severidade, o número total de pústulas e a porcentagem de pústulas abertas. Além disso, as regiões ITS e IGS de todas as populações de *P. kuehnii* foram sequenciadas e comparadas entre si e com sequências do patógeno da Austrália, Papua Nova Guiné, Indonésia, Filipinas, Japão, China, Guatemala, Panamá, Jamaica, Costa Rica, Nicaraguá, México e Estados Unidos. Os resultados mostraram que a porcentagem de pústulas abertas é o melhor parâmetro para separar e classificar as variedades de cana-de-açúcar quanto ao grau de resistência ao patógeno. O período de incubação da doença variou de 7 a 10 dias e o período de latência, de 9 a 19 dias. As populações de *P. kuehnii* não constituem diferentes raças virulentas e a população coletada em Araras (SP) é uma raça mais agressiva do patógeno. Para as regiões IGS e ITS, as seis populações de *P. kuehnii* utilizadas apresentam sequências idênticas entre si e entre todas as sequências de *P. kuehnii* do continente americano depositadas no 'GenBank'. Para estas duas regiões, as populações utilizadas no trabalho diferem de sequências da Austrália, China, Filipinas, Havaí (EUA), Indonésia, Japão, Papua Nova Guiné e Samoa. A disseminação do patógeno além da Ásia e Austrália parece ter ocorrido após a epidemia da doença na Austrália em 2000. No entanto ainda não se sabe ao certo como o patógeno teria chegado à América em 2007 e à África em 2011.

Palavras-chave: *Saccharum* sp.; *Puccinia kuehnii*; Diversidade genética; Variabilidade patogênica; Raça; Agressividade

ABSTRACT

Sugarcane Orange rust in Brazil: a study on pathogen populations and varietal behavior

Despite being a century disease, sugarcane orange rust, caused by the *Puccinia kuehnii*, was only reported in 2009 Brazil, after having caused an epidemic in Australia in 2000. Because it was recently detected in Brazil, there are no studies that compare *P. kuehnii* populations in Brazil and the reaction, under controlled conditions, of important sugarcane varieties to the pathogen. This study compared the performance of sugarcane varieties inoculated with six different populations of *P. kuehnii* collected in different sites in Brazil. We also studied the pathogenic and genetic variability of these pathogens populations. In order to carry out this study, *P. kuehnii* populations were collected in the municipalities of Piracicaba (SP), Araras (SP), Ribeirao Preto (SP), Paranacity (PR), Nova Alvorada do Sul (MS), and Dourados (MS). The sugarcane varieties used were: SP89-1115, SP81-3250, RB85-5156, RB86-7515, RB92-5211 RB96-6928, CTC 3, CTC 6, CTC 8, CTC 9, CTC 13, CTC 15, and CTC 18. For all inoculations, we evaluated the incubation period, latent period, disease severity, total number of pustules, and percentage of open pustules. Furthermore, the ITS and IGS rDNA regions of all *P. kuehnii* populations were sequenced and compared with sequences from Australia, China, Costa Rica, Guatemala, Indonesia, Jamaica, Japan, Mexico, Nicaragua, Papua New Guinea, the Philippines, Panama, and the United States. The results showed that the percentage of open pustules is the best parameter to separate and classify the resistance of sugarcane varieties to the pathogen. The incubation period of the disease ranged from 7 to 10 days and the latent period from 9 to 19 days. There are no *P. kuhenii* virulent races and the population collected in Araras (SP) is a more aggressive race. For the IGS and ITS regions, the six *P. kuehnii* populations have identical sequences which were identical to all *P. kuehnii* sequences found in the American continent deposited at the GenBank accession. The *P. kuehnii* used in this study is different from populations found in Australia, China, Hawaii (USA), Indonesia, Japan, Papua New Guinea, the Philippines, and Samoa. The pathogen dissemination over Asia and Australia seems have occurred after the 2000 epidemic in Australia. However, it is unknown still how the pathogen reached America in 2007 and Africa in 2011.

Keywords: *Saccharum* sp.; *Puccinia kuehnii*; Genetic diversity; Pathogenic variability; Races; Aggressiveness

1 INTRODUÇÃO

Com uma produção aproximada de 561 milhões de toneladas em quase 9 milhões de hectares plantados na safra 2011/2012 (IBGE 2012; MAPA, 2012) a cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque no agronegócio brasileiro desde o início da primeira década do século XX. O reflexo do aumento na produção se mostra na crescente oferta e demanda mundial pelos produtos derivados, principalmente o açúcar e o etanol.

Um dos aspectos que corre na contramão deste crescente ritmo corresponde aos problemas fitossanitários que ocorrem na cultura. Assim foi no passado, quando ocorreram as epidemias do mosaico comum (doença virótica causada pelo potyvirus *Sugarcane mosaic virus*) em 1925, carvão (doença fúngica causado por *Sporisorium scitamineum*) em 1950 e 1975, amarelinho (doença virótica causado por *Sugarcane yellow leaf virus*) em 1980 e ferrugem marrom (doença fúngica causada por *Puccinia melanocephala*) em 1986 (TOKESHI; RAGO, 2005). Mais recentemente, em 2009, o parque canavieiro do País defrontou-se com os primeiros registros da ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler, até então relatada somente nas Américas Central (OVALLE et al., 2008) e do Norte (COMSTOCK et al., 2008), Ásia e Austrália (RYAN; EGAN, 1989).

Apesar da constante busca por variedades resistentes à ferrugem alaranjada nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, como sempre se fez com êxito no manejo das outras doenças que causaram epidemias na cultura, a situação atual ainda é de risco devido ao fato de importantes variedades cultivadas terem se apresentado como suscetíveis ou intermediárias ao patógeno. Somado a isto, variedades rotuladas como intermediárias e até mesmo resistentes podem apresentar-se suscetíveis no futuro, em razão do surgimento de novas raças. Processo este que é relativamente frequente nos fungos causadores de ferrugens (TAYLOR, 1992). Tal fato, se levado em consideração, aumenta o risco de uma epidemia de ferrugem alaranjada no Brasil.

Como a detecção do patógeno no Brasil é recente, poucas informações estão disponíveis a respeito do comportamento epidemiológico da doença nas regiões produtoras, dos reais danos causados, das formas de manejo, das aplicações de fungicida e principalmente, da reação ao patógeno das principais variedades de cana-de-açúcar plantadas no País e a variabilidade genética e patogênica das

diferentes populações de *P. kuehnii* das principais regiões produtoras. Assim, pela necessidade de se obter melhores informações sobre a doença no Brasil e os reais riscos de uma futura epidemia, objetivou-se com este estudo caracterizar e analisar a diversidade patogênica e genética das populações de *P. kuehnii* provenientes de diferentes regiões canavieiras no Brasil e identificar a presença de possíveis raças, além de verificar a reação das principais variedades de cana-de-açúcar às diferentes populações do patógeno e encontrar os melhores parâmetros para separar as variedades de cana-de-açúcar quanto ao grau de resistência a *P. kuehnii*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A recente expansão da cana-de-açúcar no Brasil

Originária de Nova Guiné (Oceania), a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) foi levada e cultivada no sul do Ásia com o propósito inicial de ser utilizada para produção de xarope. A primeira evidência de seu uso para produção de açúcar cristalizado vem do ano 500 na Pérsia (MOZAMBANI et al., 2006). Após se difundir pelos continentes africano, asiático e europeu (sem muito sucesso), a cultura desembarcou na América com Cristovão Colombo e chegou ao Brasil no final do século XV (MOZAMBANI et al., 2006). Durante os anos de desenvolvimento do País, a cultura se difundiu por diversas regiões brasileiras, concentrando-se na região Centro-sul, composta pelos estados da região Sudeste, Centro-oeste e Sul.

A produção mundial de cana-de-açúcar é assegurada por quatro países: Brasil, Índia, China e Tailândia (FAO, 2010). A liderança mundial na produção pertence ao Brasil (FAO, 2010), o que faz a cana-de-açúcar ser considerada um dos principais produtos do agronegócio brasileiro. Tal fato reflete a expansão da cultura empreendida a partir da segunda metade do século XX, principalmente após a implantação do programa PROÁLCOOL em 1975 e do aumento na demanda por etanol em função do crescimento da frota de veículos leves bicombustíveis. Além disso, este importante produto da cana-de-açúcar valorizou-se ainda mais por ser considerado uma alternativa energética renovável que polui menos (ORTOLAN, 2006).

A produção de etanol no Brasil começou na década de 1930, impulsionada por leis federais que obrigavam o acréscimo de 5% e 10% deste combustível em todo petróleo importado e carros pertencentes ao governo, respectivamente (NEVES et al., 2011). Mas foi somente a partir da década de 1970 que a produção de etanol no Brasil aumentou significativamente e o País deixou de consumir combustíveis oriundos em sua maioria do exterior, o que representava até então 77% do consumo (NEVES et al., 2011).

Somando-se à oferta de etanol, o País é também o maior produtor mundial de açúcar há mais de quatro séculos, com exceção ao século XIX, marcado por uma crise no setor (UNICA, 2012). A produção brasileira de açúcar representa mais de

46% da oferta mundial e tem apresentado contínuo crescimento nos últimos vinte anos. Da década de 1970 até a primeira década do século XXI, a produção brasileira de açúcar cresceu 577% (NEVES et al., 2011).

Para manter a crescente oferta de etanol, açúcar e outros subprodutos, o setor canavieiro brasileiro precisou se modernizar, expandir a área plantada com cana-de-açúcar e, principalmente, aumentar a produtividade (DIEESE, 2007). Em apenas seis anos a produção brasileira de cana-de-açúcar passou de 386 milhões de toneladas, colhidas em quase 5,9 milhões de hectares em 2005/06, para 561 milhões de toneladas colhidas em 8,3 milhões de hectares na safra 2011/12 (MAPA, 2012). Como consequência desse aumento na produção de cana-de-açúcar, a oferta de etanol e açúcar também alcançou maiores níveis, tendo saltado dos respectivos 17 bilhões de litros e 26,7 milhões de toneladas produzidas em 2005/06 para 22,7 bilhões de litros e 36,1 milhões de toneladas produzidas em 2011/12 (MAPA, 2012).

A região sudeste responde pela maior produção e área colhida no País. Quase 65% das 657,2 milhões de toneladas produzidas no País em 2012 foram produzidas nessa região. A maior contribuição é do Estado de São Paulo, com 339,3 das 422,3 milhões toneladas produzidas na região sudeste (IBGE, 2012). A expansão, em área e produção, também ocorre nas demais regiões brasileiras. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (dados de 2012), Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e Mato Grosso são, nessa ordem, os estados que tiveram maior expansão em área cultivada com cana-de-açúcar. Ainda segundo o levantamento da Conab, nas regiões norte e nordeste o aumento na área cultivada foi de 1,9% na safra 2011/2012 em comparação com a safra anterior. No entanto, a região sudeste, além de possuir a maior área plantada, possui também a maior expansão quando comparada às demais regiões produtoras do País. Nesta mesma safra 2011/2012, de toda nova área agregada com cana-de-açúcar, 38,04% ocorreram na região Sudeste (CONAB, 2012).

Para continuar a expansão e atender toda a demanda pelos produtos derivados da cana-de-açúcar, o setor canavieiro precisa amenizar e/ou eliminar os principais fatores que provocam quedas na produção e principalmente na produtividade dos canaviais, como os problemas fitossanitários que frequentemente perturbam o sistema. Estes, nos quais está incluída a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, foram responsáveis por 2% dos 18% que representaram a queda na

produtividade entre os anos de 2010 e 2011 (UNICA, 2012), fato que pode se repetir nos próximos anos.

2.1.2 Doenças em cana-de-açúcar no Brasil: problema histórico ou pequeno incômodo?

Na maioria das espécies de plantas cultivadas intensivamente em todo o mundo, as doenças frequentemente provocam significativas perdas, oriundas de importantes epidemias. Na cana-de-açúcar mais de duzentas doenças já foram descritas, das quais mais de 50 já foram relatadas no Brasil (ROSSETTO; SANTIAGO, 1994). No entanto, como mencionado por Orlando Filho, Macedo e Tokeshi (1994), tradicionalmente os produtores desconhecem em muitos casos o valor e o impacto das doenças na cultura da cana-de-açúcar porque, na maioria das vezes, o controle já está embutido nas características agronômicas da variedade. Porém, isto não reduz a importância das doenças, pois basta uma expansão no cultivo de uma variedade suscetível a uma determinada doença ou uma quebra de resistência em uma variedade amplamente cultivada para que a doença se manifeste de forma mais intensa, provocando perdas econômicas (ORLANDO FILHO; MACEDO, TOKESHI, 1994). A relativa ‘despreocupação’ dos produtores com as doenças incidentes sobre a cana-de-açúcar torna-se mais evidente quando se compara com outras culturas como citros, tomate, batata, entre outras espécies cultivadas.

Em contrapartida, a real importância das doenças na cultura é facilmente detectada ao se realizar um levantamento do histórico de algumas enfermidades que incidiram e incidem na cultura. Percebe-se que a ocorrência de epidemias não é incomum (TOKESHI; RAGO, 2005). Aqui vale lembrar o conceito de epidemia definido por Madden et al. (2007): “Epidemia corresponde ao aumento da intensidade da doença em uma dada população hospedeira ao longo do tempo e espaço”.

Já no início do século XX no Brasil, uma primeira epidemia assolou a cultura: o mosaico comum, causado pelo vírus *Sugarcane mosaic virus* - SMV. Na década de 1920 foram registradas reduções de 46% a 86% na produção de *Saccharum officinarum*, na época conhecida como cana “nobre” devido às suas características, altamente suscetível ao vírus (TOKESHI; RAGO, 2005). Tal fato dizimou o cultivo das variedades suscetíveis que ocupavam a maioria dos canaviais brasileiros. Já

naquela época utilizaram-se um dos melhores métodos de controle de doenças em plantas (CAMARGO, 2011), especialmente para ferrugens (STAPLES, 2000), hoje amplamente difundido na cultura da cana-de-açúcar: o uso de variedades resistentes. Em 1930, 90% dos canaviais paulistas já estavam ocupados com variedades resistentes. A equivocada idéia de que a doença teria sido erradicada fez com que produtores voltassem a plantar variedades suscetíveis nos anos que se seguiram nessa década, provocando novas epidemias (TOKESHI; RAGO, 2005). Se compararmos com outros patossistemas, esta epidemia por si só já seria suficiente para refutar qualquer mito sobre a irrelevância das doenças na cultura.

Aproximadamente 30 anos mais tarde, em meados do século passado, uma nova epidemia agora envolvendo o fungo *Sporisorium scitamineum* (syn. *Ustilago scitaminea*), novamente expôs o setor canavieiro ao risco de sofrer significativas perdas. As variedades POJ36 e POJ213, as mais plantadas na época, eram altamente suscetíveis ao patógeno. Talhões dessas variedades apresentaram 100% de touceiras doentes. A mesma medida adotada para o controle do mosaico foi implantada com êxito e a doença foi controlada (BERGAMIN FILHO; AMORIM; REZENDE, 2011). No entanto, nas décadas de 1970 e 1980, no auge do programa governamental PROALCOOL que incentivou o cultivo de cana-de-açúcar no País, a mesma reincidência do mosaico comum ocorreu para o carvão e uma nova epidemia assolou a variedade argentina NA56-79 (moderadamente suscetível ao patógeno), que ocupava 45% da área plantada no Brasil. O resultado foi alarmante, com níveis de infecção de 30 a 40 mil chicotes (sintoma típico da doença) por hectare no Estado de São Paulo (BERGAMIN FILHO; AMORIM; REZENDE, 2011). A solução para o problema foi novamente a substituição da variedade argentina por variedades resistentes.

Enquanto o carvão parecia estar sob controle no País, outra doença fúngica foi detectada: a ferrugem marrom, causada por *Puccinia melanocephala*. A primeira detecção da doença no Brasil foi em 1986 no município de Capivari (SP) (COOPERSUCAR, 1986). As perdas provocadas pela presença da doença nos canaviais não foram tão significativas quanto às perdas provocadas pelas epidemias do mosaico comum e do carvão, porque mais de 90% dos canaviais já estavam ocupados por variedades resistentes a *P. melanocephala* (TOKESHI; RAGO, 2005). No entanto, as consequências negativas da presença da doença foram registradas pelos programas de melhoramento, que eliminaram muitos clones e variedades

promissoras devido à suscetibilidade a *P. melanocephala* (TOKESHI; RAGO, 2005). No México as perdas em produtividade foram estimadas em 50% na variedade B4362 (COMSTOCK; SHINE; RAID, 1992). Essa mesma estimativa de perda (50%) também foi descrita por Giglioti et al. (1999) para variedades suscetíveis. Ainda segundo esses autores, embora em menor intensidade, as perdas em genótipos com resistência intermediária também podem ser significativas, como ocorreu com as variedades NA56-79 e SP70-1143, que apresentaram redução na produtividade devido à ocorrência da doença.

Ainda na década de 1980, excessivos amarelecimentos de touceiras na borda de talhões ocupados por uma importante variedade, a SP71-6163, chamaram a atenção dos produtores. O agente causal descrito foi um vírus denominado *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) e a doença ficou conhecida como “amarelinho”. Em algumas áreas a queda em produtividade foi de 50% e provocou a reforma antecipada dos canaviais, com elevação dos custos de produção (TOKESHI; RAGO, 2005).

Já no século XXI, mais precisamente no final de 2009, foi relatada pela primeira vez no Brasil a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (BARBASSO et al., 2010). Até então, a doença havia sido detectada na Ásia, Oceania e Américas Central e do Norte. Passados três anos após a detecção da doença no País, pouco ainda se sabe sobre os reais danos e perdas que a doença provocou, principalmente nas variedades suscetíveis (SP89-1115, RB72-454, SP84-2025) (BARBASSO et al., 2010) e intermediárias (SP81-3250, RB85-5156, CTC 9, entre outras), as quais estão entre as mais plantadas na região Centro-sul. Também não se sabe quais os reais riscos de ocorrer no País uma epidemia da doença como a relatada na Austrália no ano 2000, em que uma quebra de resistência na variedade Q-124, plantada em quase 50% das áreas com cana-de-açúcar, provocou perdas estimadas em 150 milhões de dólares australianos (MAGAREY et al., 2001).

A ocorrência de epidemias na cultura da cana-de-açúcar evidencia que, em intervalos relativamente curtos (dada à história de mais de 500 anos da cultura no País), as doenças provocaram e ainda provocam significativos impactos na produtividade das variedades mais plantadas no Brasil. O periódico reencontro do patógeno com o hospedeiro suscetível causa enormes perdas (ROBINSON, 1987). Além das epidemias citadas, ainda existem as doenças que passam a falsa impressão de serem “ocultas” mas também contribuem para as perdas, como o

raquitismo das soqueiras (causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), a podridão abacaxi (causada pelo fungo *Ceratocystis paradoxa*), entre outras (TOKESHI; RAGO, 2005). Porém, após a detecção no País em 2009, a ferrugem alaranjada é a doença que tem despertado a maior atenção do parque canavieiro.

2.1.3 *Puccinia kuehnii*: recente disseminação no mundo e detecção no Brasil

"Quando o 'parasita' é importado, a suscetibilidade é revelada e a vulnerabilidade é manifestada" (ROBINSON, 1987). A vulnerabilidade da cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada, causada pelo fungo biotrófico *Puccinia kuenhiii*, manifestou-se no Brasil no final de 2009 (BARBASSO et al., 2010). Mas antes de ser detectada no Brasil, a doença já tinha causado significativas perdas em outras partes do mundo desde o seu primeiro relato na ilha de Java em 1890 (RYAN; EGAN, 1989).

Presente no continente australiano desde a década de 1890 (RYAN; EGAN, 1989), a ferrugem alaranjada era considerada até o início do século XXI uma doença de pouca importância (BRAITHWAITE et al., 2009) até ser encontrada em 2000 na cultivar Q124 (naquela época a mais plantada na região do Queensland, principal estado produtor australiano) considerada até então resistente ao patógeno (BRAITHWAITE et al., 2009).

