

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada  
(*Puccinia kuehni*) em cana-de-açúcar**

**Sergio Gregorio Pérez Gómez**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2013**

Sergio Gregorio Pérez Gómez  
Engenheiro Agrônomo

**Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehni*) em cana-de-açúcar**

Orientador:  
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2013**

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

Pérez Gómez, Sergio Gregorio  
Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehni*)  
em cana-de-açúcar / Sergio Gregorio Pérez Gómez.- - Piracicaba, 2013.  
53 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Cana-de-açúcar 2. Epidemiologia 3. Ferrugem - Doença de planta 4. Fungos  
fitopatogênicos 5. Resistência genética vegetal 6. Temperatura I. Título

CDD 633.61  
P438q

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

*Ao meu Tio Raúl (em memória).*

*Dedico.*



## **AGRADECIMENTOS**

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e Universidade de São Paulo;

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, professores e funcionários;

Ao Professor Nelson Sidnei Massola Júnior pela orientação, apoio e compreensão;

Ao Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA - Argentina);

Aos colegas e amigos do INTA: Alejandro Rago, Alejandro Valeiro, Roberto Sopena, Enrique Fernández de Ullivarri, Arturo Felipe, Juan Vallejo, Paola Fontana;

A Cassiara Gonçalves do Centro de Tecnologia Canavieira e Roberto Chapola da UFSCar, pela amizade e valiosa ajuda;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica, em especial ao Prof. Francisco Tanaka, pela confiança e ajuda;

A os meus grandes amigos Roger Fallas Corrales, Laura Garita, Javier Oberschelp, Solange Bourlot, Viviana Camelo e Pedro Mansilla Córdoba;

Aos amigos e colegas do laboratório: Ananias, Carlos, Paulo, Wagner, Juliana, Carol, Bruna e a os demais não mencionados.

Ao pessoal da biblioteca da ESALQ, em especial a Silvia Maria Zinsly.

A os meus pais Susana e Jesús, meus irmãos Virginia, Elena e Claudio, meus sobrinhos Mili, More e Tiago, pelo amor e apoio em todos os momentos.

A Natalia pelo amor e compreensão a mim demonstrados;

A Deus, por tudo mencionado acima.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
RESUMEN.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão Bibliográfica.....	21
2.1.1 Cana-de-açúcar .....	20
2.1.2 Ferrugens.....	20
2.1.3 Ferrugem alaranjada.....	22
2.1.4 Manejo da doença.....	23
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Variedades de cana-de-açúcar.....	24
2.2.2 Inoculação.....	24
2.2.3 Avaliações.....	27
2.2.3.1 Pré-infecção.....	27
2.2.3.2 Períodos de incubação e latência.....	27
2.2.3.3 Incidência: Frequência de infecção.....	28
2.2.3.4 Severidade.....	28
2.2.3.5 Tamanho de pústulas.....	29
2.2.3.6 Esporulação e viabilidade dos esporos.....	30
2.2.3.7 Estruturas características do fungo produzidas durante seu ciclo.....	32
2.3 Resultados.....	33
2.3.1 Pré-infecção.....	33
2.3.2 Determinação período de incubação e latência.....	34
2.3.3 Incidência: Frequência de infecção.....	35
2.3.4 Severidade: Área foliar afetada.....	37
2.3.5 Área das pústulas.....	38
2.3.6 Esporulação.....	39
2.3.7 Viabilidade dos esporos.....	40
2.3.8 Estruturas características do fungo produzidas durante seu ciclo.....	41