Após esta epidemia no ano 2000, a doença não ficou restrita apenas ao continente australiano, e sete anos depois foi detectada pela primeira vez no hemisfério oeste, mais especificamente no Estado da Flórida, EUA (COMSTOCK et al., 2008). O patógeno continuou se disseminando por outros países, como Guatemala (OVALLE et al., 2008), Costa Rica, Nicarágua (CHAVARRÍA et al., 2009), El Salvador, México, Panamá (FLORES et al., 2009) e Cuba (PÉREZ-VICENTE et al., 2010) até chegar ao Brasil em dezembro de 2009, no município de Rincão, região de Araraquara, SP (BARBASSO et al., 2010). Daí por diante, em pouco tempo a doença foi encontrada em vários municípios da região Centro-sul, nos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro (CTC, 2010) e da região Nordeste, nos estados do Rio Grande do Norte e Alagoas (CRUZ; MONTEIRO; BARBOSA, 2012). Após a detecção no País, em 2010 a doença foi relatada na Colômbia (CADAVID; ANGEL; VITORIA, 2012) e em 2011 no continente africano (SAUMTALLY et al., 2011).

A ocorrência da ferrugem alaranjada em países separados por milhares de quilômetros evidencia a grande facilidade de disseminação do patógeno e a consequente rapidez no aumento da incidência da doença, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis e a presença de variedades suscetíveis é abundante. Se considerarmos a recente disseminação do patógeno a partir da epidemia na Austrália no ano 2000 (MAGAREY et al., 2001), verifica-se que em apenas 12 anos a doença se espalhou por quase todos os continentes, com exceção da Europa, por não ser tradicional no cultivo da cana-de-açúcar.

2.1.4 Novas raças de *Puccinia kuehnii*: breve análise histórica do risco

O melhoramento genético é a melhor e mais eficiente estratégia para o controle de doenças da cana-de-açúcar (BERDING; HOGARTH; COX, 2004; MAGAREY et al., 2001) e em algumas situações é considerado o único método de controle disponível (CAMARGO, 2011). Além disso a cana-de-açúcar pode ser considerada um bom exemplo de durabilidade da resistência poligênica, a qual predomina na cultura e na maioria dos casos é a fonte dos programas de melhoramento para solucionar os problemas fitossanitários (ROBINSON, 1987).

Porém, não é sempre que essa resistência dura por longos períodos (BERDING; HOGARTH; COX, 2004). Robinson (1987) considera como poucas as pequenas falhas na resistência e as atribui a erros nos testes ou observações. No caso das ferrugens da cana-de-açúcar, assim como houve quebra de resistência da variedade Q124, a mais plantada na Austrália no início do século XXI, a ocorrência de tais quebras em variedades resistentes a *P. kuehnii* no Brasil não pode ser descartada. A existência de materiais resistentes ao patógeno não livra o País da possibilidade de sofrer epidemias futuras de ferrugem alaranjada e colocar em risco quase 9 milhões de hectares plantados (IBGE, 2012).

A análise dos primeiros relatos da doença nos países do continente americano e outros trabalhos já publicados (BARBASSO et al., 2010; PÉREZ-VICENTE et al., 2010; CHAVARRÍA et al., 2009; FLORES et al., 2009; OVALLE et al., 2008; HSIEH; FANG, 1983; ATIENZA; QUIMIO, 1982) permite verificar que no Brasil, até o momento, apenas três das variedades mais plantadas são classificadas como suscetíveis. No entanto, com uma breve revisão na literatura, observa-se que pelo menos 50 variedades de cana-de-açúcar cultivadas no mundo são relatadas como suscetíveis ou com resistência intermediária (ora classificadas como

‘moderadamente suscetíveis’) ao patógeno. Além disso, em muitos casos os testes de resistência das variedades aos patógenos são realizados em condições de campo e assim as variações ambientais podem interferir na confiabilidade e segurança de tais testes (TAYLOR, 1992; PURDY et al., 1983), que podem até mascarar pequenas diferenças entre genótipos (CAMARGO, 2011). O comportamento das variedades em condições controladas pode se apresentar diferente do comportamento em campo.

A capacidade em superar genes de resistência é relativamente frequente em patógenos causadores de ferrugens (McDONALD; LINDE, 2002; SINGH; HUERTA-ESPINO; ROELFS, 2002). Aqui, vale lembrar que uma raça de um patógeno corresponde a variantes dentro de uma mesma espécie, definidas com base em seu espectro de ação contra um conjunto de variedades. O surgimento de uma nova raça virulenta se dá quando há a presença de um genótipo mutante do patógeno capaz de quebrar a resistência de uma determinada variedade (CAMARGO, 2011). Na própria cultura da cana-de-açúcar há relatos de quebras de resistência em importantes regiões produtoras no mundo, principalmente a partir da década de 1970 (BERDING; HOGARTH; COX, 2004). Dean e Purdy (1984) notaram altos níveis de ferrugem marrom em uma cultivar previamente resistente (CP 79-1580) na Flórida e atribuíram o ocorrido ao surgimento de novas raças de *P. melanocephala*, cuja resistência não era incorporada nas variedades cultivadas. Comstock (1988) também relatou o surgimento de nova raça de *P. melanocephala* na cultivar H56-7052. Em estudo conduzido em condições controladas na Flórida, foram encontradas quatro raças patogênicas de *P. melanocephala* (SHINE; COMSTOCK; DEAN, 2005). A quebra de resistência a *P. kuehnii* na Q124 na Austrália em 2000 foi supostamente provocada por uma nova raça do patógeno (BRAITWAITE et al., 2005).

Berding, Hogarth e Cox (2004) mencionaram a quase uma década que as ferrugens marrom e alaranjada já deveriam ser incluídas entre as doenças mais importantes da cana-de-açúcar devido aos sérios surtos epidêmicos provocados pelas mesmas em países produtores como Cuba, Estados Unidos e Austrália. Ainda segundo esses autores, variações genéticas entre os isolados de *Puccinia melanocephala* e *P. kuehnii* são características comuns. Somado a isto, a grande extensão territorial, a ampla variação climática entre as áreas brasileiras produtoras de cana-de-açúcar e a uniformidade genética da cultura (ROBINSON, 1987)

configuram um cenário favorável ao possível surgimento de raças ou variantes mais agressivos do patógeno.

2.1.5 Manejo da ferrugem alaranjada

Estudos conduzidos na Austrália, Estados Unidos e Brasil mostram que além do uso de variedades resistentes, o uso de fungicidas do grupo das estrobilurinas e dos triazóis oferece maior possibilidade de controle da doença. Magarey et al. (2002) testaram diversos triazóis e encontraram melhores resultados em ganhos de produção quando se utilizou cyproconazole no controle da doença, porém o ganho só foi conseguido com várias aplicações (nove). O melhor momento para aplicação dos fungicidas parece ser no início da época mais favorável à ocorrência da doença, quando a incidência ainda é baixa (STAIER et al., 2003; MAGAREY et al., 2002).

Na Flórida (EUA) a doença atingiu no ano de 2012 os maiores índices de severidade desde 2007, quando o patógeno foi detectado pela primeira vez no País. O motivo para os elevados níveis da doença foi a maior quantidade de inóculo, o qual não foi reduzido no inverno devido à ausência de temperaturas mais baixas durante este período. Tal fato preocupa os produtores da Flórida pois quatro variedades suscetíveis (CP80-1743, CP88-1762, CP89-2143 e CP78-1628) ocupam 65% da área plantada (RAID[1], informação verbal). Para estas variedades o controle químico tem sido satisfatório, principalmente quando as pulverizações são iniciadas no início da safra, sendo os fungicidas do grupo das estrobilurinas mais eficientes do que os do grupo dos triazóis (RAID[1], comunicação pessoal; COMSTOCK; GLYNN, DAVIDSON, 2010). Em meados de 2012, a preocupação nos EUA aumentou após o primeiro relato da doença no Estado da Louisiana (GRISHAM et al., 2013).

No Brasil, a área plantada com as três variedades mais suscetíveis (SP89-1115, RB72-454 e SP84-2025) vem diminuindo a cada ano. Os talhões comerciais remanescentes têm apresentado perdas acima de 30%. Em 2012 foram registrados níveis de severidade de até 25% na variedade SP81-3250, uma das três variedades mais plantadas no País, fato este que alertou produtores nos estados de São Paulo e Goiás. Nessas situações tem-se adotado aplicações triazóis+estrobilurinas e óleo mineral, com boas respostas no controle da doença (VOSS[2], comunicação pessoal). Fungicidas à base de trifloxistrobina+tebuconazole e trifloxistrobina+ciproconazole

[1]RAID,R.N., University of Florida (EUA). Orange rust conference notes. Janeiro, 2013.
[2] VOSS, R.O., Eng. Agrônomo.

proporcionaram o controle de 77% e 75% da doença, respectivamente (CANTERI et al., 2012). Aplicações de azoxistrobina + tebuconazole também proporcionaram elevado percentual de controle da doença (DARIO et al., 2012). Maior atenção deve ser dada à época mais favorável à ocorrência da doença, que segundo levantamento de favorabilidade climática realizado por Neubauer et al. (2011) é de janeiro a abril e outubro a dezembro na região Centro-sul. No entanto, são necessárias maiores informações e resultados sobre a situação e o manejo da doença a fim de se diminuir os riscos de uma epidemia da ferrugem alaranjada no País.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Localização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP e no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), ambos localizados na cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo. As coletas das populações de *P. kuehnii* foram realizadas nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar nos Estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

2.2.2 Coleta das populações de *P. kuehnii*

Foram coletadas populações de *P. kuehnii* em seis localidades diferentes: (1) Paranacity-PR (PR); (2) Ribeirão Preto-SP (RP); (3) Piracicaba-SP (PI); (4) Araras-SP (AR); (5) Dourados-MS (DO) e (6) Nova Alvorada do Sul-MS (NA) (Figura 1). Em todas as localidades foram coletadas folhas de cana-de-açúcar com esporos de *P. kuehnii*. As coletas em RP, PR, DO e NA foram feitas em talhões comerciais de usinas de açúcar e álcool. Já as coletas em PI e AR foram feitas em áreas experimentais do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e no campus-Araras da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), respectivamente. Após as coletas, as folhas foram levadas para o Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Esalq/USP para coleta dos esporos e realização das inoculações (item 2.2.4)

Figura 1 - Locais de coletas (pontos pretos) das populações de *Puccinia kuehnii*

2.2.3 Seleção e cultivo das variedades de cana-de-açúcar

Para avaliar a reação das variedades de cana-de-açúcar às populações de *P. kuehnii*, foram utilizadas treze variedades com diferentes níveis de resistência ao patógeno. Além disso, aspectos como informações preliminares da reação destas variedades ao patógeno no campo e a importância das mesmas nas áreas plantadas no Brasil foram levados em consideração para escolha das variedades (Tabela 1). Mini-toletes de uma gema de cada variedade foram utilizados para o plantio em copos plásticos transparentes de 700 mililitros. Em cada experimento foi realizada uma única adubação com sulfato de amônio (5 gramas/copo). Durante 30 dias as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação. Decorrido esse tempo, as plantas foram consideradas prontas para serem inoculadas. Todas as treze variedades foram inoculadas com as populações de *P. kuehnii* oriundas de PR e RP, as quais foram as duas primeiras populações coletadas. Foram utilizadas três plantas de cada uma das treze variedades de cana-de-açúcar. Para a inoculação das populações de *P. kuehnii* oriundas de PI, AR, DO e NA, selecionou-se sete (SP89-1115, RB-85-5156, SP81-3250, RB86-7515, CTC 3, CTC 6 e CTC 15) das treze variedades de cana-de-açúcar utilizadas previamente e aumentou-se de três para sete o número de repetições de cada variedade (Tabela 1).

Tabela 1 – Variedades de cana-de-açúcar utilizadas para inoculação das populações de *Puccinia kuehnii*

N°	VARIEDADE	Reação a *P. kuehnii**	Referência
1	SP89-1115	Suscetível[1]	[1]BARBASSO et al, 2010
2	RB85-5156	Intermediária[2,]	[2]MINCHIO et al, 2011;
3	SP81-3250	Intermediária[2]	[2]MINCHIO et al, 2011
4	RB86-7515	Resistente[3]	[3]KLOSOWSKI, 2012
5	RB92-5211	Intermediária[4]	[4]RIDESA-UFSCar, 2008
6	RB96-6928	Resistente[5]	[5]DALRI, 2012, CTC 2011
7	CTC 3	Suscetível[6]	[6]CTC 2011; NUNES JUNIOR, 2010
8	CTC 6	Resistente[5]	[5]DALRI, 2012; CTC 2011
9	CTC 8	Intermediária[6]	[6]CTC 2011; NUNES JUNIOR, 2010
10	CTC 9	Intermediária[5]	[5]DALRI, 2012; CTC 2011
11	CTC 13	Intermediária[6]	[6]CTC 2011; NUNES, JUNIOR, 2010
12	CTC 15	Intermediária[5]	[5]DALRI, 2012; CTC 2011
13	CTC 18	Resistente[6]	[6]CTC 2011; NUNES JUNIOR. 2010

*reação em condições de campo.

2.2.4 Preparo do inóculo e inoculação das variedades de cana-de-açúcar

Para inocular cada população de *P. kuehnii* utilizou-se o método descrito por Martins et al. (2010) que consiste na pulverização de aproximadamente 10 mililitros de uma suspensão de esporos de cada população de *P. kuehnii* sobre todas as folhas (sobre as superfícies abaxial e adaxial) de cada repetição (ANEXO C). Em todas as inoculações a viabilidade dos esporos de *P. kuehnii* foi verificada através de teste de germinação em ágar-água descrito por BRAITHWAITE et al., (2009) com adaptações (ANEXO C). Logo após a coleta das populações de *P. kuehnii*, preparou-se uma suspensão de 1.10^3 esporos/ml de água destilada. Desta suspensão foram pipetadas e espalhadas duas alíquotas de 50 µL/placa de poliestireno contendo meio de cultura ágar-água. Foram utilizadas duas placas em cada inoculação. Após a incubação destas placas em câmaras de crescimento BOD (escuro a 25° C), foi realizada a leitura da porcentagem (%) de esporos germinados, contando-se 100 esporos de cada alíquota pipetada, obtendo-se a germinação média de cada população, com a finalidade de se obter a concentração de esporos viáveis/mL de suspensão.

Para comparar as inoculações entre cada uma das seis populações de *P. kuehnii* utilizadas, foi padronizada a concentração de 5.10^4 esporos viáveis/mL de suspensão e, a partir dessa concentração padrão e da % de germinação, obteve-se em cada inoculação a concentração de esporos necessária para cada população (Tabela 2). Todas as inoculações foram repetidas mais uma vez e esse mesmo procedimento foi adotado na repetição de cada inoculação. No entanto os esporos utilizados para repetir cada inoculação foram aqueles produzidos no primeiro experimento para evitar qualquer tipo de contaminação e ter a certeza de que a população de *P. kuehnii* utilizada em cada repetição seria a mesma. Desse modo, mesmo utilizando todos os esporos coletados do primeiro experimento não foi possível, com base na germinação previamente obtida, utilizar a concentração necessária para alcançar 5.10^5 esporos viáveis/mL de suspensão. Então, calculou-se um fator de correção (FC) obtido pela divisão da concentração de esporos que seria necessária para inocular 5.10^5 esporos viáveis/mL pela concentração de esporos inoculada (Tabela 2). Este fator de correção foi aplicado aos parâmetros 'severidade da doença' e 'número total de pústulas' avaliados em cada inoculação.

Tabela 2 – Porcentagem de germinação e concentração de cada inoculação das populações de *Puccinia kuenii*

Local	**Experimento**				
	Primeiro		Segundo		
	% Ger.[1]	[esp.][2].10^5	% Ger.[1]	[esp.][2].10^5	FC[3]
Piracicaba (SP)	18	2,77	36	0,66	2,09
Araras (SP)	35	1,42	11	0,69	6,58
Ribeirão Preto (SP)	19	2,63	22	0,58	3,91
Paranacity (PR)	20	2,50	24	1,21	1,72
Nova Alvorada Sul (MS)	13	3,84	7	0,94	7,59
Dourados (MS)	16	3,12	9	0,87	6,38

[1]Porcentagem (%) de germinação.

[2]Número de esporos.

[3]Fator de correção.

Após cada inoculação todas as plantas foram mantidas em câmara úmida e escuro contínuo por 24 horas (ANEXO C). Para evitar qualquer tipo de contaminação com esporos de *P. kuehnii* de outras localidades, as plantas inoculadas sempre foram mantidas em câmaras de crescimento Conviron® (ANEXO C), à temperatura de 25±2°C.

2.2.5 Avaliação da doença

As avaliações tiveram início com o surgimento dos primeiros sintomas da doença. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

1 – Período médio de incubação: tempo (em dias) entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas da doença (ANEXOS D e E), considerado quando pelo menos 50% das plantas apresentaram os primeiros sintomas visuais da doença;

2 – Período médio de latência: tempo (em dias) entre a inoculação e o aparecimento de pústulas abertas (ANEXO C), considerado quando pelo menos 50% das plantas apresentaram pústulas abertas;

3 - Severidade da doença: avaliada em 20 cm da folha com maior quantidade de sintomas, estimada com auxílio da escala de notas proposta por Amorim et al. (1987);

4 – Proporção de pústulas abertas e fechadas: contagem do número de pústulas abertas e de pústulas fechadas em 20 cm da folha com maior quantidade de sintomas da doença. Com este parâmetro calculou-se a porcentagem de pústulas abertas (%PA);

Para os parâmetros ‘período de incubação’ e ‘período de latência’ as avaliações foram diárias até o final de cada experimento. Já para os parâmetros ‘severidade da doença’ e ‘proporção (contagem) de pústulas abertas e fechadas’ foram realizadas três avaliações durante cada experimento (11, 16 e 21 dias após a inoculação).

2.2.6 Caracterização e análise da diversidade genética de *P. kuehnii*

Para a análise molecular das seis populações de *P. kuehnii*, duas regiões do DNA ribossômico foram amplificadas e sequenciadas: a região ITS (*Internal transcribed spacer*) e a região IGS (*Intergenic spacer*).

2.2.6.1 Extração de DNA

Esporos de *P. kuehnii* oriundos de cada uma das seis localidades foram coletados após a primeira inoculação e armazenados em ultrafreezer à -80°C. Para a extração do DNA total, utilizou-se protocolo desenvolvido por Dellaporta, Wood e Hicks (1983), com modificações: cada amostra composta por uma pequena quantidade de esporos foi macerada em um tubo 'eppendorf' de 1,5 ml contendo 500 µL do tampão de extração (100 µM de EDTA, 2,5 M de NH_4A_c, 100 mM de tampão Tris, pH 8,0). Após a maceração, foram acrescentados 33 µL de SDS 20% e após homogeneização da solução, seguiu-se a incubação em banho-maria a 65°C durante 10 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 160µL de acetato de potássio 5M e a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para novos microtubos e adicionou-se 300 µL de isopropanol gelado (-20°C). Em seguida, os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O pellet foi lavado em 500µL de etanol 75% e a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e o precipitado ficou a temperatura ambiente para secar e, posteriormente, foi ressuspenso em 50 µL de água milliQ.

2.2.6.2 Reação de PCR

Para cada amostra, as reações para amplificar as duas regiões foram realizadas utilizando-se 16,1 µL de água milliQ, 1 µL do DNA extraído, 2,5 µL do tampão para PCR, 2,2 µL de $MgCl_2$, 2,0 µL de uma mistura de dNTPs, 0,5 µL de cada um dos oligonucleotídeos e 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase, totalizando um volume final da reação de 25 µL.

Para amplificar a região IGS, utilizou-se o par de oligonucleotídeos LR12R (5'GAACGCCTCTAAGGTCAGAATCC3') /5SRNA(5'ATCAGACGGGATGCGGT3') (JAMES et al., 2001). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador com as seguintes condições: pré-aquecimento inicial por 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, de anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 10 minutos a 72°C.

A região ITS foi amplificada com o par de oligonucleotídeos ITS2R (5'TTCAATGATGCTGCTTTTCAAC3')ITS1F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3'). As reações de PCR foram conduzidas em termociclador com as seguintes condições: pré-aquecimento inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, de anelamento a 52 °C por 45 segundos e extensão a 72°C por 80 segundos e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C.