3 CONCLUSÕES.....47  
REFERÊNCIAS.....49

## RESUMO

### Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) em cana-de-açúcar

Entre as principais culturas do Brasil, a cana-de-açúcar é afetada por doenças responsáveis por reduções na produção. Entre elas, a ferrugem alaranjada, causada por *Puccinia kuehnii* relatada recentemente no país, tem merecido atenção dos Programas de Melhoramento Genético da cultura. Neste trabalho avaliaram-se parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem alaranjada em duas variedades de cana, sob duas condições de temperatura. Plantas com 40 dias de idade das variedades SP891115 e RB855156, que se comportam como suscetível e medianamente resistente respectivamente, foram inoculadas com urediniósporos coletados de plantas com sintomas típicos da doença e colocadas em condições de alta umidade e 22 °C por 24 horas. Em seguida, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento com temperaturas de 18 °C e 25°C. Dois experimentos idênticos foram conduzidos, sendo que no primeiro o inóculo foi proveniente de plantas do campo, no segundo foi obtido em condições controladas. Avaliaram-se período de incubação, período de latência, germinação de esporos e formação de apressórios, frequência de infecção, tamanho de pústula, severidade, esporulação e viabilidade dos esporos produzidos. O uso de inóculo produzido em condições controladas mostrou-se mais adequado para estudos dos parâmetros monocíclicos. A temperatura de 25 °C foi mais adequada para a manifestação da doença, em todas as variáveis avaliadas. A variedade RB 855156 mostrou maior nível de resistência poligênica que a variedade SP 891115, revelada por períodos de incubação e latência mais longos, menor frequência de infecção e menor área das pústulas. No caso das variáveis frequência de infecção e área das pústulas, a variedade RB 855156 mostrou menores valores somente a 18 °C, revelando que a resistência é influenciada pela temperatura. Não houve efeito da variedade de cana na esporulação ou na viabilidade dos esporos produzidos.

Palavras-chave: Fungo; Doença de planta; Temperatura; Resistência



**ABSTRACT**  
**Quantification of monocyclic parameters of orange rust (*Puccinia kuehnii*) in sugarcane**

Among the main crops in Brazil, sugar cane is affected by several diseases responsible for reductions in yield. Among them, orange rust caused by *Puccinia kuehnii*, which was recently reported in the country, has deserved special attention by the breeding programs. In this work it were evaluated the monocyclic parameters of orange rust on two different varieties, under two conditions of temperature. Forty-days plants of SP891115 and RB855156 varieties, which are considered respectively susceptible and moderately resistant were inoculated with urediniospores collected from infected plants and kept in wet chamber at 22 °C for 24 hours. Then the plants were transferred to growth chambers with temperatures of 18 °C and 25 °C. Two identical experiments were conducted. Inoculum used in the first experiment was collected on naturally infected plants in the field while for the second experiment it was obtained through artificial inoculations. It were evaluated incubation and latency periods, spores germination and appressoria formation, frequency of infection, pustules size, severity, sporulation and viability of spores produced on each condition. The use of artificially obtained inoculums proved to be more suitable for monocyclic parameters study. Temperature of 25 °C was more suitable for disease development in all variables evaluated. Variety RB 855156 showed higher level of polygenic resistance than variety SP 891115 as revealed by longer incubation and latency periods, as well as by higher infection frequency and pustules area. Variety RB 855156 showed lower levels of infection frequency and pustules area only at 18 °C, revealing that its resistance is influenced by temperature. No effects of sugarcane variety on sporulation or spores viability were observed.

Keywords: Fungus; Plant disease, Temperature; Resistance



## RESUMEN

### **Cuantificación de parámetros monocíclicos de roya anaranjada (*Puccinia kuehnii*) en caña de azúcar**

Entre los principales cultivos de Brasil, la caña de azúcar es afectada por enfermedades responsables de reducciones en la producción. Entre ellas, roya anaranjada, causada por *Puccinia kuehnii* relatada recientemente en el país, tiene una merecida atención de los Programa de Mejoramiento Genético del cultivo. En este trabajo se evaluaron parámetros epidemiológicos monocíclicos de roya anaranjada en dos variedades de caña, bajo dos condiciones de temperatura. Plantas con 40 días de edad, de las variedades SP 891115 y RB 855156, que se comportan como susceptible y medianamente resistente respectivamente, fueron inoculadas con urediniosporas colectados de plantas con síntomas típicos de la enfermedad y colocadas en condiciones de alta humedad y 22 °C por 24 horas. Luego, las plantas fueron transferidas para cámaras de crecimiento con temperaturas de 18 °C y 25 °C. Se realizaron dos experimentos iguales, siendo que en el primero el inóculo provenía de plantas de campo, y en el segundo fué obtenido en condiciones controladas. Se evaluaron períodos de incubación, período de latencia, germinación de esporas y formación de apresorios, frecuencia de infección, tamaño de pústula, severidad, esporulación y viabilidad de las esporas producidas. El uso de inóculo producido en condiciones controladas se mostró mas adecuado para los estudios de parámetros monocíclicos. La temperatura de 25 °C fué más adecuada para la manifestación de enfermedad en todas las variables evaluadas. La variedad RB 855156 mostró mayor nivel de resistencia poligénica que la variedad SP 891115, revelado por períodos de incubación y latencia más largos, menor frecuencia de infección y menor área de pústulas. En el caso de las variables frecuencia de infección y área de pústulas, la variedad RB 855156 mostró menores valores solamente a 18 °C, revelando que la resistencia es influenciada por la temperatura. No hubo efecto de variedad de caña en la esporulación o en la viabilidad de las esporas producidas.