Os produtos obtidos de cada PCR foram aplicados em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos correspondentes às regiões genômicas amplificadas foram visualizados em transiluminador de ultravioleta (Kodak). Como controle positivo foi utilizado amostra de DNA de *P. kuehnii* mantidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira.

2.2.6.3 Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

As sequências nucleotídicas das populações de *P. kuehnii* utilizadas no trabalho foram comparadas entre si e àquelas depositadas no "GenBank" (NCBI) para averiguar o nível de similaridade genética existente entre as mesmas.

Tanto as sequências das seis populações utilizadas no presente trabalho quanto as sequências já depositadas no GenBank foram alinhadas pelo método Muscle (EDGAR, 2004) usando o programa Mega versão 5.0® (TAMURA et al., 2011). *Gaps* foram considerados como dados perdidos e as regiões terminais com alinhamento duvidoso foram retiradas manualmente usando o programa BioEdit v.7.1.11.

Foi utilizado o método de análise filogenética por aproximação bayesiana. A análise filogenética foi realizada pelo Mr. Bayes v3.1.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). O melhor modelo selecionado pelo Mr.Modeltest v2.3, baseado em AIC, foi o modeloKimura 3-parameter. A amostragem pela Markov chain Monte Carlo (MCMC) foi realizada com 1.10^6 gerações. Nas análises foi utilizada como *outgroup* uma sequência de *P. melanocephala* de ambas as regiões IGS e ITS depositada no 'GenBank'. As árvores filogenéticas geradas foram editadas no programa Figtree v3.1 2006-2009. A coleção de populações de *P. kuehnni* utilizadas para reconstrução filogenética está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Populações de *Puccinia kuehnii* utilizadas para análise filogenética das regiões IGS e ITS

(continua)

Identificação	Variedade	Local de coleta	Coletor	Data da coleta	N°. acesso GenBank	
					IGS	ITS
Piracicaba-Brasil	SP89-1115	Piracicaba, SP, Brasil	Sydney (CTC)	out-12	-	-
Araras-Brasil	SP81-3250	Araras, SP, Brasil	A.S. Moreira	ago-12	-	-
Ribeirão Preto-Brasil	SP89-1115	Ribeirão Preto, SP, Brasil	(CTC)	jul-11	-	-
Paranacity-Brasil	CT96-3415	Paranacity, PR, Brasil	F.C. Pattaro (CTC)	abr-12	-	-
Nova Alvorada do Sul-Brasil	RB72-454	Nova Alvorada do Sul, MS, Brasil	W.Arnt (CTC)	ago-12	-	-
Dourados-Brasil	SP89-1115	Dourados, MS, Brasil	W.Arnt (CTC)	ago-12	-	-
[1]BRIP52110-Austrália	Q141	Bundaberg, Austrália	D. Bush	abr-03	FJ7088589	FJ708563
[1]BRIP52112-Austrália	Q124	Burdekin, Austrália	W. Neilson	mar-02	FJ7088590	FJ708564
[1]BRIP52113-Austrália	Q124	Condog, Austrália	P. McGuire	jan-03	FJ7088591	FJ708565
[1]BRIP52114-Austrália	Q124	Mackay, Austrália	T. Staier	jan-04	FJ7088592	FJ708566
[1]BRIP52115-Austrália	Q124	Tully, Austrália	W. Neilson	mar-02	FJ7088593	FJ708567
[1]BRIP52117-Austrália	Q155	Fairymead, Austrália	D. Bush	jan/02	FJ7088595	FJ708569
[1]BRIP52118-Austrália	RB72-454	Ballina, Austrália	A. Cattle	fev-03	FJ7088596	FJ708570
[1]BRIP52119-Austrália	Q177	Mackay, Austrália	D. Appo	abr-02	FJ7088597	FJ708571
[1]BRIP52109-Austrália	*S. spontaneum*	Daly River, Austrália	P. Stephens	out-04	FJ7088588	FJ708562
[1]BRIP52116-Austrália	Q78	Tully, Austrália	J. Bull	mar-04	FJ7088594	FJ708568
[1]BRIP3758-Austrália	*ni*	Brisbane, Austrália	H. Tryon	1898	FJ7088572	-
[1]BRIP7538-Austrália	*ni*	Bundaberg, Austrália	*ni*	1955	FJ7088573	FJ708547
[2]GU4415-Austrália	Q124	Mackay, Austrália	*ni*	2001	-	GU564415
[2]GU4419-Austrália	Q124	Mackay, Austrália	*ni*	2001	-	GU564419
[3]BPI79612-Austrália	*Ni*	Austrália	*ni*	1935	-	AJ406048
[1]BRIP18997-Samoa	*ni*	Savaii, Samoa	A. Johnston	1961	FJ7088574	FJ708548

Tabela 3 – Populações de *Puccinia kuehnii* utilizadas para análise filogenética das regiões IGS e ITS

(continuação)

Identificação	Variedade	Local de coleta	Coletor	Data da coleta	N°. acesso GenBank	
					IGS	ITS
[2]GU4408-China	RB72-454	Guanxi Province, China	*ni*	2008	-	GU564408
[2]GU4417-China	RB72-454	Guanxi Province, China	*ni*	2008	-	GU564417
[2]BRIP52106-China	YT94-128	Zhanjiang, China	B. Croft	2003	-	FJ708559
[1]BRIP39604-Papua Nova Guine	*S. officinarum*	Wewak, Papua Nova Guine	R. Magarey	mai-01	FJ7088575	FJ708549
[1]BRIP47011-Papua Nova Guine	*S. edule*	Jayapura, Papua Nova Guine	R. Magarey	mai-01	FJ7088582	FJ708556
[1]BRIP47039-Papua Nova Guine	*S. robustum*	New Britain, Papua Nova Guine	R. Magarey	mai-01	FJ7088583	FJ708557
[1]BRIP47064-Papua Nova Guine	*S. edule*	Alotau, Papua Nova Guine	R. Magarey	mai-01	FJ7088584	-
[1]BRIP45350-Indonésia	Erianthus sp.	Anjani, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088576	FJ708550
[1]BRIP45351-Indonésia	*S. officinarum*	Lewa-Paku, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088577	FJ708551
[1]BRIP45352-Indonésia	*S. officinarum*	Kopang Jelunjuk, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088578	FJ708552
[1]BRIP45354-Indonésia	Híbrido	Utan-Sabiduk, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088579	FJ708553
[1]BRIP45855-Indonésia	*S. spontaneum*	Sanur, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088580	FJ708554
[1]BRIP45856-Indonésia	*S. spontaneum*	Kelimutu, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088581	FJ708555
[1]BRIP52107-Indonésia	Híbrido	Lampung, Indonésia	Irawan	fev-04	FJ7088586	FJ708560
[1]BRIP52108-Indonésia	Híbrido	Utan-Sabiduk, Indonésia	B. Croft	jun-02	FJ7088587	FJ708561
[2]GU4413-Filipinas	56-226	Silay City, Filipinas	*ni*	2007	-	GU564413
[2]GU4418-Filipinas	56-226	Silay City, Filipinas	*ni*	2007	-	GU564418
[3]TSHR11125-Japão	RK89-241	Japão	*ni*	1996	-	AJ406067
[3]TSHR11129-Japão	NCo310	Japão	*ni*	1996	-	AJ406049
[2]GU4416-Japão	NCo310	Macabe, Japão	*ni*	2007	-	GU564416
[2]GU4420-Japão	NCo310	Macabe, Japão	*ni*	2007	-	GU564420
[4]BPI878243-Guatemala	CP72-2086	Guatemala	*ni*	2007	-	EU543434
[5]GQ1584-Panamá	SP74-8355	Cocle Province, Panamá	*ni*	2008	-	GQ281584
[6]FJ2476-Nicaraguá	ISA00-1000	Nicaraguá	*ni*	2007	-	FJ532476
[2]GU4412-Nicaraguá	ISA00-1000	Ingenio San Antonio, Nicaraguá	*ni*	2007	-	GU564412

Tabela 3 – Populações de *Puccinia kuehnii* utilizadas para análise filogenética das regiões IGS e ITS

(conclusão)

Identificação	Variedade	Local de coleta	Coletor	Data da coleta	N°. acesso GenBank	
					IGS	ITS
[6]FJ2477-Costa Rica	SP71-5574	Costa Rica	*ni*	2007	-	FJ532477
[2]GU4409-Costa Rica	CP72-2086	Curts Cana, Costa Rica	*ni*	2008	-	GU564409
[2]GU4411-Jamaica	BT9186	St. Catherine Parish, Jamaica	*ni*	2008	-	GU564411
[2]GU4414-México	NCo301	Chiapas, México	*ni*	2008	-	GU564414
[4]BPI878289-Estados Unidos	CP80-1743	Flórida, EUA	*ni*	2007	-	EU176009
[4]EU6008-Estados Unidos	CP72-2086	Flórida, EUA	*ni*	2007	-	EU176008
[2]GU4421-Estados Unidos	CP72-2086	Flórida, EUA	*ni*	2009	-	GU564421
[3]BPI17964-Havaí	*ni*	Havaí, EUA	*ni*	1916	-	AJ406049
[1]*Puccinia melanocephala*	Q102	Woodford, Austrália	B. Croft	jan-04	FJ009329	FJ009328

ni: não identificado
[1]BRAITHWAITE et al. (2009)
[2]GLYNN et al. (2010)
[3]VIRTUDAZO et al. (2001a)
[4]COMSTOCK et al. (2008)
[5]FLORES et al. (2009)
[6]CHAVARRÍA et al. (2009)

2.2.7 Análise dos dados

2.2.7.1 Períodos de incubação e latência, severidade, número total de pústulas e porcentagem de pústulas abertas

Os dados de número total de pústulas e a porcentagem de pústulas abertas obtidas em cada uma das inoculações das seis populações de *P. kuehnii* nas treze variedades de cana-de-açúcar foram submetidos a análise de variância e teste de Scott-Knott (5% de significância) para comparar as médias obtidas para os fatores variedade e população de *P. kuehnii*, os quais foram submetidos à análise fatorial. Em função da adoção de pelo menos 50% das repetições de cada combinação variedade/população de *P. kuehnii* para determinação dos períodos médios de incubação e latência da doença e pela proximidade dos valores, não foi necessário aplicar teste de média para estas variáveis. Os dados referentes ao número total de pústulas foram submetidos à transformação da raiz quadrada (x + 1,0) antes de se aplicar o teste Scott-Knott.

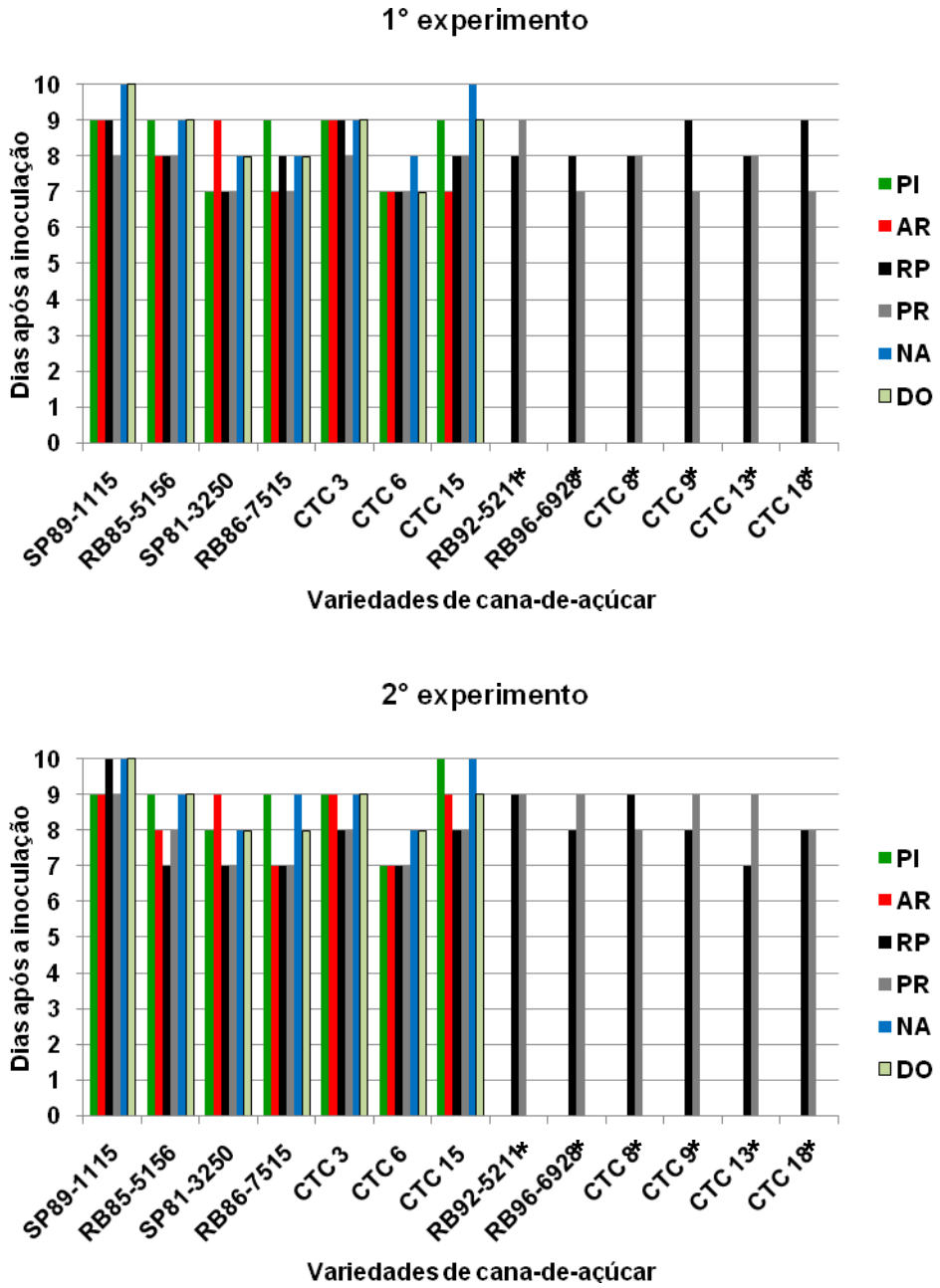
2.3 Resultados

2.3.1 Período de incubação

Independentemente da classificação quanto ao nível de resistência ao patógeno (Tabela 1), todas as treze variedades de cana-de-açúcar inoculadas com as seis populações de *Puccinia kuehnii* apresentaram o período de incubação da doença entre 7 a 10 dias (Figura 2; Anexo A). No entanto, a maioria dos sintomas surgiu entre 7 e 9 dias após a inoculação. Tanto no primeiro quanto no segundo experimento o período de incubação de 10 dias foi registrado apenas para as variedades SP89-1115 e CTC15, quando inoculadas com as populações de *P. kuehnii* oriundas de NA e DO no primeiro experimento. No segundo experimento, além destas duas populações, as populações de RP e PI também apresentaram períodos de incubação de 10 dias para estas duas variedades (Figura 2). Entre as populações de *P. kuenhii* a variação no período de incubação foi pequena.

A variedade CTC 6, resistente a *P. kuehnii* (Tabela 1), apresentou na maioria dos experimentos o menor período de incubação (7 dias). Já a variedade SP89-1115, apesar de ser uma das mais suscetíveis dentre as utilizadas no trabalho, foi a variedade que apresentou em média o maior período de incubação (9 e 10 dias). A

variedade CTC 3, apresentou períodos de incubação mais longos do que as demais (8 a 10 dias) independente da população de *P. kuehnii* utilizada (Figura 2, Anexo A).



*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

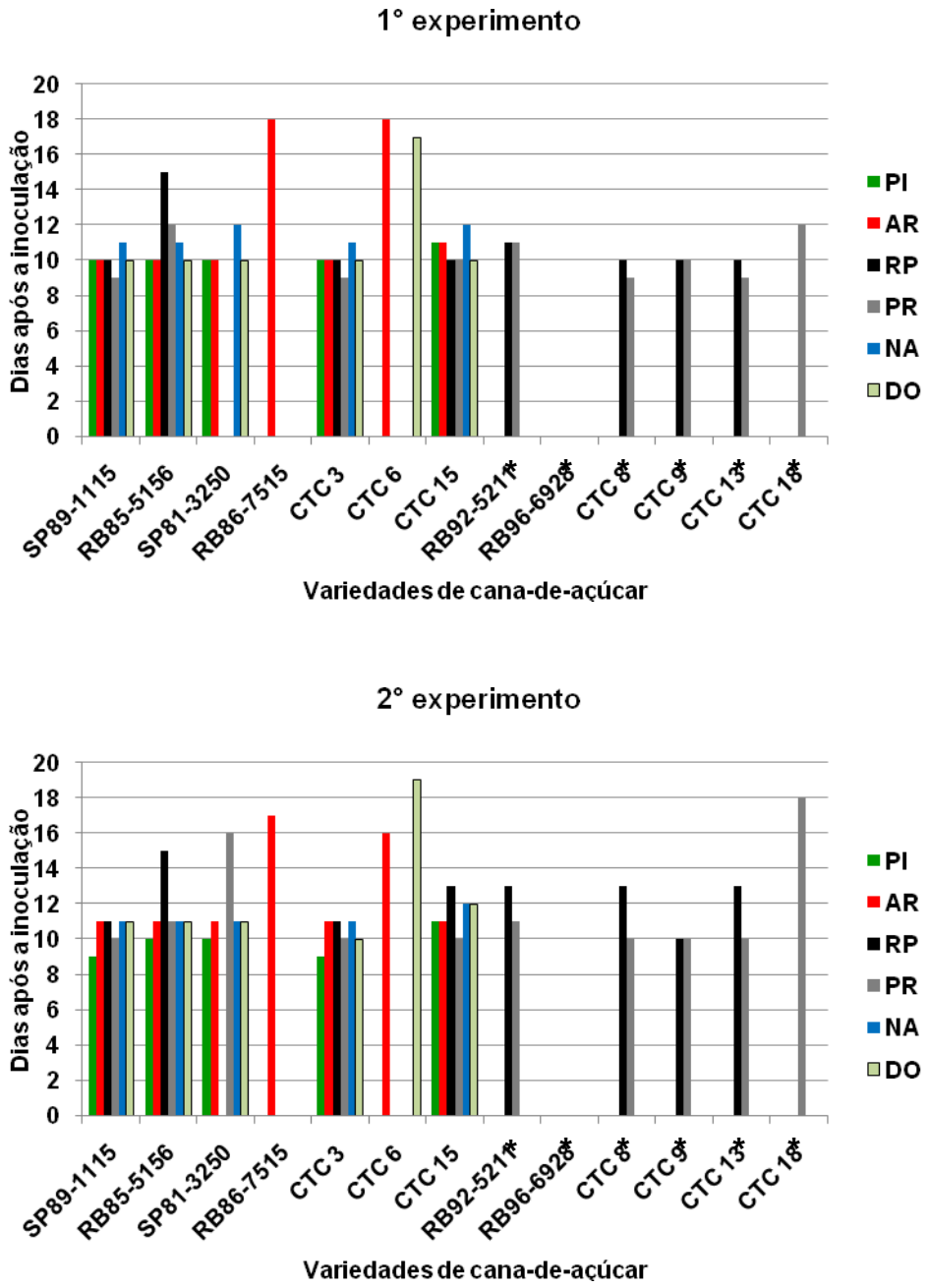
Figura 2 – Período de incubação (dias) da ferrugem alaranjada em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO)

2.3.2 Período de latência

O período de latência variou de 9 a 18 e 9 a 19 dias no primeiro e segundo experimentos, respectivamente. Para a maioria das inoculações os menores períodos de latência (9 e 10 dias) foram registrados quando as variedades foram inoculadas com as populações de *P. kuehnii* de PI e PR. Quando inoculadas com a população do patógeno oriunda de NA, todas as variedades que abriram pústulas apresentaram a latência de 11 ou 12 dias. Os períodos de latência mais longos ocorreram quando se inoculou *P. kuehnii* oriunda de RP, AR, DO e PR nas variedades RB85-5156 (15 dias), RB86-7515 e CTC 6 (16 a 18 dias), CTC 6 (17 a 19 dias) e CTC 18 (18 dias), respectivamente (Figura 3, Anexo B).