Palabras claves: Hongo; Enfermedad de planta; Temperatura; Resistencia



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Coleta de urediniósporos de pústulas em folhas de cana-de-açúcar com bomba de vácuo.....25
- Figura 2 - Inoculação de suspensão de urediniósporo com borrifador manual em folhas de cana-de-açúcar com 40 dias de idade.....25
- Figura 3 - Plantas de cana-de-açúcar inoculadas no interior da câmara de orvalho.....26
- Figura 4 - Molde utilizado para quantificar a frequência de infecção. As janelas têm área de 1cm<sup>2</sup>.....28
- Figura 5 - Integrador de área foliar LICOR Li 3000A.....29
- Figura 6 - Tela do programa ASSESS, no processo de medição da área de uma pústula.....30
- Figura 7 - Quantificação de esporos em cinco gotas de 4 µL de suspensão.....31
- Figura 8 - Urediniósporos germinados e não germinados em placa de Petri contendo meio sólido Agar-água. Barra: 200µm.....32
- Figura 9 - Porcentagem de formação de apressórios pelos urediniósporos de *Puccinia kuehnii* 24 horas após inoculação nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156. Letras iguais dentro do mesmo experimento não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em porcentagem não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média .....34
- Figura 10 - Número médio de pústulas por cm<sup>2</sup> de área nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156, sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em cm<sup>2</sup> não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média.....36



Figura 11 - Área foliar das variedades de cana SP 891115 e RB 855156 afetadas pela ferrugem alaranjada sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em porcentagem não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média.....38

Figura 12 - Área media das pústulas de ferrugem alaranjada nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156 sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em  $\text{mm}^2$  não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média.....39

Figura 13 - Médias de urediniósporos em relação a área das pústulas onde foram produzidas. Avaliações em condições de 18 °C e 25 °C para SP 891115 e RB 855156. Letras maiúsculas servem para comparar entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas para comparar entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em médias de número de esporos por  $\text{mm}^2$  não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\log x$ . As barras representam o erro padrão da média.....40

Figura 14 - Porcentagem de viabilidade dos esporos produzidos a 18 °C e 25 °C em SP 891115 e RB 855156. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais

não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em médias de porcentagem de germinação de esporos. As barras representam o erro padrão da média.....41

- Figura 15 - Urediniósporo germinado com tubo germinativo e apressório formado acima do estômato de uma folha da variedade SP 891115. Notar o ponto de emissão do “peg” de penetração (seta).....42
- Figura 16 - Urediniósporo germinado com tubo germinativo e apressório formado acima do estômato da variedade RB 855156.....42
- Figura 17 - Pústulas abertas nas variedades SP 891115 (esquerda) e RB 855156 (direita) com exposição de urediniósporos.....43
- Figura 18 - Pústula aberta na variedade SP 891115 com exposição de urediniósporos (setas) e paráfises (asterisco).....43
- Figura 19 - Pústula de tamanho pequeno em folha do cultivar RB 855156.....43
- Figura 20 - Corte transversal de uma pústula aberta em folha de cana-de-açúcar da variedade SP 891115. Setas indicam a epiderme foliar rompida.....44
- Figura 21 - Corte transversal de uma pústula aberta em folha de cana da variedade SP 891115. A seta amostra um uredinósporo com equínulas.....44



## 1 INTRODUÇÃO

Brasil é o primeiro país produtor de cana-de-açúcar, com 8.527,8 mil hectares plantados, principalmente no estado de São Paulo (CONAB, 2012). Produz álcool e açúcar para exportação e consumo próprio. A agroindústria relacionada direta ou indiretamente com a cultura é uma das principais cadeias produtivas do estado de São Paulo, responsável por 33,1% do PIB (Produto Interno Bruto) do país (SEADE).

Entre os fatores que reduzem a produtividade da cultura, as doenças tem grande importância. Para isso, os Programas de Melhoramento Genético (PMG) de cana-de-açúcar providenciam ao setor novas variedades com resistência a doenças, além de maior produtividade (TOKESHI; RAGO, 2005).

A ferrugem alaranjada, causada por *Puccinia kuehnii* antigamente foi considerada uma doença secundária na Ásia. Entretanto, no ano de 2000 na Austrália causou prejuízos pela suscetibilidade da variedade de cana-de-açúcar Q 124, a mais plantada naquele país (MAGAREY, 2000).

Em 2010, após identificação do fungo na região de Araraquara a indústria sucroalcooleira brasileira voltou sua atenção para o comportamento das variedades comerciais frente ao novo problema. O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento e outros órgãos de pesquisa desenvolveram ações conjuntas para minimizar os potenciais danos, entre eles caracterizaram as variedades que manifestavam sintomas mais severos. Entre elas figuravam as variedades RB 72454; SP 891115 e SP 842025. Felizmente, essas variedades ocupavam menos de 10% dos canaviais, o que favoreceu uma substituição rápida, por parte dos produtores, por variedades com resistência ao fungo. (MAPA, 2010).

Para estudar um patossistema recente torna-se necessário conhecer seu padrão epidemiológico para fornecer informações aos Programas de Melhoramento, sendo que a resistência do cultivar é a melhor estratégia para controlar os efeitos negativos da doença. O objetivo do presente trabalho foi obter informação quantitativa referente aos processos relacionados com a ocorrência da doença, avaliando, assim, parâmetros epidemiológicos como os períodos de incubação e de latência, incidência, severidade, tamanho de pústulas e esporulação em duas variedades e em duas temperaturas, caracterizando os mesmos como componentes que possam ser utilizados na avaliação da resistência dos cultivares a *Puccinia kuehnii*.



## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Revisão Bibliográfica

#### 2.1.1 Cana-de-açúcar

A área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 foi estimada em 8.527,8 mil hectares, distribuídas nos estados de São Paulo, que é o maior produtor, com 51,82% da área total, seguido por Minas Gerais com 8,46%, Goiás com 8,69%, Paraná com 7,13% entre os estados mais representativos. Embora a região Centro-Oeste e Sudeste e Paraná estejam em progressiva expansão da área (CONAB, 2012).

As 596,63 milhões de toneladas moídas na safra 2012/13 estão sendo processadas em proporções semelhantes para obter açúcar e álcool (anidro e hidratado). A produtividade média brasileira está estimada em 69.963 kg/ha (CONAB, 2012).

A produção agrícola é afetada por algumas doenças às quais a cultura está exposta. A grande maioria dessas doenças é causada por fungos, entre elas as ferrugens (INFANTE, 2009; TOKESHI; RAGO, 2005).

O processo da fotossíntese é reduzido pela superfície foliar danificada (AGRIOS, 2005). Além de alterar processos fisiológicos como fixação do carbono, respiração e transpiração (ZHAO et al., 2011), diminuindo os rendimentos potenciais do cultivar.

#### 2.1.2 Ferrugens

As duas ferrugens mais conhecidas que podem causar doença em cana-de-açúcar são ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. et P. Syd.) e ferrugem alaranjada *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler (SAVILE, 1984). Tais ferrugens podem-se diferenciar morfológicamente pela cor de suas pústulas, urediniósporos, presença de paráfises, parede apical do urediniósporo, distribuição das equínulas (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001; MORDUE, 1990) ou com ferramentas moleculares (DIXON et al. 2010).

O sintoma mais comum é a pústula, uma pequena mancha necrótica com elevação da epiderme, que se rompe por força da produção e exposição dos esporos do fungo.

As pequenas pústulas, uredias ou uredínios tornam-se maiores em tamanho a partir de “flecks” amarelos. Podem ter um halo clorótico amarelado ou não. São desenvolvidas no início no lado abaxial da folha embora em ataques severos possam aparecer nos dois lados e tendem a coalescer. De crescimento subepidérmico quando desenvolvido a massa de urediniósporos produzem a ruptura da epiderme foliar (PURDY, 1985; MAGAREY, 2000; REZENDE; MASSOLA; BEDENDO; KRUGNER, 2011; LITTLEFIELD; HEATH, 1979; SAVILE, 1984).

Os urediniósporos geralmente amarelos brilhantes a cor de canela, são unicelulares de forma oval a piriforme, podendo ter a parede apical engrossada. Com poucas exceções os urediniósporos das ferrugens são equinulados com ornamentações cônicas, em formato de espinhos, distribuídas na superfície (LITTLEFIELD; HEATH, 1979; PURDY, 1985; SAVILE, 1984).

A esporogênese acontece a partir das células esporógenas, que são porções da hifa que aumentam de tamanho, produzindo simpodialmente esporos diferenciados do pedicelo por um septo. A maturação dos esporos é acompanhada pelo prolapso das ornamentações acima mencionadas, inicialmente voltadas para o interior do esporo (LITTLEFIELD; HEATH, 1979; HARDER, 1984; HIRATSUKA; SATO, 1982).