Dentre as sete variedades de cana-de-açúcar inoculadas com todas as seis populações de *P. kuehnii*, as variedades SP89-1115 (suscetível), RB85-5156 (intermediária), CTC 3 (suscetível) e CTC 15 (intermediária) (Tabela 1) apresentaram pelo menos 50% das repetições com pústulas abertas em todas as inoculações. Em contrapartida, durante o período de avaliação a variedade RB96-6928 foi a única que não apresentou nenhuma pústula aberta nas inoculações com *P. kuehnii* oriunda de RP e PR. Já a CTC 18 apresentou pelo menos 50% das plantas com pústulas abertas apenas quando inoculada com a população de *P. kuehnii* de PR. A população de *P. kuehnii* de AR foi capaz de provocar a abertura de pústulas nas importantes variedades RB86-7515 e CTC 6 (ANEXO D). Esta última também apresentou pústulas (em baixa quantidade) abertas quando inoculada com *P. kuehnii* oriunda de DO. A latência para as inoculações com ambas as populações foi tardia, sendo de 17 a 19 dias. Para as variedades classificadas como suscetíveis e intermediárias (Tabela 1) os períodos de latência predominantes foram de 10 e 11 dias (Figura 3, Anexo B).

A variedade SP81-3250, uma das mais plantadas no Estado de São Paulo, quando inoculada com esporos oriundos de PR apresentou no segundo experimento pústulas abertas 16 dias após a inoculação. Já no primeiro experimento, apesar de algumas plantas terem apresentado pústulas abertas 14 dias após a inoculação, tal fato não foi observado em pelo menos 50% das repetições. Nas inoculações com populações oriundas das outras localidades a latência variou de 10 a 12 dias (Anexo B).



*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

Figura 3 – Período de latência (dias) da ferrugem alaranjada em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO)

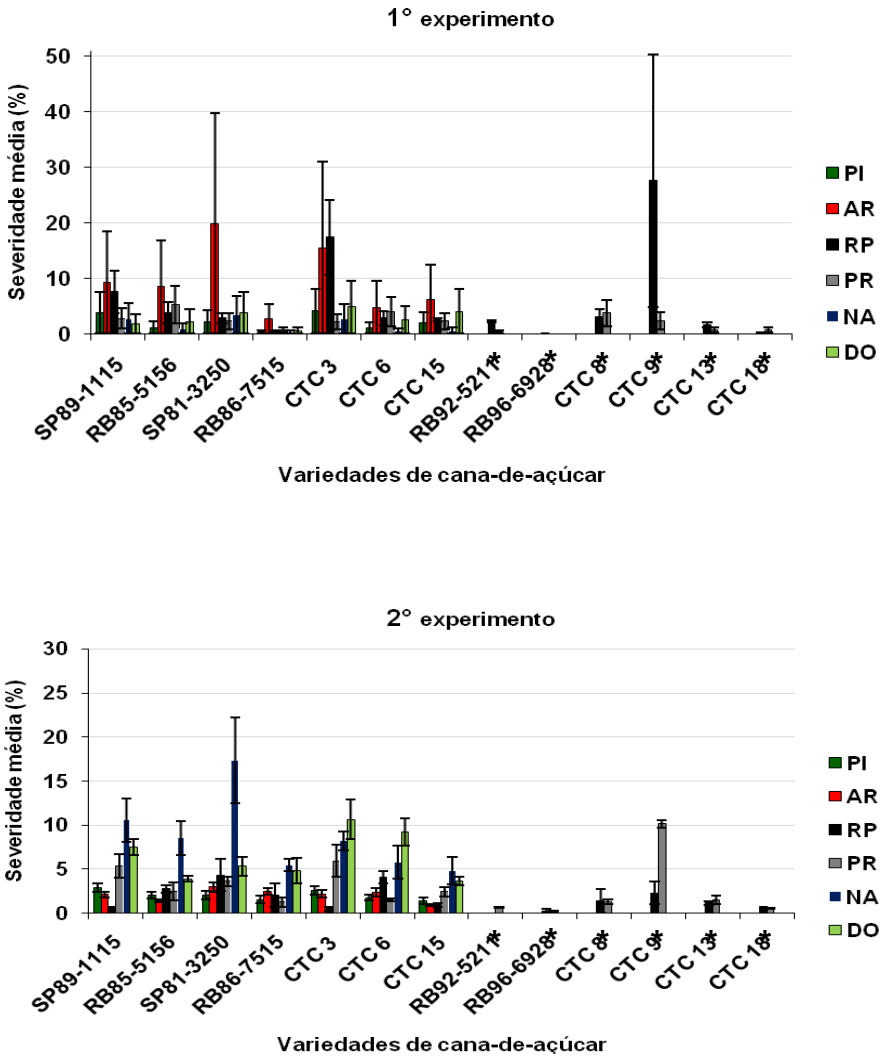
2.3.3 Severidade da ferrugem alaranjada

Os resultados de severidade da ferrugem alaranjada nas 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas foram bastante variáveis, tanto entre as populações de *P. kuehnii* utilizadas, quanto entre as próprias variedades e até mesmo entre os dois

experimentos, apesar da aplicação do fator de correção (Tabela 2) para cada inoculação.

Apesar da grande variação, observa-se que as maiores severidades nos dois experimentos ocorreram nas variedades SP81-3250, CTC 3, CTC 9 e SP89-1115 (Figura 3). No primeiro experimento, para a maioria das variedades, os maiores níveis de severidade ocorreram quando se inoculou as populações de *P. kuehnii* oriundas de AR (barras vermelhas) e de RP (SP) (barras pretas). Em números absolutos, níveis de severidade média acima de 10% ocorreram apenas nas variedades SP81-3250, CTC 3 e CTC 9 (Figura 3 – primeiro experimento). Já no segundo experimento, também para a maioria das variedades, os maiores níveis de severidade foram obtidos nas inoculações das populações de *P. kuehnii* coletadas em NA (barras azuis), DO (barras verdes-claro) e PR (barras cinza). Aplicando-se o fator de correção (Tabela 2), níveis de severidade acima de 10% foram obtidos nas inoculações das variedades SP81-3250, CTC 3, CTC 9 e SP89-1115 com a população de *P. kuehnii* coletada em NA, PR e DO (Figura 3 – segundo experimento).

Nas variedades resistentes RB69-9628, CTC 6, RB86-7515 e CTC 18 e as intermediárias RB92-5211 e CTC 13, os níveis de severidade foram bem menores que nas demais variedades inoculadas, principalmente no primeiro experimento (Figura 3).



*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

Figura 3 – Severidade (%) de ferrugem alaranjada avaliadas em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO)

2.3.4 Número total de pústulas

A diferença no número total de pústulas (abertas + fechadas) entre as populações de *P. kuehnii* utilizadas neste trabalho foi significativa para todas as sete variedades que receberam inoculações com as todas as populações de *P. kuehnii*. O maior número de pústulas foi registrado nas inoculações com a população oriunda de AR. Nas variedades SP89-1115, RB85-5156 e CTC 15, a população oriunda de PR apresentou comportamento semelhante à população de *P. kuehnii* coletada em AR. Para as demais populações, o número de pústulas não diferiu

significativamente, apesar do predomínio das menores contagens de pústulas quando se inoculou a população oriunda de PI (Tabela 4; Tabela 5; Apêndice A).

Tabela 4 – Total médio de pústulas (abertas + fechadas) de ferrugem alaranjada de dois experimentos avaliados em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO). Dados médios de dois experimentos

Variedade	Local de coleta					
	Piracicaba-SP PI	Araras-SP AR	Ribeirão Preto-SP RP	Paranacity-PR PR	Nova Alvorada do Sul-MS NA	Dourados-MS DO
SP89-1115	135,05** aB	393,45 cA	226,78 aB	320,43 aA	154,27 bB	191,69 bB
RB85-5156	75,93 aB	289,21 cA	93,30 bB	330,46 aA	156,61 bB	145, 48 bB
SP81-3250	92,11 aC	742,81 aA	120,16 bC	338,87 aB	291,31 aB	203,33 bB
RB86-7515	84,32 aC	530,11 bA	84,60 bC	292,94 aB	162,76 bC	157,52 bC
CTC 3	165,35 aC	528,43 bA	250,09 aC	335,98 aB	143,24 bC	321,78 aB
CTC 6	118,64 aC	505,27 bA	184,33 aC	297,22 aB	144,34 bC	326,16 aB
CTC 15	115,04 aC	314,38 cA	121,08 bC	329,98 aA	84,27 bC	193,62 bB
RB92-5211*	-	-	61,90 cA	61,90 bA	-	-
RB96-6928*	-	-	15,12 cA	37,97 bA	-	-
CTC 8*	-	-	126,60 bA	229,87 aA	-	-
CTC 9*	-	-	302,10 aA	395,30 aA	-	-
CTC 13*	-	-	116,94 bA	220,39 aA	-	-
CTC 18*	-	-	20,72 cA	77,67 bA	-	-

*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

**Dados originais. Valores em uma mesma linha seguidos por letras maiúsculas idênticas e valores em uma mesma coluna seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si a 5% pelo teste de Scott-Knott. Dados transformados em raiz quadrada de (x + 1,0) para análise estatística.

Para facilitar a separação das combinações entre as variedades de cana-de-açúcar e as populações de *P. kuehnii*, foram identificados cinco grupos pelo teste de Scott-Knott (a 5% de significância) (Tabela 5). A quantidade total de pústulas indicou que a população coletada em AR foi a que provocou maior número de pústulas. Os dois primeiros grupos são compostos por esporos coletados nesta localidade. Tanto as variedades suscetíveis quanto as variedades intermediárias e resistentes (Tabela 1) apresentaram as maiores quantidades de pústulas (Tabela 5). A variedade intermediária SP81-3250 (Tabela 1) foi a que apresentou a maior quantidade total de pústulas, sendo a única que integra o grupo 1. As variedades RB86-7515 e CTC 6, apesar de resistentes (Tabela 1), se situaram no segundo grupo com maior número total de pústulas. Além das populações de *P. kuehnii* de AR, as populações oriundas de Paranacity (PR) também provocaram maiores quantidades de pústulas, porém ficaram alojadas no grupo 2 (Tabela 5).

As variedades RB92-5211, RB96-6928 e CTC 18 foram as únicas que se situaram no último grupo (5). Ressalta-se que estas foram inoculadas apenas com as populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR. De acordo com os cinco grupos propostos pelo Teste de Scott-Knott, nos grupos 4 e 5 encontram-se as variedades que apresentaram menos de 200 pústulas. No grupo 3, estão as variedades que apresentaram de 200 a 400 pústulas e nos grupos 1 e 2 estão as variedades que apresentaram mais de 500 pústulas (Tabela 5).

Tabela 5 – Agrupamento das 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com as seis populações de *P. kuehnii* em função do número total médio de pústulas (PT) aos 21 dias após a inoculação

(continua)

Variedade	Identificação da população	Local de coleta	PT*	Agrupamento**
SP81-3250	AR	Araras (SP)	742,81	**1**
RB86-7515	AR	Araras (SP)	530,11	
CTC 6	AR	Araras (SP)	505,27	**2**
CTC 3	AR	Araras (SP)	528,43	
CTC 9	PR	Paranacity (PR)	395,30	
SP89-1115	AR	Araras (SP)	393,45	
SP81-3250	PR	Paranacity (PR)	338,87	
CTC 3	PR	Paranacity (PR)	335,98	
RB85-5156	PR	Paranacity (PR)	330,46	
CTC 15	PR	Paranacity (PR)	329,98	
CTC 6	DO	Dourados (MS)	326,16	
CTC 3	DO	Dourados (MS)	321,78	
SP89-1115	PR	Paranacity (PR)	320,43	
CTC 15	AR	Araras (SP)	314,38	
CTC 9	RP	Ribeirão Preto (SP)	302,10	**3**
CTC 6	PR	Paranacity (PR)	297,22	
RB86-7515	PR	Paranacity (PR)	292,94	
SP81-3250	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	291,31	
RB85-5156	AR	Araras (SP)	289,21	
CTC 3	RP	Ribeirão Preto (SP)	250,09	
CTC 8	PR	Paranacity (PR)	229,87	
SP89-1115	RP	Ribeirão Preto (SP)	226,78	
CTC 13	PR	Paranacity (PR)	220,39	
SP81-3250	DO	Dourados (MS)	203,33	
CTC 15	DO	Dourados (MS)	193,62	
SP89-1115	DO	Dourados (MS)	191,69	
CTC 6	RP	Ribeirão Preto (SP)	184,33	
CTC 3	PI	Piracicaba (SP)	165,35	
RB86-7515	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	162,76	
RB86-7515	DO	Dourados (MS)	157,52	
RB85-5156	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	156,61	
SP89-1115	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	154,27	**4**
RB85-5156	DO	Dourados (MS)	145,48	
CTC 6	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	144,34	
CTC 3	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	143,24	
SP89-1115	PI	Piracicaba (SP)	135,05	
CTC 8	RP	Ribeirão Preto (SP)	126,60	
CTC 15	RP	Ribeirão Preto (SP)	121,08	
SP81-3250	RP	Ribeirão Preto (SP)	120,16	
CTC 6	PI	Piracicaba (SP)	118,64	
CTC 13	RP	Ribeirão Preto (SP)	116,94	

Tabela 5 – Agrupamento das 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com as seis populações de *P. kuehnii* em função do número total médio de pústulas (PT) aos 21 dias após a inoculação

(conclusão)

Variedade	Identificação da população	Local de coleta	PT*	Agrupamento**
CTC 15	PI	Piracicaba (SP)	115,04	**4**
RB85-5156	RP	Ribeirão Preto (SP)	93,30	
SP81-3250	PI	Piracicaba (SP)	92,11	
RB86-7515	RP	Ribeirão Preto (SP)	84,60	**5**
RB86-7515	PI	Piracicaba (SP)	84,32	
CTC 15	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	84,27	
CTC 18	PR	Paranacity (PR)	77,67	
RB85-5156	PI	Piracicaba (SP)	75,93	
RB92-5211	RP	Ribeirão Preto (SP)	61,90	
RB92-5211	PR	Paranacity (PR)	61,90	
RB96-6928	PR	Paranacity (PR)	37,97	
CTC 18	RP	Ribeirão Preto (SP)	20,72	
RB96-6928	RP	Ribeirão Preto (SP)	15,12	

*****Dados médios originais de dois experimentos.
**Teste de Scott-Knott a 5% de significância, com dados transformados em raiz quadrada (x + 1,0).

2.3.5 Porcentagem de pústulas abertas (%PA)

Para todas as seis populações inoculadas, as variedades SP89-1115 e CTC 3 foram as que mais apresentaram pústulas abertas ao final das avaliações, com porcentagens acima de 90% e 84%, respectivamente (Tabelas 5 e 6; Apêndice B). Na comparação entre as populações de *P. kuehnii*, observou-se que das 7 variedades que receberam inoculações de todas as seis populações, ocorreram diferenças significativas para quatro variedades: RB85-5156, SP81-3250, CTC 3 e CTC 15. Sempre que a diferença foi significativa, a população de AR foi agrupada entre as que provocaram maiores %PA (Tabela 5).

Tabela 5 – Porcentagem de pústulas abertas (21 dias após a inoculação) avaliadas em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO). Dados médios de dois experimentos

Variedade	Local de coleta					
	Piracicaba-SP PI	Araras-SP AR	Ribeirão Preto-SP RP	Paranacity-PR PR	Nova Alvorado do Sul-MS NA	Dourados-MS DO
SP89-1115	97,91 aA*	95,27 aA	90,52 aA	96,95 aA	92,44 aA	90,59 aA
RB85-5156	31,53 cC	67,06 cA	16,95 cD	67,70 cA	37,91 cC	54,24 cB
SP81-3250	22,29 dC	89,29 bA	1,13 dD	0,89 eD	24,88 dC	44,89 dB
RB86-7515	0,00 eA	0,94 dA	0,00 dA	0,00 eA	0,00 eA	0,00 eA
CTC 3	95,80 aA	95,54 aA	92,80 aA	95,40 aA	84,39 bB	84,78 aB
CTC 6	0,31 eA	1,25 dA	0,00 dA	0,00 eA	0,00 eA	1,36 eA
CTC 15	60,96 bB	72,06 cA	29,22 bC	78,31 bA	30,26 dC	64,12 bB
RB92-5211	-	-	33,24 bB	61,08 cA	-	-
RB96-6928	-	-	0,00 dA	0,00 eA	-	-
CTC 8	-	-	36,43 bA	67,71 cA	-	-
CTC 9	-	-	88,12 bB	76,13 aA	-	-
CTC 13	-	-	38,27 bB	76,46 bA	-	-
CTC 18	-	-	0,00 dA	23,77 dA	-	-

*Valores em uma mesma linha seguidos por letras maiúsculas idênticas e valores em uma mesma coluna seguidos por letras minúsculas idênticas, não diferem entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

O teste Scott-Knott (a 5% significância) apresentado na Tabela 6, separou a as combinações entre as variedades de cana-de-açúcar e as populações de *P. kuehnii* utilizadas em nove grupos. Considerando as três classificações de resistência de plantas a patógeno (resistente, intermediária e suscetível) (Tabela 1), observa-se que nos agrupamentos 1 e 2 ocorreu o predomínio das variedades suscetíveis SP89-1115 e CTC 3. Nestes grupos estão inseridas as variedades que apresentaram mais de 80% de pústulas abertas. Nos agrupamentos de 3 a 8, predominaram as variedades intermediárias CTC 8, CTC 9, CTC 13, CTC 15, CTC 18, RB85-5156, RB92-5211, as quais apresentaram de 16 a 79% de pústulas abertas. No agrupamento 9 predominaram as resistentes CTC 6, RB86-7515 e RB96-6928, que apresentaram menos de 2% de pústulas abertas ou mesmo nenhuma pústula aberta (Tabela 6).

A variedade SP81-3250, considerada intermediária pelos programas de melhoramento (Tabela 1), foi agrupada pelo teste Scott-Knott nas três divisões citadas no parágrafo anterior: mais de 89% PA quando inoculada com a população de *P. kuehnii* oriunda de AR e contrariamente, 1,13% e 0,89% quando inoculada com as populações oriundas de RP e PR, respectivamente. Nas inoculações com as populações de DO, NA e PI, o teste a colocou nos agrupamentos intermediários: 44,89%, 24,88% e 22,49% de pústulas abertas, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Agrupamento das 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com as seis populações de *P. kuehnii* em função da porcentagem de pústulas abertas (%PA) 21 após a inoculação (continua)

Variedade	Identificação da população	Local de coleta	% PA*	Agrupamento**
SP89-1115	PI	Piracicaba (SP)	97,91	1
SP89-1115	PR	Paranacity (PR)	96,95	
CTC 3	PI	Piracicaba (SP)	95,80	
CTC 3	AR	Araras (SP)	95,54	
CTC 3	PR	Paranacity (PR)	95,40	
SP89-1115	AR	Araras (SP)	95,27	
CTC 3	RP	Ribeirão Preto (SP)	92,80	
SP89-1115	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	92,44	
SP89-1115	DO	Dourados (MS)	90,59	2
SP89-1115	RP	Ribeirão Preto (SP)	90,52	
SP81-3250	AR	Araras (SP)	89,29	
CTC 9	RP	Ribeirão Preto (SP)	88,12	
CTC 3	DO	Dourados (MS)	84,78	
CTC 3	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	84,39	
CTC 15	PR	Paranacity (PR)	78,31	3
CTC 13	PR	Paranacity (PR)	76,46	
CTC 9	PR	Paranacity (PR)	76,13	
CTC 15	AR	Araras (SP)	72,06	
CTC 8	PR	Paranacity (PR)	67,71	4
RB85-5156	PR	Paranacity (PR)	67,70	
RB85-5156	AR	Araras (SP)	67,06	
CTC 15	DO	Dourados (MS)	64,12	
RB92-5211	PR	Paranacity (PR)	61,08	5
CTC 15	PI	Piracicaba (SP)	60,96	
RB85-5156	DO	Dourados (MS)	54,24	
SP81-3250	DO	Dourados (MS)	44,89	6
CTC 13	RP	Ribeirão Preto (SP)	38,27	
RB85-5156	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	37,91	
CTC 8	RP	Ribeirão Preto (SP)	36,43	
RB92-5211	RP	Ribeirão Preto (SP)	33,24	7
RB85-5156	PI	Piracicaba (SP)	31,53	
CTC 15	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	30,26	
CTC 15	RP	Ribeirão Preto (SP)	29,22	
SP81-3250	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	24,88	8
CTC 18	PR	Paranacity (PR)	23,77	
SP81-3250	PI	Piracicaba (SP)	22,29	
RB85-5156	RP	Ribeirão Preto (SP)	16,95	
CTC 6	DO	Dourados (MS)	1,36	9
CTC 6	AR	Araras (SP)	1,25	
SP81-3250	RP	Ribeirão Preto (SP)	1,13	
RB86-7515	AR	Araras (SP)	0,94	

Tabela 6 – Agrupamento das 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com as seis populações de *P. kuehnii* em função da porcentagem de pústulas abertas (%PA) 21 após a inoculação (conclusão)

Variedade	Identificação da população	Local de coleta	% PA*	Agrupamento**
SP81-3250	PR	Paranacity (PR)	0,89	
CTC 6	PI	Piracicaba (SP)	0,31	
CTC 18	RP	Ribeirão Preto (SP)	0,00	
RB86-7515	RP	Ribeirão Preto (SP)	0,00	
CTC 6	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	0,00	
CTC 6	RP	Ribeirão Preto (SP)	0,00	
CTC 6	AR	Araras (SP)	0,00	**9**
RB86-7515	PR	Paranacity (PR)	0,00	
RB96-6928	RP	Ribeirão Preto (SP)	0,00	
RB96-6928	PR	Paranacity (PR)	0,00	
RB86-7515	DO	Dourados (MS)	0,00	
RB86-7515	PI	Piracicaba (SP)	0,00	
RB86-7515	NA	Nova Alvorada do Sul (MS)	0,00	

*Dados dos dois experimentos.
**Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Aos 11 dias após a inoculação (DAI), as variedades SP89-1115 e CTC 3 já apresentaram maiores valores de %PA do que as demais, com exceção da população de *P. kuehnii* coletada em AR na variedade SP81-3250, que também apresentou maior %PA aos 11 dias (mais de 40%PA). Aos 21 dias a %PA nesta variedade foi superior a 89%, valor próximo ao das variedades suscetíveis, SP89-1115 e CTC 3. Nas inoculações com as populações de *P. kuehnii* de PI, DO e NA, o comportamento da SP81-3250, desde os 11 dias após a inoculação foi semelhante ao comportamento das variedades intermediárias, RB85-5156 e CTC15. Já nas inoculações com esporos de *P. kuehnii* coletados em PR e RP, de 11 DAI até ao final do experimento (21 DAI), a %PA foi baixa. Não houve contagem de %PA aos 16 dias após a inoculação quando se inoculou a população coletada em DO (Figura 4).

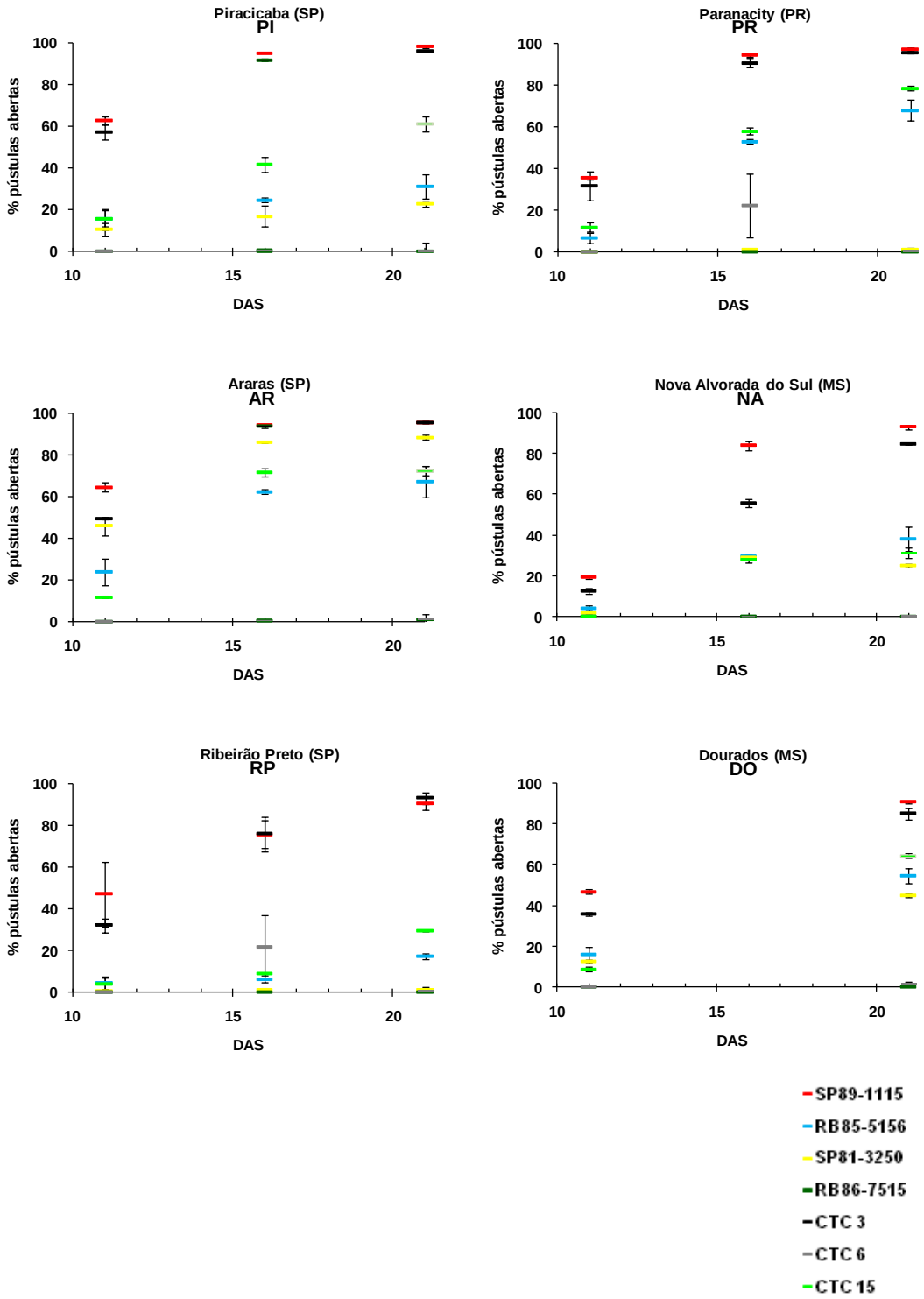


Figura 4 – Porcentagem de pústulas abertas de ferrugem alaranjada avaliadas em 7 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO). Avaliações aos 11, 16 e 21 dias após a inoculação (DAI). Média dos dois experimentos.

2.3.6 Diversidade genética entre as populações de *P. kuehnii*

Os resultados gerados entre as diferentes populações de *P. kuehnii* foram semelhantes nas duas regiões sequenciadas, ITS e IGS. No entanto, para a região ITS foi possível identificar quatro principais agrupamentos, enquanto na região IGS formaram-se três. Em ambas as regiões sequenciadas, as seis populações de *P. kuehnii* se posicionam no maior agrupamento, junto de populações de *P. kuehnii* oriundas da Austrália, Papua Nova Guiné, Indonésia, Filipinas, Japão, China, Guatemala, Panamá, Jamaica, Costa Rica, Nicaraguá, México e Estados Unidos (ITS) e Austrália, Indonésia e China (IGS). Os valores de probabilidade posterior para os principais clados da região ITS variam de 0,55 a 1,00 (Figura 5) e de 0,98 a 1,00 para a região IGS (Figura 6).

Na análise da região ITS as populações BPI79612 (Austrália) e BPI79624 (Havaí, EUA) coletadas em 1935 e 1916, respectivamente, constituem um clado bem distinto. Ainda nessa região, todas as populações de *P. kuehnii* oriundas do continente americano agrupam-se em um mesmo clado. Em contrapartida, populações de *P. kuehnii* oriundas da Ásia e Oceania estão presentes em todos os clados definidos na árvore (Figura 5).

Para a região IGS, a maioria das populações de *P. kuehnii* oriundas da Austrália se situa no grupo 1, juntamente com as populações brasileiras de *P. kuehnii* utilizadas neste trabalho. Populações de *P. kuehnii* da Indonésia utilizadas para construção da árvore filogenética se posicionam em todos os três principais clados. Nas duas árvores construídas, a população BRIP45350 da Indonésia apresenta maior distância em relação às demais que se situam no mesmo agrupamento (1) (Figuras 5 e 6).

ITS

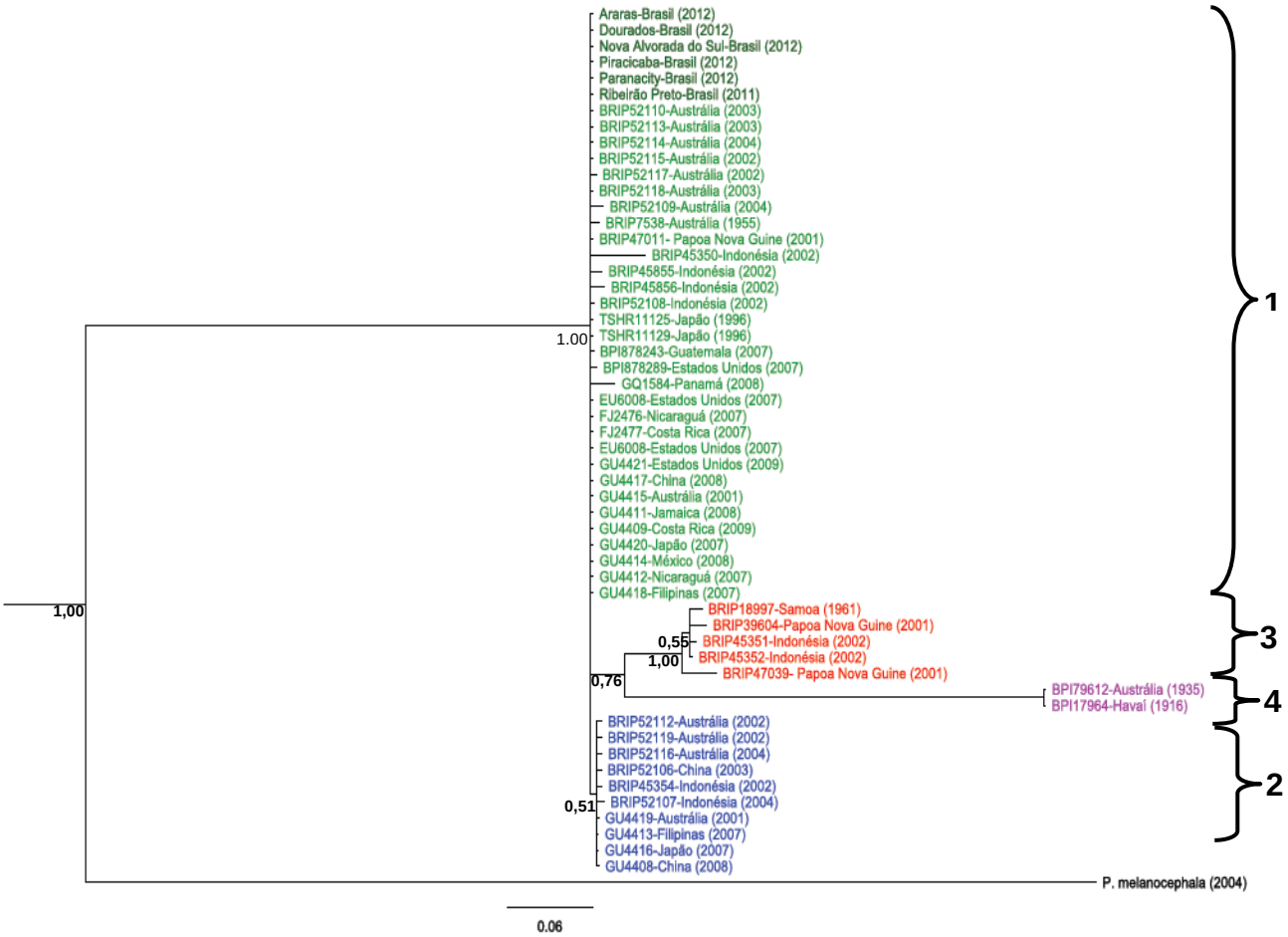


Figura 5 – Árvore filogenética da análise bayesiana da região ITS de *Puccinia kuehnii*, enraizada com *Puccinia melanocephala*. O suporte para cada um dos principais clados (probabilidade posterior) é indicado abaixo dos nós mais relevantes

IGS

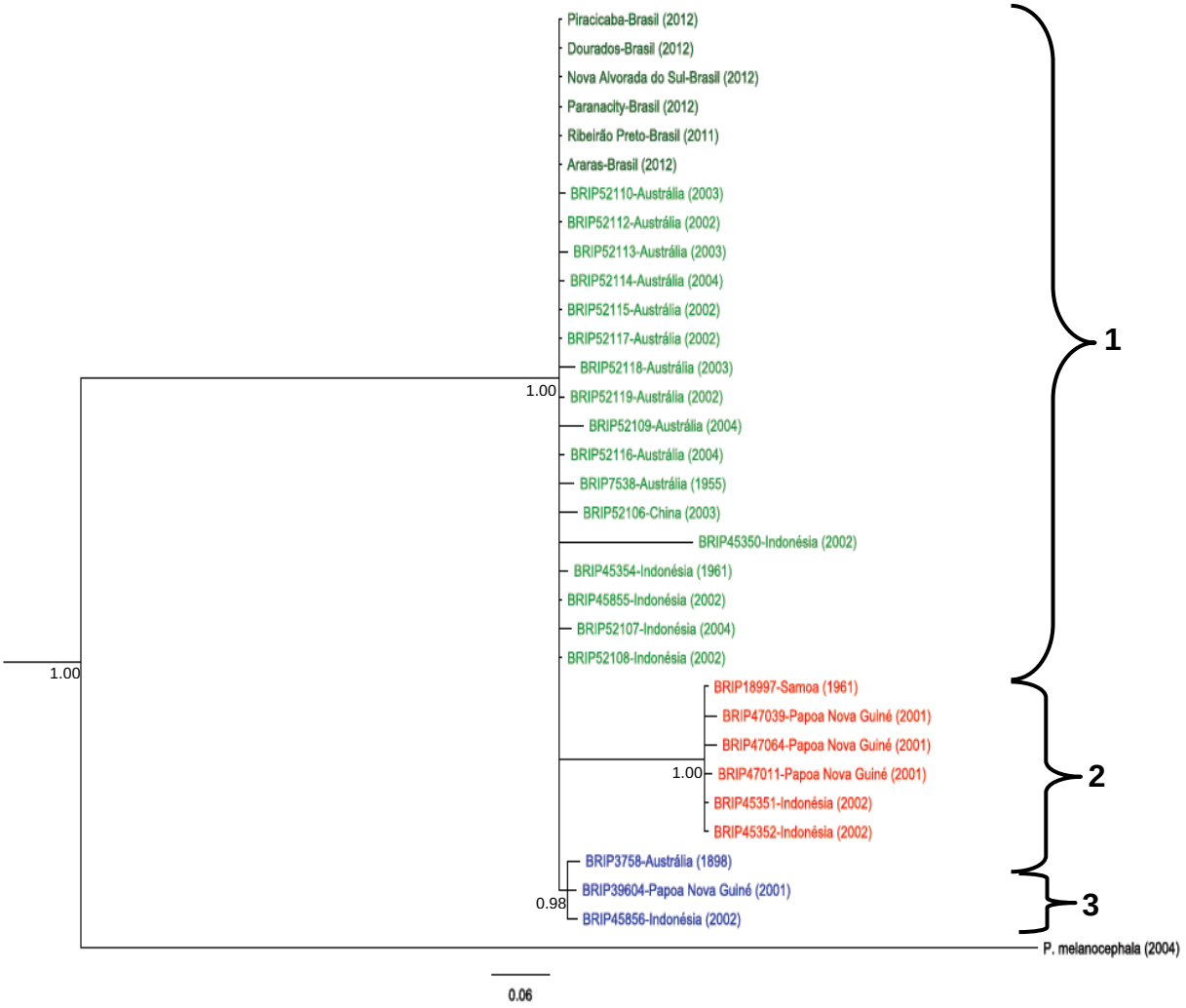


Figura 6 – Árvore filogenética da análise bayesiana da região IGS de *Puccinia kuehnii*, enraizada com *Puccinia melanocephala*. O suporte para cada um dos principais clados (probabilidade posterior) é indicado abaixo dos nós mais relevantes

2.4 Discussão

Raças de um patógeno correspondem a variantes dentro de uma mesma espécie, definidas com base em seu espectro de ação contra um conjunto de variedades (CAMARGO, 2011). Dentro de tais variações podem ocorrer dois tipos de raças: agressivas e virulentas (VANDERPLANK, 1968). O surgimento de uma nova raça virulenta se dá quando há a presença de um genótipo mutante do patógeno capaz de quebrar a resistência de uma determinada variedade (CAMARGO, 2011) e há evidentemente interação diferencial entre diferentes isolados de um patógeno e diferentes variedades do hospedeiro (ROBINSON, 1987; VANDERPLANK, 1968). Contrariamente, raças do patógeno que não interagem diferencialmente com as variedades do hospedeiro,mas podem variar na agressividade, correspondem às raças agressivas (VANDERPLANK, 1968).

Os parâmetros avaliados neste trabalho mostraram que as diferenças patogênicas encontradas entre as seis populações de *Puccinia kuehnii* não foram suficientes para detectar uma nova raça virulenta do patógeno no Brasil, ou seja, não houve interação diferencial entre as populações de *P. kuehnii* e as variedades de cana-de-açúcar e, portanto, o *ranking* de resistência das variedades foi constante. No entanto, apesar de o *ranking* de resistência das variedades ter sido constante, as diferenças patogênicas encontradas entre as seis populações de *P. kuehnii* foram suficientes para detectar uma raça mais agressiva do patógeno no Brasil.

Vanderplank (1963) classificou a resistência do hospedeiro em horizontal e vertical. Se correlacionarmos os dois tipos de resistência propostos por Vanderplank (1963) com a teoria gene-a-gene (FLOR, 1942), podemos inferir que a teoria gene-a-gene seria o eixo que sustenta a resistência vertical e está intimamente ligada, em grande parte dos casos, à ocorrência de interação diferencial entre patógeno e hospedeiro. Tanto a teoria gene-a-gene quanto a interação diferencial estão ausentes na resistência horizontal (ROBINSON, 1987), indicando o predomínio deste tipo de resistência nas variedades de cana-de-açúcar, com significativa atuação quantitativa de genes com efeitos menores. De fato, a literatura existente sobre o tema corrobora esta interpretação. Klosowski (2012) avaliou a severidade da ferrugem alaranjada em oito progênies oriundas de genitores de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis. Este autor testou a hipótese formulada por Daugrois et al.

(1996) de que a resistência à ferrugem marrom seria controlada por um único gene de efeito principal (segregação mendeliana 3:1) e concluiu que apenas uma das oito progênies esteve de acordo com a hipótese proposta por Daugrois et al. (1996). Inúmeros outros exemplos de resistência poligênica de gramíneas a ferrugens já foram descritos (WESP et al., 2008; BROERS; JACOB, 1989; KIM; BREWBAKER, 1977). Apesar de existirem estudos que sugerem o efeito monogênico da resistência da cana-de-açúcar à ferrugem marrom (RAMDOYAL et al., 2000; DAUGROIS et al., 1996), para Robinson (1987) o melhoramento em cana-de-açúcar para resistência envolve heranças poligênicas, não sendo comum a ocorrência de caracteres herdados monogeneticamente. Os diferentes níveis de resistência das variedades de cana-de-açúcar às diferentes populações de *P. kuehnii*, manifestados nos parâmetros avaliados no presente trabalho, indicam uma possível contribuição de mais de um gene na resistência das plantas a *P. kuehnii*.