Outra característica das ferrugens é que podem ter tipos de esporos funcional e morfológicamente diferentes nos seus ciclos de vida. São nomeados de diversas formas, entre as mais comuns: espermácias ou picniosporos, formados em espermogônios ou pícnios; aesciosporos, formados em aécios (ou écios); uredósporos ou urediniósporos, formados em uredínios ou urédios; teliósporos ou teleutósporos, formados em télíos ou teleutosoros e; basidiósporos em basídios (LITTLEFIELD; HEATH, 1979; HIRATSUKA; SATO, 1982).

Embora algumas poucas espécies de ferrugens possam ser cultivadas em meios artificiais, naturalmente completam seu ciclo vital apenas como parasitos obrigatórios em plantas vivas. (HIRATSUKA; SATO, 1982; MASSOLA; KRUGNER, 2011).

A sequência do desenvolvimento após a germinação do urediniósporo é a formação do tubo germinativo, às vezes com ramificações. O apressório diferencia-se normalmente acima do estômato. Com poucas exceções entre as ferrugens, a penetração ocorre por meio dessas estruturas na folha do hospedeiro (LITTLEFIELD; HEATH, 1979). Segue com a passagem do “peg” de penetração

através das células guardas, para formar uma vesícula na câmara subestomática, e, em seguida, uma hifa infectiva formará o primeiro haustório a partir de uma célula mãe de haustório. Após a ocorrência desse processo, ramificações de hifas intercelulares crescem para formar novos haustórios e a colonização então se inicia nas células do mesófilo (PURDY, 1985; HARDER, 1984).

Haustórios são órgãos especializados, formados no interior de células do hospedeiro, com papel importante na troca de substâncias entre o hospedeiro e o fungo (HARDER; CHONG, 1984 apud. BUSHNELL, 1972).

Nas ferrugens de poáceas o crescimento intracelular do fungo é paralelo aos feixes vasculares da folha, nos dois sentidos após o ponto de penetração (PURDY, 1985). A diferenciação do apressório acontece em resposta a um estímulo e sua formação depende de reservas endógenas do urediniósporo (WOLF, 1982).

As condições de alta umidade apenas não são suficientes para germinação dos urediniósporos. Esta é dependente de água livre na superfície foliar, que ocorre com a formação de orvalho na queda da temperatura à noite. A germinação dos urediniósporos ocorre desde 5 °C até 30 °C com temperaturas ótimas de 15 °C a 30 °C (PURDY, 1985).

No processo da disseminação, após a liberação dos esporos do tecido exposto, a dispersão é bem sucedida pelo transporte das estruturas, até serem depositadas na superfície de novo hospedeiro (AMORIN; PASCHOLATI, 2011). Os urediniósporos têm características (forma, tamanho, características da superfície, densidade) que indicam boa adaptabilidade para serem transportados por corrente convectivas, que os deixam suspensos em grandes alturas, podendo serem dispersos por grandes distâncias (ISARD; RUSSO, 2011).

### **2.1.3 Ferrugem alaranjada**

Ferrugem alaranjada a doença causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler (INDEX FUNGORUM, 2012), antigamente distribuída apenas na região da Ásia e Oceania (MAGAREY, 2000) era considerada uma doença pouco importante na cultura de cana-de-açúcar. A queda na produção de até 20% coincidiu com uma disseminação e infecção do patógeno na variedade mais plantada na Austrália, Q124, no ano de 2000. A doença foi observada na região central no início, e depois em todas onde essa variedade era plantada. No momento da identificação aquele cultivar era responsável por 80% da matéria prima produzida em Queensland



(WALLIS, 2002). Naquele episódio, o prejuízo estimado foi de 24% em toneladas de pol por hectare (TPH) (MAGAREY, et al., 2001).

O primeiro relato da doença no continente americano foi nos EUA, no ano 2007 (COMSTOCK et al., 2008). Também no mesmo ano na Guatemala (Ovalle et al., 2008), Costa Rica e Nicarágua (CHAVARRÍA et al., 2009). Em 2008 a ferrugem alaranjada foi identificada em Cuba (PÉREZ VICENTE et al., 2009), México, El Salvador e Panamá (FLORES et al., 2009). Numa fazenda do estado de São Paulo foi confirmada a presença de *Puccinia kuehnii* em cultivares pré-comerciais em Dezembro de 2009 (BARBASSO et al. 2010). Finalmente em 2010 na Colômbia foi observada a presença do fungo sendo até agora o último relato na América do Sul (CADAVID; ANGEL; VICTORIA, 2012).