Apesar da ausência de raças virulentas de *P. kuehnii*, as diferenças encontradas tanto entre as populações de *P. kuehnii* (detecção de uma raça mais agressiva do patógeno), quanto no comportamento das variedades de cana-de-açúcar merecem ser destacadas. Além disso, na intrínseca relação entre a fitopatologia e o melhoramento genético de cana-de-açúcar, é elementar conhecer e adotar os critérios que melhor separam as variedades quanto ao grau de resistência à *P. kuehnii*.

Dentro dos parâmetros avaliados neste trabalho, o período de incubação forneceu diferenças menos pronunciadas, impedindo uma distinção clara do grau de resistência ao patógeno das variedades utilizadas. Para todas as situações avaliadas, tanto entre variedades quanto entre populações de *P. kuehnii*, o período de incubação variou de 7 a 10 dias (Figura 2). Considerando que este período corresponde ao tempo para o patógeno se desenvolver (VANDERPLANK, 1963) e, portanto, está intimamente ligado ao tempo de colonização da planta pelo mesmo, os resultados mostraram que, nas condições em que os experimentos foram conduzidos, os componentes da resistência das variedades de cana-de-açúcar não influenciam significativamente o tempo para que ocorra a expressão dos sintomas da doença. Em outros patossistemas, as diferenças no período de incubação são mais acentuadas. SUBRAHMANYAM et al., (1983) mostraram que em genótipos de amendoim mais resistentes,a colonização de *Puccinia arachidis* é mais lenta e, como consequência, o período de incubação da doença é mais longo quando comparado

a genótipos intermediários e suscetíveis. Na avaliação de genótipos de trigo, Sareen et al. (2012) verificaram que as variedades suscetíveis a *Puccinia triticina* apresentaram curtos períodos de incubação e as resistentes, períodos longos.

Nas avaliações da latência da ferrugem alaranjada, maiores diferenças foram encontradas. O intervalo de variação do período de latência nas variedades de cana-de-açúcar foi bem maior que o período de incubação: 9 a 19 dias. As variedades suscetíveis e intermediárias apresentaram períodos de latência curtos (10 a 12 dias), principalmente quando inoculadas com as populações oriundas de PI e PR, diferentemente das variedades resistentes RB86-7515, CTC 6 e CTC 18 (Tabela 1), cujos períodos de latência foram mais longos: 16 a 18 dias (Figura 3). Essa diferença mostra que este parâmetro é um componente da resistência expresso fortemente nas variedades resistentes. A variedade RB96-6928 foi a única que não apresentou pústulas abertas em nenhuma das repetições. Via de regra, a resistência é considerada baixa quando os períodos de latência e de incubação são curtos e alta quando tais períodos são longos (KRANZ, 2002).

Geralmente, os períodos de incubação e de latência são sensíveis a alterações na temperatura, ao nível de resistência quantitativa, à idade da planta, à densidade do inóculo, ao estado nutricional, entre outros fatores (KRANZ, 2002). Diversos estudos envolvendo o período de incubação e de latência de ferrugens mostram que as condições ambientais - principalmente temperatura - exercem significativa influência sobre esta variável (BARRERA; HOY; LI, 2012; GHINI et al., 2011; XU, 1999; ZANDVOORT; GROENEWEGEN; ZADOKS, 1968). No presente trabalho o período de incubação mostrou-se mais curto do que o período de latência, indicando não haver uma boa correlação entre ambos. Os dois parâmetros e não apenas um destes, como aconselhado para outros patossistemas (SINGH, PARK, McINTOSH, 2007; SINGH, PAYNE, RAJARAM, 1991), devem ser considerados na avaliação de genótipos de cana-de-açúcar em programas de melhoramento. Em muitos casos, os períodos de latência e incubação têm sido correlacionados com a taxa de progresso e a severidade de ferrugens no campo (SACKETT; MUNDT, 2005; LEHMAN; SHANER, 1996; JOHNSON; WILCOXSON, 1979), além da relativa facilidade e rapidez na determinação destes parâmetros (ROUMEN, 1996; BROERS; JACOBS; 1989; PARLEVLIET et al., 1980).

A avaliação da severidade da doença, mesmo que bastante variável entre os experimentos, apesar da aplicação do fator de correção mencionado no item 2.3.3,

mostrou maiores níveis de doença nas variedades suscetíveis CTC 3 e SP89-1115 e nas variedades intermediárias SP81-3250 e CTC 9. Já na contagem do total de pústulas, há a primeira evidencia de ocorrência de uma raça mais agressiva constituída pela população de *P. kuehnii* coletadas em AR. Porém, a contagem do número total de pústulas se mostrou não ser o parâmetro mais seguro para avaliar e classificar a resistência de genótipos de cana-de-açúcar ao patógeno, uma vez que até mesmo as variedades resistentes como a RB86-7515 e a CTC 6, apresentaram em algumas situações um elevado número de pústulas que reflete na severidade da doença (Tabela 4).

O parâmetro que melhor evidencia a separação das variedades quanto ao grau de resistência ao patógeno e as populações de *P. kuehnii* quanto à agressividade é a porcentagem de pústulas abertas (%PA). É com base neste parâmetro que se observa uma maior agressividade da população de *P. kuehnii* coletada em AR, que fica mais evidente na variedade SP81-3250 (uma das mais plantadas no Estado de São Paulo), a qual apresentou quase 90% PA. Além disso, os resultados apresentados nas Tabelas 5 e 6 mostram que o parâmetro %PA é o mais seguro para separar as variedades quanto ao grau de resistência ao patógeno. Variedades suscetíveis, como a SP89-1115 e a CTC 3 (Tabela 1), apresentaram elevada %PA (acima de 84%). Em contrapartida, as variedades resistentes apresentaram %PA abaixo de 2% ou nem apresentaram pústulas abertas (Tabela 5). A maior amplitude de %PA está entre as variedades de reação intermediária (16% a 76% PA).

No caso específico da variedade SP81-3250, verifica-se latência de 10 a 12 dias (Figura 2), severidade acima de 10% (Figura 3) e mais de 80% PA quando inoculada com a população de AR (Tabela 5). Tais resultados mostram que esta variedade, considerada de reação intermediária, parece acentuar as diferenças existentes entre as populações de *P. kuehnii* coletadas em AR das demais na análise do total de pústulas e % PA.

A seleção de clones resistentes às ferrugens nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar baseia-se basicamente na avaliação da severidade dos sintomas, dada a praticidade desta técnica (SANTOS, 2003). Alternativamente, um simples parâmetro, como o número de lesões por planta, pode ser usado para ranquear o hospedeiro de acordo com a resistência horizontal (presente na cana-de-açúcar) do mesmo. Além disso, tais avaliações, quando

realizadas em condições controladas, como no presente trabalho, são mais precisas do que avaliações feitas no campo, uma vez que todas as variáveis climáticas são acuradamente controladas (ROBINSON, 1987). Como exemplo da aplicação de outros parâmetros para avaliar a resistência de plantas, Parlevliet et al. (1984) utilizaram o número de urédias de *Puccinia hordei* por planta de cevada para separar as variedades quanto ao grau de resistência horizontal ao patógeno. Nesse sentido, a adoção da %PA de ferrugem alaranjada por planta de cana-de-açúcar pelos programas de melhoramento seria uma alternativa para ranquear as variedades e evitar a eliminação de clones que apresentem apenas pústulas fechadas ou baixo número de pústulas abertas. Este método poderia favorecer a seleção para resistência horizontal, a qual é mais durável e efetiva. Outra vantagem na adoção deste parâmetro seria a rapidez na obtenção do resultado, pois com apenas 11 dias após a infecção já é possível distinguir as variedades resistentes das demais e, 16 dias após a infecção,separar as suscetíveis das intermediárias (Figura 4).

Assim, com base nos resultados do presente estudo, propõe-se um sistema de auxílio na avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar promissoras pelos programas de melhoramento: avaliar, 20 dias após as inoculações, a porcentagem de pústulas abertas em porções de 10 a 20 cm de folha. Baseado nos resultados expostos na Tabela 6 e adotando-se uma margem de segurança aproximada de 8% para mais e para menos, usar o limiar de 80% PA para separar as variedades suscetíveis das intermediárias e um limiar de 10% para separar as variedades intermediárias das resistentes.

A análise molecular mostrou que não há diferenças nas regiões ITS e IGS entre as seis populações de *P. kuehnii* utilizadas no presente trabalho. Apesar de estas regiões serem conservadas, representarem apenas um pequeno fragmento do genoma completo do patógeno e as variações não poderem distinguir populações mais próximas (BRAITHWAITE et al, 2009), a árvore filogenética de *P. kuehnii* revelou quatro agrupamentos na região ITS (Figura 5) e três distintos na região IGS (Figura 6). A análise das duas árvores filogenéticas geradas permite sugerir diferenças no tempo e no espaço entre populações de *P. kuehnii*. Na região IGS, as seis populações de *P. kuehnii* coletadas no Brasil e as populações coletadas na Austrália após a epidemia de 2001 (MAGAREY et al., 2001) posicionam-se no maior agrupamento. Braithwaite et al. (2009) argumentam que a rara presença de

teliósporos de *P. kuehnii* (VIRTUDAZO, NOJIMA, KAKISHIMA, 2001b) impossibilita a ocorrência de recombinações sexuais. Por isso, sugere que a região IGS seqüenciada das populações australianas de *P. kuehnii* representam um único genótipo dominante. Tal fato também pode ser estendido para as populações brasileiras de *P. kuehnii* utilizadas neste estudo.

A quebra de resistência na variedade Q124 em 2000 na Austrália pode ter sido provocada por uma simples mutação, produzindo uma nova raça de *P. kuehnii* que teria se disseminado rapidamente pelo país (BRAITHWAITE et al., 2009). Aliás, na árvore construída para a região ITS, observa-se que a população 'BPI79612' se posicionou bem distante das demais da Austrália (Figura 5). Esta população foi coletada em 1935 (Tabela 2), ou seja, anterior à epidemia ocorrida no ano 2000. Já as populações de *P. kuehnii* originadas da Indonésia, centro de origem do patógeno, estão presentes nos três agrupamentos, indicando possíveis variações no patógeno ao longo do tempo e do espaço. Na região ITS, novamente todas as populações de *P. kuehnii* coletadas no Brasil e a maioria de origem australiana se posicionam no maior agrupamento. Como já detectado por Braithwaite et al. (2009), as populações da Indonésia indicam mais uma vez maior diversidade por estarem presentes nos três maiores agrupamentos. Ainda segundo esses autores, as populações oriundas da Indonésia foram coletadas tanto em canas selvagens quanto em híbridos comerciais e as populações de Papua Nova Guiné (presente em dois agrupamentos) apenas de plantas de cana selvagens.

Ainda na região ITS, observa-se que todas as populações coletadas nas Américas do Norte, Central e do Sul se encontram no mesmo clado. Este resultado corrobora com o descrito por Glynn et al. (2010) que analisaram essa mesma região do DNAr de populações de *P. kuehnii* de diversos países localizados nos dois hemisférios leste e oeste, e constataram que todas as amostras possuem o alelo 183A, enquanto o alelo 183G não foi observado em amostras coletadas em países localizados no hemisfério oeste, e detectado apenas nas amostras de *P. kuehnii* coletadas na Ásia e Oceania.

As informações geradas neste estudo pelas análises moleculares em associação com informações da literatura (GLYNN et al., 2010; BRAITHWAITE et al., 2009), permitem inferências sobre a disseminação do patógeno, principalmente após a epidemia de 2000 na Austrália (MAGAREY et al., 2001) e a detecção de *P. kuehnii* em diversos países do continente americano. A dispersão natural de

patógenos para locais distantes de sua origem pode ocorrer através de uma única invasão (evento raro) ou ocorrer gradualmente, apesar de serem eventos que podem ser causados pelo mesmo processo de dispersão (BROWN; HOVMOLLER, 2002). Para a ferrugem marrom da cana-de-açúcar, a hipótese mais aceita é que esporos de *P. melanocephala* teriam entrado (de uma única vez) no continente americano (na República Dominicana) através de ventos ciclônicos vindos de Camarões, país localizado no oeste da África, onde a doença já havia sido detectada. Já a dispersão por todo o continente americano, após a detecção na República Dominicana, teria sido gradual. Na Austrália, a hipótese mais aceita sobre a origem da fonte de inóculo responsável pela epidemia de ferrugem marrom no país em 1978 é a de que os esporos de *P. melanocephala* teriam vindo em correntes de ventos oriundos do Caribe (PURDY et al., 1985).

Apesar das semelhanças com a dispersão da ferrugem marrom, as rotas percorridas pelos esporos de *P. kuehnii* ao longo do tempo parece ser diferente. Os primeiros relatos do patógeno foram na Ásia e Oceania no início do século XX e provavelmente por lá ficou por quase um século sem causar epidemias ou mesmo se disseminar para outras partes do mundo. Após a epidemia da doença na Austrália em 2000, o primeiro relato da doença além daquela região (Ásia e Oceania) foi em 2007 nos EUA (COMSTOCK et al., 2008). Ainda não se sabe com precisão qual a rota percorrida pelos esporos durante os sete anos que se passaram após a epidemia na Austrália. Para Glynn et al. (2010) a ferrugem alaranjada permaneceu em alguma localidade entre os dois continentes (Figura 7 - pontos de interrogação vermelhos) e não foi detectada nesse período devido a possíveis confusões com a ferrugem marrom já distribuída por todo o globo, ou mesmo teria sido introduzida repentinamente e ilegalmente através de folhas infectadas. As árvores filogenéticas apresentadas no presente estudo (IGS e ITS) mostram que a disseminação para o hemisfério oeste partiu provavelmente de esporos que causaram a epidemia na Austrália em 2000, pela similaridade destes com amostras coletadas no Brasil, EUA e países da América Central (Figuras 5 e 6). Após a detecção da doença nos EUA em 2007 (COMSTOCK et al., 2008) a mais provável hipótese para a disseminação dos esporos de *P. kuehnii* para os outros países do continente é a de que esta tenha sido gradual e em direção à América Central até a doença ser relatada no Brasil no final de 2009 por Barbasso et al. (2010) (Figura 7 – rota vermelha). Em 2011 a doença foi detectada pela primeira vez no continente

africano (SAUMTALLY et al., 2011) e ainda não se sabe se os esporos teriam vindo do continente americano ou da Ásia e/ou Oceania (Figura 7 – pontos de interrogação verdes).

Portanto, a elevada similaridade genética das populações de *P. kuehnni* que predominam nos principais países produtores de cana-de-açúcar e a baixa variabilidade patogênica entre as populações do patógeno localizadas na região Centro-sul, aliados à confiabilidade de parâmetros como a porcentagem de pústulas abertas e o período de latência, contribui para a seleção de genótipos com resistência à ferrugem alaranjada nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil, principalmente nos programas voltados para a resistência poligênica, por ser mais eficaz, duradoura e predominar na cultura.

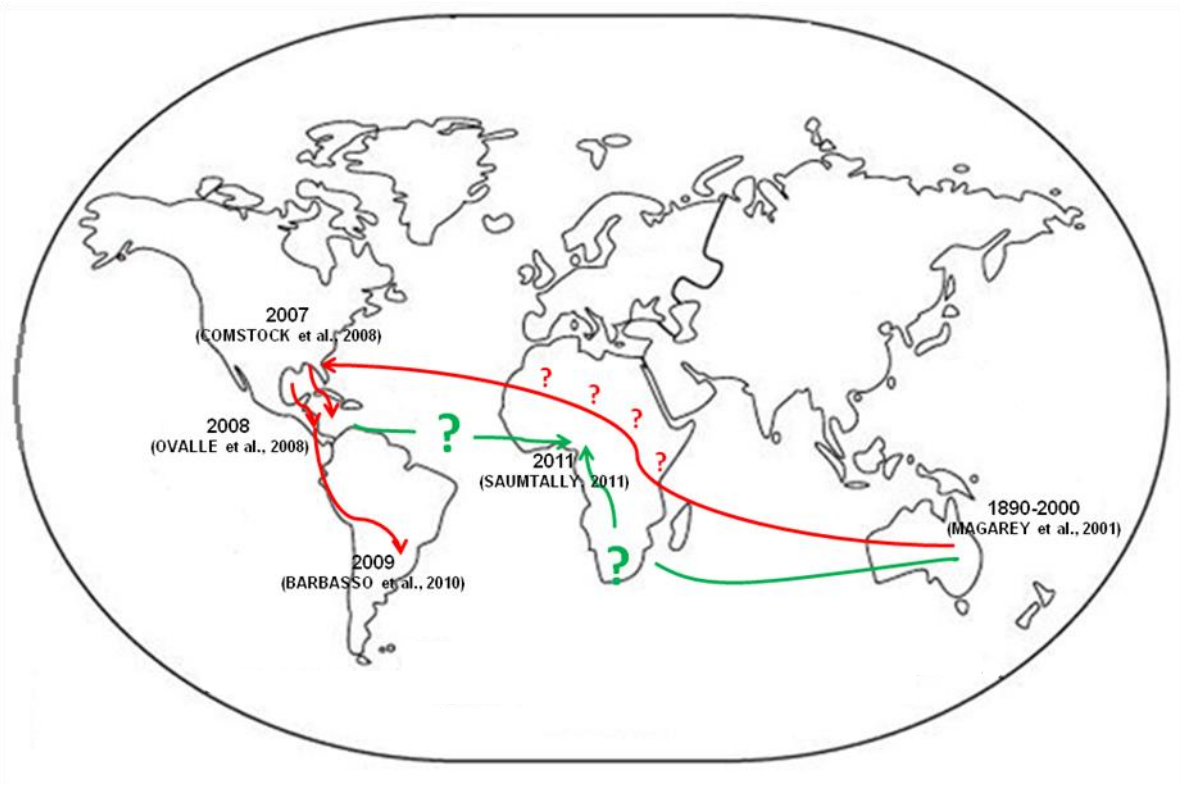


Figura 7 – Rotas possíveis (em vermelho) dos esporos de *Puccinia kuehnii* após a epidemia ocorrida na Austrália no ano 2000. Pontos de interrogação em vermelho representam a incerteza se a doença teria sido introduzida no hemisfério oeste diretamente da Austrália ou se teria passado por algum local entre a Oceania e a América. Linhas e pontos de interrogação em verde representam as possíveis rotas dos esporos na África, onde foram detectados em 2011

3 CONCLUSÕES

Não foram detectadas diferentes raças virulentas de *Puccinia kuehnii* entre as seis populações do patógeno coletadas em diferentes locais no Brasil e sim, raças agressivas de *P. kuehnii*.

A população de *P. kuehnii* coletada em Araras (SP) constitui uma raça mais agressiva do patógeno.

As seis populações de *P. kuehnii* utilizadas no presente trabalho apresentam a mesma sequência de nucleotídeos nas regiões ITS e IGS, as quais são idênticas às sequências de *P. kuehnii* encontradas na Austrália, China, Costa Rica, Estados Unidos, Filipinas, Guatemala, Indonésia, Japão, México, Nicaraguá e Papua Nova Guiné, mas diferem de outras sequências encontradas na Austrália, Indonésia, Papua Nova Guiné, Samoa e Havaí (EUA).

A porcentagem de pústulas abertas (%PA) é o parâmetro que melhor distingue as variedades de cana-de-açúcar quanto ao grau de resistência a *P. kuehnii* e, por isso, pode ser utilizada nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar visando a seleção de genótipos com resistência poligênica a *P. kuehnii*.

REFERÊNCIAS

ATIENZA, C.S.; QUMIO, A.J. Reactions to rust of sugarcane clones and varieties in the Philippines. **Sugarcane Pathologists' Newsletter**, Havaí, n. 29, p. 3-10, 1982.

BARBASSO, D.; JORDÃO H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J.; SANGUINO, A. 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.

BARRERA, W.; HOY, F.; LI, B. Temperature and leaf wetness on infection of sugarcane by *Puccinia melanocephala*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 160, p. 294-298, 2012.

BERDING, N.; HOGARTH, M.; COX, M. Plant improvement of sugarcane.In: JAMES, G. **Sugarcane**. 2nd. Ames: Blackwell Science, 2004, p. 20-53.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. Importância das doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011.v.1, p. 19-36.

BROWN, J.K.M.; HOVMOLLER, M.S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. **Science**, Washington, v. 297, p. 537-541, 2002.

BRAITHWAITE, K.S.; CROFT, B.J.; MAGAREY, C.; SCHARASCHKIN, T. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Perth, v. 39, p. 380-388, 2009.

BRAITHWAITE, K.S. Assessing the impact that pathogen variation has on the sugarcane breeding program. **Final Report-SRDC Project BSS258**, BSES, Brisbane, 2005.

BROERS, L.H.M.; JACOBS, T.H. The inheritance of host plant effect on latency period of wheat leaf rust in spring wheat. I: Estimation of gene action and number of effective factors in F1, F2 and backcross generations. **Euphytica,** Wageningen**,**v. 44, p. 197-206, 1989.

CADAVID, M.; ANGEL, J.C.; VICTORIA, J.I. First report of Orange rust of sugarcane caused by *Puccnia kuehnii* in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, n.1,p. 143.1, 2012.

CAMARGO, L.E.A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. v.1, p. 325-341.

CANTERI, M.G.; GIGLIOTI, E.A.; ARAÚJO, K.L.; NEUBAUER, R.A., SANCHES, P.R.B., SUMIDA, C.H. Eficiência de fungicidas no controle da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA,45., 2012. Manaus, AM, **Anais...**Lavras: Editora, , 2012.p.662.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. **Relatório Técnico**. Piracicaba, 2011.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. **Variedades CTC**. Piracicaba, 2012. Disponível em:<http://www.ctcanavieira.com.br/downloads/variedades2012_FINAL.pdf>. Acesso em: 13 jan.2013.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. **Mapa das ocorrências da ferrugem alaranjada no Brasil**. Piracicaba, 2010. Disponível em:http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=485&Itemid=1276. Acesso em: 11 fev.2011.

CHAVARRÍA, E.; SUBIROS, F.; VEGA, J.; RALDA, G.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; CASTLEBURY, A. First report of orange rust caused by *Puccinia kuehnii* in Cosa Rica and Nicaragua. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 4, p. 325, 2009.

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.

COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N.C.; WAYNE DAVIDSON, R. Sugarcane rusts in Florida. **Proceedings International Society Sugar Cane Technologists**, Florida, v. 27, 2010.

COMSTOCK, J.C.; SHINE, J.M.; RAID, N. Effect of early rust infection on subsequent sugar cane growth. **SugarCane**, Florida, v.4, p.7-9, 1992.

COMSTOCK, J.C. Rust: Varietal differences in uredospore production. In: HAWAII SUGAR PLANT. ASSOC. EXP. STN. REP'. 1987. **Proceedings…**, Havaí,1988. p. 40-42,

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar Safra 2010/2011.**Brasília. Segundo levantamento. Outubro 2012.

COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO - COOPERSUCAR. Ferrugem da cana-de-açúcar e sua constatação no município de Capivari. **Boletim Técnico Copersucar,** São Paulo**,** p.1-8, 1986. Edição especial.

CRUZ, M.M.; MONTEIRO, J.H.A.; BARBOSA, G.V.S. Primeiro relato da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia kuehnii*) no nordeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA,45*.,* 2012, Manaus. **Anais...** Viçosa, 2012. p.169.

DALRI, I.B. **Manejo varietal na Usina Iracema**. Grupo São Martinho. Iracemápolis, 2012. Disponível em <http://www.stab.org.br/II_usuario_variedades/08_STAB_IVAN_2012_.pdf>. Acesso em: 5 fev 2013.

DARIO, I.S.N.; SCARSO, L.G.F.; CAPATO, S.B.; PAIÃO, G.D.; DELLA VALLE, F.N.; DARIO, G.J.A. Avaliação dos fungicidas azoxistrobina e azoxistrobina + tebuconazole no controle da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii* Butler) ocorrente na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA,45., 2012. Manaus, AM, **Tropical Plant Pathology**, Lavras, 2012.p.86.

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

DEPARTAMENTO INTERSINDICAL DE ESTUDOS DE ESTATÍSTICA E ESTUDOS SOCIECONÔMICOS – DIEESE. Desempenho do setor sucroalcooleiro brasileiro e os trabalhadores. **Estudos e Pesquisas**, São Paulo,v.3, n. 30, 34p, 2007.

DEAN, J.L.; PURDY, L.H. Races of sugarcane rust fungus, *Puccinia melanocephala* found in Florida. **Sugar Cane**,Florida, v.1, p. 15–16, 1984.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, p. 19-21, 1983.

EDGAR R.C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**. Nucleic Acid Research**, London, v. 35, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FLORES, R.C.; LOYO, J.R.; OJEDA, R.A.; RANGEL, O.C.A.; CÉRON, F.A.; MÁRQUEZ, W.; GUERRA-MORENO, A.S.; HERNANDEZ-IBARRA, H.M.; GONZÁLEZ, R.E.; CASTLEBURRY, L.A.; DIXON, L.J.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; FLYNN, J.; AMADOR, J. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Mexico, El Salvador, and Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 12, p. 1347, 2009.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, p. 653-669, 1942.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – **FAO**. 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em:24 out. 2012.

GIGLIOTI, E.; ZAVAGLIA, L.P.; MENEZES, L.L.; MOURA, G.L.de. MATSUOKA, S. **Resistência e tolerância à ferrugem da cana-de-açúcar:** o caso da RB83-5486. Araras, SP: Universidade Federal de São Carlos- UFSCar-CCA-DBV, 1999. 10p.

GHINI, R.; HAMADA, E.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; GONÇALVES, R.R.V. Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. **Summa Phytopathologica**, Botucatu,v.37, n.2, p.85-93, 2011.

GLYNN, N.C.; DIXON, L.J.; CASTLEBURY, L.A.; SZABO, L.J.; COMSTOCK, J.C. 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**, Oxford, v. 59, p. 703-711, 2010.

GRISHAM, M.P.; HOY, J.W.; HAUDENSHIELD, J.S.; HARTMAN, G.L. First Report of orange rust caused by *Puccinia kuehnii* in sugarcane in Louisiana. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 3, 2013.

HSIEH, W.H.; FANG, J.G. The uredospore production of *Puccinia melanocephala* and *Puccinia kuehnii* in sugarcane. **Plant Protection Bulletin**,Taiwan, v. 25, n. 4, p. 239-244, 1983.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioninformatics**, Oxford, v.17, p.754-755, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE** – Estatística da produção agrícola. 2012. Brasília. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf> .Acesso em: 25jan. 2013.

JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.; LI, S.; VILGALYS, R. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. **Genetics**, Austin, v. 157, p. 149-161, 2001.

JOHNSON, R.; WILCOXSON, R.D. Inheritance of slow rusting of barley infected with *Puccinia hordei* and selection of latent period and number of uredia. **Phytopathology**, Saint.Paul, v. 69, p. 145-151, 1979.

KIM, S.K.; BREWBAKER, J.L. Inheritance of general resistance in maize to *Puccinia sorghi*. **Crop Science**, Madison, v.17, p.456-461, 1977.

KLOSOWSKI, A.C**. Escala diagramática, segregação da resistência em progênies de cana-de-açúcar e reação de cultivares à ferrugem alaranjada** (*Puccinia kuehnii*). 2012. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

KRANZ, J. **Comparative epidemiology of plant diseases**. Berlim: Springer, 2002. 206p.

LEHMAN, J.S.; SHANER, G. Genetic variation in latent period among isolates of Puccinia f. sp. tritici on partially resistant wheat cultivars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 633–641, 1996.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. Saint Paul: APS Press, 2007. 421p.

MAGAREY, R.; WILLCOX, T.; CROFT, B.; CORDINGLY, A. Orange rust, a major pathogen affecting crops of Q124 in Queensland in 2000.In: CONFERENCE OF THE AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS**.**2001. Brisbane. **Proceedings**…Brisbane: Pk Editorial Services, 2001.p. 274-280.

MAGAREY, R.C.; STAIES, T.; WILLCOX, T. Fungicides for control of Orange rust in the 2001 Queensland crop. CONFERENCE OF THE AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 2002. Brisbane. **Proceedings…**Brisbane: Pk Editorial Services, 2002.v.24, p. 269-274.

MARTINS, T.D.; RAID, R.N.; BURNQUIST, W.L.; URASHIMA, A.S.; BERGAMIN FILHO, A.; COMSTOCK, J. Influence of temperature and leaf wetness duration on orange rust of sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 6, p. S78, 2010.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. Pathogen populations genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.40, p.349-379, 2002.

MOZAMBANI, A.E.; PINTO, A.S.; SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E; NÓBREGA, J.C.M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP. 2, 2006. v.1, p. 12-18.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- Secretaria de Produção e Agroenergia (Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia) – **DCAA/SPAE/MAPA**, Brasília, DF, set., 2012.

MINCHIO, C. A.; CANTERI, M.G.; ROCHA, J.A. Germinação de uredósporos de *Puccinia kuehnii* submetidos a diferentes temperaturas e tempos de incubação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.4, p.211-214, 2011.

NEUBAUER, R.A.; SANCHES, P.R.B.; GILIO, T.A.S.; FAGUNDES, C.; BASSAN,B.E.; RODERO, D.P.; RODERO, D.C.P.; ARAÚJO, K.L.; GIGLIOTI, E.A.; CANTERI, M.G. Mapeamento espaço-temporal de zonas de risco para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar (*Puccinia kuehnii*) no Brasil. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011. Bento Gonçalves, RS, **Tropical Plant Pathology**, Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.36 (suplemento), 2011.p.1528.

NEVES, M.F.; PINTO, M.J.A.; CONEJERO, M.A.; TROMBIN, V.G. **Food and Fuel:** the example of Brazil. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2011. p. 41-70.

NUNES JUNIOR, D. **A ferrugem alaranjada chegou, e agora?** Fala Dib. Disponível em:<http://dibnunes.wordpress.com/category/opiniao/page/3/>. Acesso em: 18 dez. 2013.13.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. Seja doutor do seu canavial. **Arquivo do Agrônomo**, Norcross, n. 6, 16p, 1994.

ORTOLAN, M.C.A. Perpectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E; NÓBREGA, J.C.M. de. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP. 2, 2006.v.1, p. 12-18.

OVALLE, W.; COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N.C.; CASTLEBURY, L.A.First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Guatemala. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 973, 2008.

PARLEVLIET, J.E.; LEIJIN, M.; VAN OMMEREN, A. Accumulating polygenes for partial resistance in barley to barley leaf rust, *Puccinia kuehnii*. II: Field Evaluation. **Euphytica**, Wageningen, v. 34, p. 15-20, 1984.

PARLEVLIET, J.E.; LINDHOUT, W.H.; VAN OMMEREN, A.; KUIPER, H.J.Level of partial resistance to leaf rust, *Puccinia hordei* in west european barley and how to select for it. **Euphytica**, Wageningen, v. 29, p. 1-8, 1980.

PÉREZ-VICENTE, L.; MARTÍN-TRIANA, E.L.; BARROSO, F.; MARTÍNEZ-de La PONTE, E.; BORRÁS-HIDALGO, O.; HERNÁNDEZ ESTÉVEZ, I. Definitive identification of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Cuba. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 804, 2010.

PURDY, L.H.; KRUPA, L.H.;DEAN, J.L. Introduction of sugarcane rust into the Americas and its spread to Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, p.689–693, 1985.

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

RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; LIM SHIN SHONG, L.C.Y.; BADALOO, G.H.; SAUMTALLY, S.; DOMAINGUE, R.The genetics of rust resistance in sugarcane seedling populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 100, n. 3/4, p. 557-563, 2000.

ROBINSON, R.A. **Host management in crop pathosystems**. New York: Macmillan Publishing, 1987. 263p.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A.D. Doenças da cana-de-açúcar e seu controle. **Encarte do Informações agronômicas**, Brasília, n. 67, 1994. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/InformacoesAgronomicas_67ID-fdwBc3usO9.pdf>. Acesso em: 16out. 2012.

ROUMEN, E. Response to selection for high and low partial resistance to leaf blast in F2 populations of three rice crosses. **Euphytica**, Wageningen, v. 89, p. 243-248, 1996.

RYAN, C.C.; EGAN, B.T. Rust. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILASPIE Jr., A.G.; HUGHES, C.G. **Diseases of sugarcane – major diseases**. Amsterdã: Elsiever. 1989, p. 189-210.

SACKETT, K.E.; MUNDT, C.C.The effects of dispersal gradient and pathogen life cycle components on epidemic velocity in computer simulations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 992-1000, 2005.

SANTOS, A.S. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar. In:REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO: CATANDUVA, SP: INSTITUTO BIOLÓGICO,9., 2003. 89p. **Anais...** IX REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO - CANA-DE-AÇÚCAR. Instituto Biológico, p. 11-17, 2003. Disponível em:< http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/IX_RIFIB>. Acesso em:23 mar.2013.13.

SAREEN, P.; KUMAR, S.; KUMAR, U.; PRASAD, L.; SINGH, A.K.; SINGH, R.; JOSHI, A.K. Pathological and molecular characterizations of slow leaf rusting in fifteen wheat (*Triticum aestivum*L. Em Thell) genotypes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 84, p. 14956-14966, 2012.

SAUMTALLY, A.S.; VIREMOUNEIX, T.R.; AHONDOKPÊ, B.; GIRARD, J-C.R.; CASTLEBURY, L.A.; DIXON, L.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C. First Report of Orange Rust of Sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Ivory Coast and Cameroon. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 357, 2011.

SINGH, D.; PARK, R.F.; McINTOSH, R.A. Characterization of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in Australian wheats using components of resistance and the linked molecular marker csLV34. **Australasian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 58, p. 1106-1114, 2007.

SINGH, R.P.; HUERTA-ESPINO, J.; ROELFS, A.P. The wheat rusts. In: CURTIS, B.C.et al. **FAO plant production and protection.** Roma: FAO, 2002. p. 1-25 (Series, 30).

SINGH, R.P.; PAYNE, T.S.; RAJARAM, S. Characterization of variability and relationships among components of partial resistance to leaf rust in CIMMYT bread wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim,v. 82, p. 674-680, 1991.

SHINE, J.M. Jr.; COMSTOCK, J.C.; DEAN, J.L. Comparison of five isolates of sugarcane rust and differential reaction on six sugarcane clones.In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS,25., 2005.Florida, 2005. **Proceedings…**Florida :ISSCT, 2005.v. 1, p.638-647,

STAPLES, R.C. Research on the rust fungi during the twentieth century. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p.49-69, 2000.

STAIER, T.N.; MAGAREY, R.C.; WILLCOX, T.G. Control of orange rust in sugarcane with fungicides. **Proceedings of the 2003 Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, Brisbane, v.25, n.1, 6p, 2003.

SUBRAHMANYAM, P.; McDONALD, D.; GIBBONS, R. W.; SUBBA RAO, P. V. Components of resistance to *Puccinia arachidis* in peanuts. **Phytopathology**, Saint Paul, v.73, p. 253-256, 1983.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TAYLOR, P.W.J. Evidence for the existence of a single race of common rust caused by *Puccinia melanocephala*, in Australian sugarcane cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 43, p. 443-450, 1992.

TOKESHI, H; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, cap. 21, p.185-196.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA. São Paulo. Disponível em: <http://www.unica.com.br/content/default.asp?cchCode={C2B8C535-736F-406B-BEB2-5D12B834EF59}>. Acesso em: 16 out. 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar. **Variedades RB**, Araras, 2008. Disponível em: <pmgca.dbv.cca.ufscar.br/dow/VariedadesRB_2008.pdf>. Acesso em: 1 mar.2013.

VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases:** epidemics and control. New York: Academic Press, 1963. 349p.

VIRTUDAZO, E.V.; NAKAMURA, H.; KAKISHIMA, M. Ribossomal DNA-TS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehnii*. **Mycoscience**, Tóquio, v.42, p.447-453, 2001a.

VIRTUDAZO, E.V.; NOJIMA, H.; KAKISHIMA, M. Taxonomoy of *Puccinia* species causing rust diseases on sugarcane. **Mycoscience**, Tóquio, v. 42, p. 167-175, 2001b.

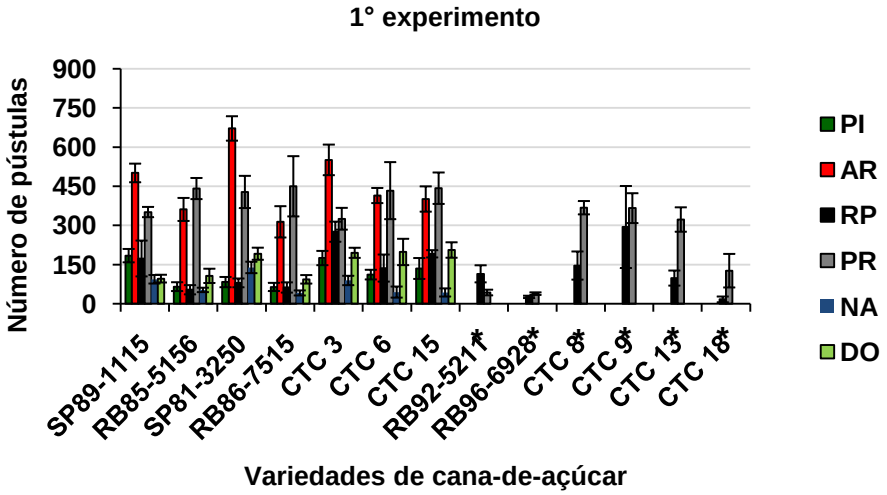
WESP, C.L.; MARTINELLI, J.A.; CHAVES, M.S.; GRAICHEN, F.A.S.; FEDERIZZI, L.C. Herança da resistência quantitativa à ferrugem da folha em linhagens recombinantes de aveia branca. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v.33, p.138-147, 2008.

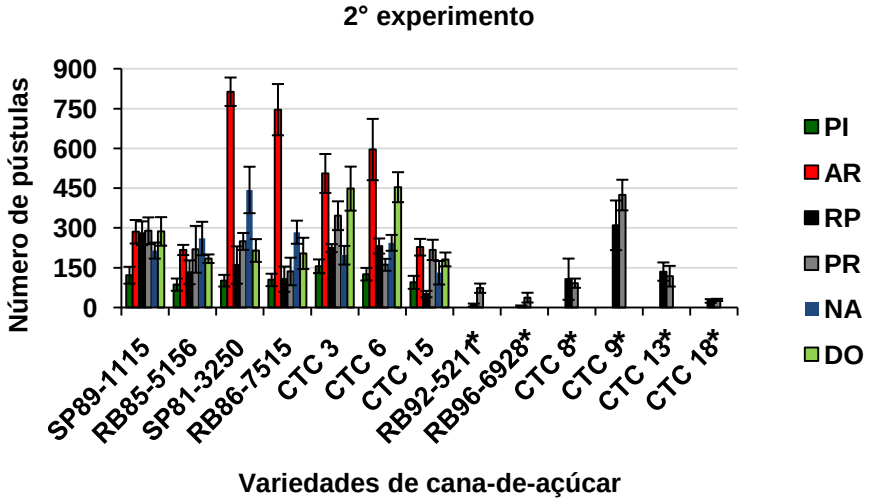
XU, X.M. Effects of temperature on the latent period of the rose powdery mildew pathogen, *Sphaerotheca pannosa*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, p. 662-667, 1999.

ZANDVOORT, R.; GROENEWEGEN, C.A.M, ZADOCKS, C. On the incubation period of *Puccinia* horiana. **Netherland Journal of Plant Pathology**, Wageningen, p. 128-130, 1968.

APÊNDICES

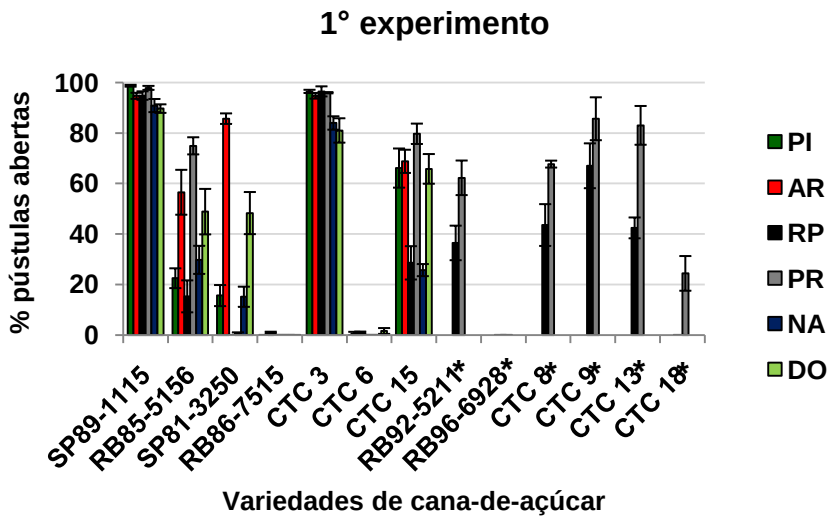
APÊNDICE A – Total de pústulas (abertas + fechadas) de ferrugem alaranjada avaliadas em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO)

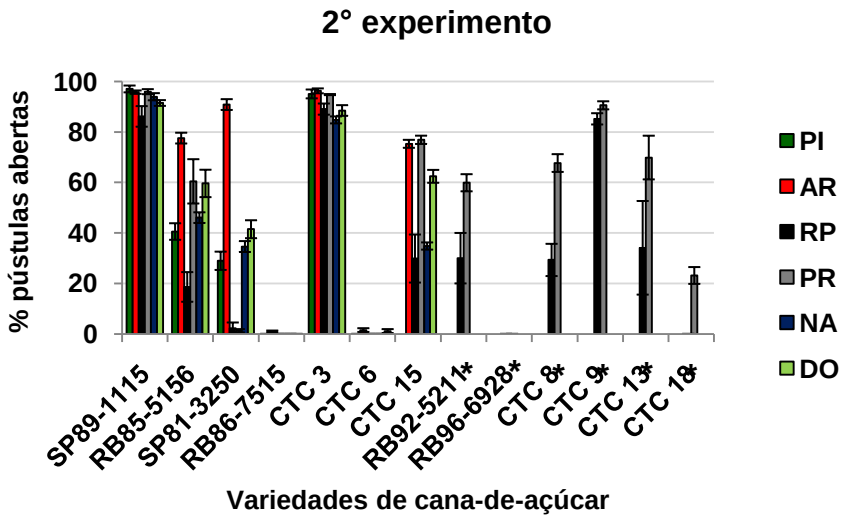




*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

APÊNCICE B – Porcentagem de pústulas abertas de ferrugem alaranjada avaliadas em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de Piracicaba/SP (PI), Araras/SP (AR), Ribeirão Preto/SP (RP), Paranacity/PR (PR), Nova Alvorada do Sul/MS (NA) e Dourados/MS (DO)





*Variedades inoculadas apenas com populações de *P. kuehnii* coletadas em RP e PR.

APÊNDICE C – Resumo da análise de variância (quadrados médios) do número total de pústulas avaliadas em treze variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *Puccinia kuehnii* oriundas de seis diferentes locais: Piracicaba (SP), Araras (SP), Ribeirão Preto (SP), Paranacity (PR), Nova Alvorada do Sul (MS) e Dourados (MS). Dados transformados em raiz quadrada de x + 1,0. Esalq, Piracicaba, SP, 2013

	Fonte de Variação	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**
1° exp.	Local	5	120,771**
	Variedade	12	12,099**
	Local*Variedade	36	3,599**
	C.V.(%)		23,70
2° exp.	Local	5	801,335**
	Variedade	12	265,657**
	Local*Variedade	36	23,192
	C.V.(%)		26,04
Média dos exps. 1 e 2	Local	5	1584,113**
	Variedade	12	311,689**
	Local*Variedade	36	35,159**
	C.V.(%)		31,32
Exps. 1°+2°	Local*Variedade	53	243,898**
	C.V.(%)		31,32

APÊNDICE D – Resumo da análise de variância (quadrados médios) da porcentagem de pústulas abertas avaliada em treze variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *Puccinia kuehnii* oriundas de seis diferentes locais: Piracicaba (SP), Araras (SP), Ribeirão Preto (SP), Paranacity (PR), Nova Alvorada do Sul (MS) e Dourados (MS). Dados não transformados. Esalq, Piracicaba, SP, 2013

	Fonte de variação	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**
1° exp.	Local	5	4156,880**
	Variedade	12	26918,902**
	Local*Variedade	36	1179,843**
	C.V.(%)		23,09
2° exp.	Local	5	4713,209**
	Variedade	12	27188,448**
	Local*Variedade	36	855,468**
	C.V.(%)		14,85
Média dos exp. 1 e 2	Local	5	8574,759**
	Variedade	12	53795,642**
	Local*Variedade	36	1944,469**
	C.V.(%)		20.42
Exps. 1°+2°	Local*Variedade	53	14309,857**
	C.V.(%)		20.42

ANEXOS

ANEXO A – Período de incubação (dias) da ferrugem alaranjada em 13 variedades de cana-de-açúcar inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de seis diferentes locais

Variedade	**Piracicaba-SP PI**		**Araras-SP AR**		**Ribeirão Preto-SP RP**	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
SP89-1115	9	9	9	9	9	10
RB85-5156	9	9	8	8	8	7
SP81-3250	7	8	9	9	7	7
RB86-7515	9	9	7	7	8	7
CTC 3	9	9	9	9	9	8
CTC 6	7	7	7	7	7	7
CTC 15	9	10	7	9	8	8
RB92-5211*	-	-	-	-	8	9
RB96-6928*	-	-	-	-	8	8
CTC 8*	-	-	-	-	8	9
CTC 9*	-	-	-	-	9	8
CTC 13*	-	-	-	-	8	7
CTC 18*	-	-	-	-	9	8

Variedade	**Paranacity-PR PR**		**Nova Alvorada do Sul-MS NA**		**Dourados-MS DO**	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
SP89-1115	8	9	10	10	10	10
RB85-5156	8	8	9	9	9	9
SP81-3250	7	7	8	8	8	8
RB86-7515	7	7	8	9	8	8
CTC 3	8	8	9	9	9	9
CTC 6	7	7	8	8	7	8
CTC 15	8	8	10	10	9	9
RB92-5211*	9	9	-	-	-	-
RB96-6928*	7	9	-	-	-	-
CTC 8*	8	8	-	-	-	-
CTC 9*	7	9	-	-	-	-
CTC 13*	8	9	-	-	-	-
CTC 18*	7	8	-	-	-	-

*Variedades inoculadas apenas com as populações de *P. kuehnii* oriundas de Paranacity (PR) e Ribeirão Preto (SP).

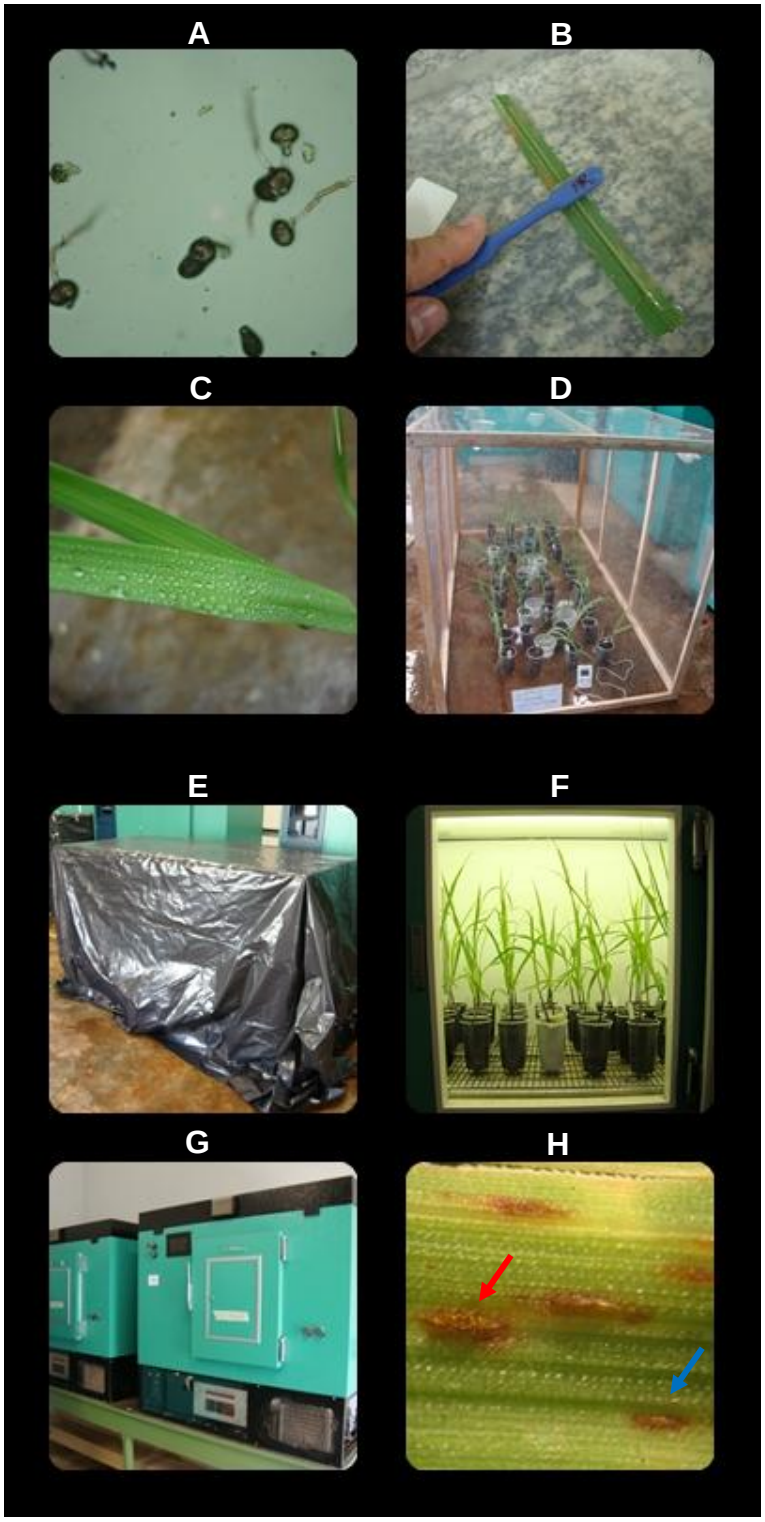
ANEXO B – Período de latência (dias) da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar em 13 variedades inoculadas com populações de *P. kuehnii* oriundas de seis diferentes locais

Variedade	**Piracicaba-SP PI**		**Araras-SP AR**		**Ribeirão Preto-SP RP**	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
SP89-1115	10	9	10	11	10	11
RB85-5156	10	10	10	11	15	15
SP81-3250	10	10	10	11	nt	nt(12*)
RB86-7515	nt	nt	18	17	nt	nt
CTC 3	10	9	10	11	10	11
CTC 6	nt(14*)	nt	18	16	nt	nt
CTC 15	11	11	11	11	10	13
RB92-5211	-	-	-	-	11	13
RB96-6928	-	-	-	-	nt	nt
CTC 8	-	-	-	-	10	13
CTC 9	-	-	-	-	10	10
CTC 13	-	-	-	-	10	13
CTC 18	-	-	-	-	nt	nt

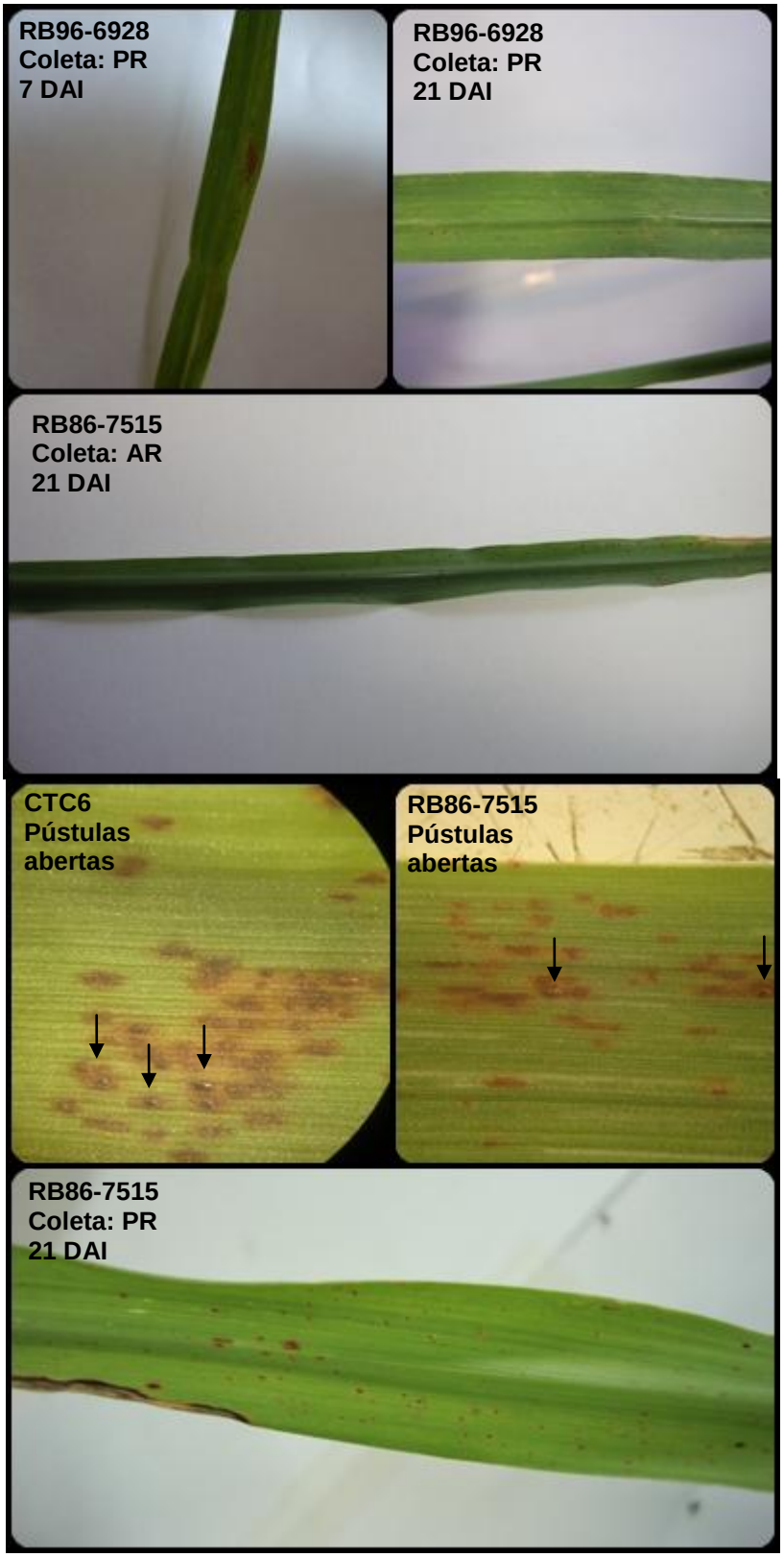
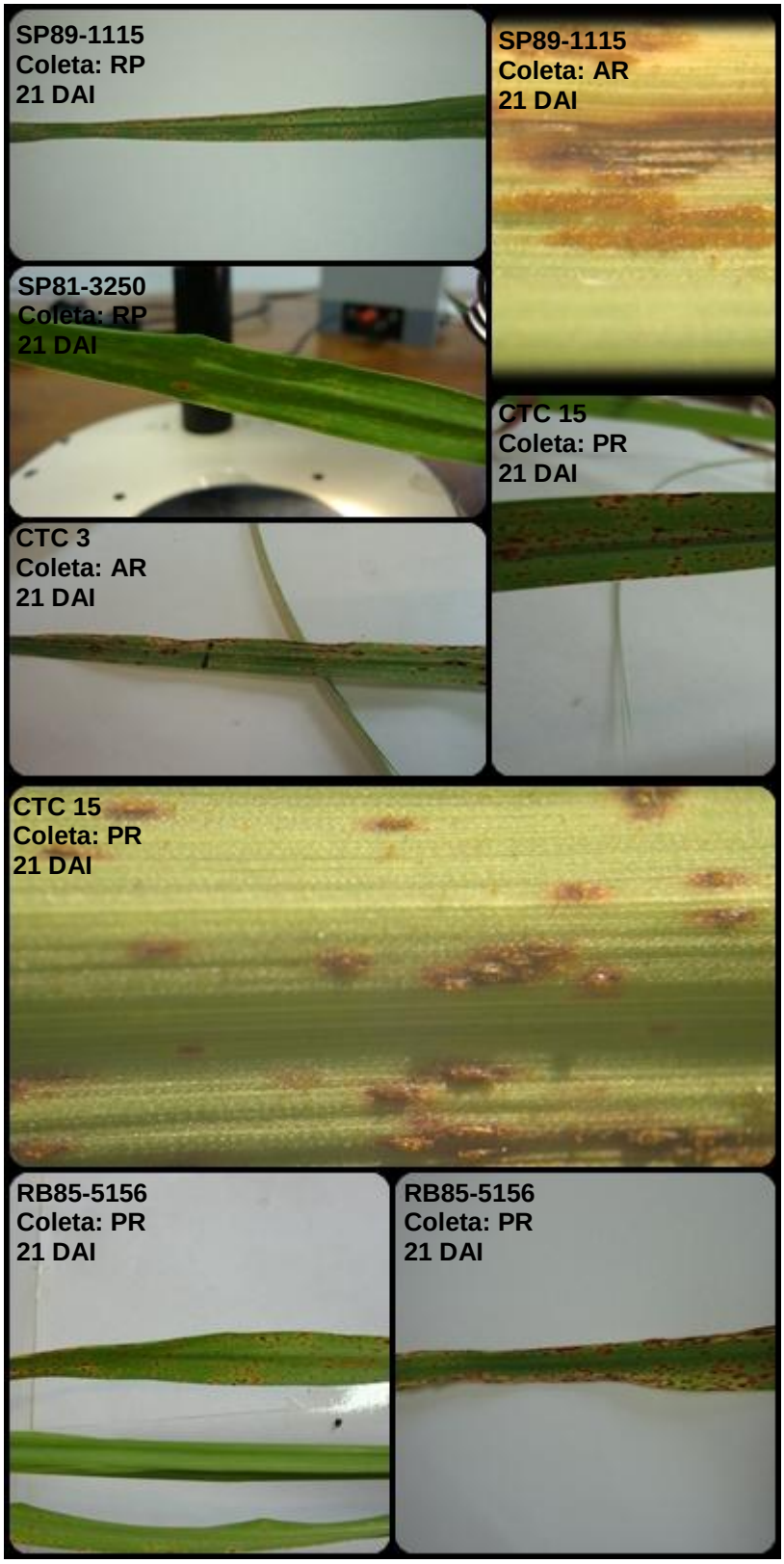
Variedade	**Paranacity-PR PR**		**Nova Alvorada do Sul-MS NA**		**Dourados-MS DO**	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
SP89-1115	9	10	11	11	10	11
RB85-5156	12	11	11	11	10	11
SP81-3250	nt(18*)	16	12	11	10	11
RB86-7515	nt	nt	nt	nt	nt	nt
CTC 3	9	10	11	11	10	10
CTC 6	nt	nt	nt	nt	17	19
CTC 15	10	10	12	12	10	12
RB92-5211	11	11	-	-	-	-
RB96-6928	nt	nt	-	-	-	-
CTC 8	9	10	-	-	-	-
CTC 9	10	10	-	-	-	-
CTC 13	9	10	-	-	-	-
CTC 18	12	18	-	-	-	-

nt: indicam variedades que não abriram pústulas durante o período de avaliação (21 dias após inoculação).
*período de latência de pelo menos uma repetição.

ANEXO C – Germinação (A), coleta (B) e inoculação (C) dos esporos de *Puccinia kuehnii,* câmara úmida (D e E) e incubação (F e G) das plantas de cana-de-açúcar para avaliação da doença e contagem das pústulas fechadas (H, seta azul) e abertas (H, seta vermelha)



ANEXO D – Sintomas da ferrugem alaranjada nas variedades RB96-6928, RB86-7515 e CTC 6



ANEXO E – Sintomas da ferrugem alaranjada nas variedades SP89-1115, RB85-5156, SP81-3250, CTC 3 e CTC 15