As lesões nas folhas vão de marrom claro até amarelo brilhante, com regiões necróticas que, em variedades suscetíveis, podem coalescer. Os urediniosporos são amarelados, alaranjados a cor de canela, de forma piriforme, geralmente, com engrossamento na parede apical, paráfises podem estar presentes. (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001; MAGAREY, 2000).

Minchio; Canteri e Rocha (2011) determinaram que as condições ótimas de germinação dos urediniospóros de ferrugem alaranjada são de 21°C durante um período de molhamento de 14 horas. A doença é favorecida por verões úmidos e outonos mornos a temperados (MAGAREY, 2000).

No que concerne à variabilidade de *P. kuehnii*, BRAITHWAITE et al., (2009) encontraram certa variabilidade do ponto de vista morfológico e filogenético entre isolados de diferentes regiões. Virtudazo et al. (2001) e Glynn et al. (2010) detectaram polimorfismo na espécie.

#### **2.1.4 Manejo da doença**

O controle por meio de variedades resistentes tem sido uma das medidas econômicas mais eficientes para controle de ferrugens (BEDENDO,2005). Assim, cultivares suscetíveis devem ser trocados por cultivares resistentes (PURDY, 1985).

Entretanto, tratamentos com fungicidas apropriados na Austrália foram geralmente efetivos, apesar de onerosos (WALLIS, 2002). Experimentos mostraram que estrobilurinas foram mais eficientes que a mistura de estrobilurinas e triazóis e, em menor medida, triazóis sozinhos. Em outro ensaio usando estrobilurina,

demonstrou-se a capacidade de reduzir os efeitos de ferrugem alaranjada em até 40% nos rendimentos (RAID; COMSTOCK; GLYNN, 2009).

## **2.2 Material e métodos**

Os experimentos foram realizados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo entre os meses de Setembro de 2011 e junho de 2012. Os experimentos foram realizados duas vezes, referidos adiante como primeiro e segundo experimento. O delineamento experimental em ambos os experimentos foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para o primeiro e quatro para o segundo. Cada repetição foi representada por uma planta.

### **2.2.1 Variedades de cana-de-açúcar**

As variedades de cana utilizadas no experimento foram SP 891115 e RB 855156, consideradas, respectivamente, suscetível e moderadamente suscetível à ferrugem alaranjada (BARBASSO et al., 2010; ARAUJO et al., 2011; Moreira, 2012). Toletes de uma gema dessas variedades, cedidos respectivamente pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) e UFSCar (Universidade Federal São Carlos - Araras), foram plantados individualmente em copos plásticos descartáveis de 500 mL contendo substrato autoclavado. As 300 mudas foram mantidas em estufa durante 40 dias e foram irrigadas sempre que necessário. Dez dias antes da inoculação foram adubadas com uma solução de sulfato de amônio diluído em 20L para (30g/L de concentração).

### **2.2.2 Inoculação**

Para o primeiro experimento o inóculo foi obtido a partir de folhas doentes com pústulas abertas, coletadas no CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), e para o segundo experimento foi obtido de plantas jovens com pústulas abertas, previamente inoculadas e mantidas em câmara incubadora tipo BOD para tal fim, garantindo inóculo mais puro e em boa quantidade (MACLEAN, 1982).

Com a ajuda de uma bomba de vácuo (Prismatec Mod. 131) foram coletados os esporos das pústulas abertas, preferindo-se as do lado abaxial da folha (SOOD; COMSTOCK; GLYNN, 2009) (Figura 1). A coleta foi feita um dia antes da inoculação e os esporos foram mantidos em temperatura ambiente.

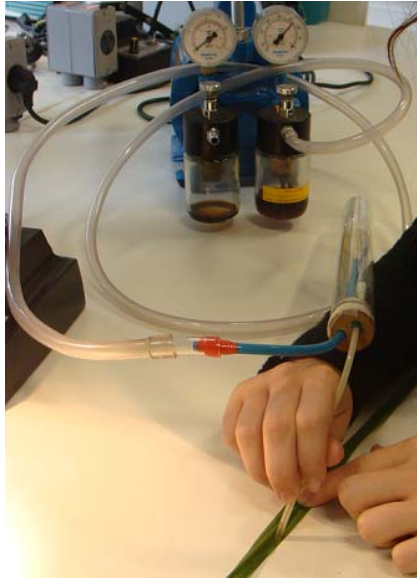


Figura 1 - Coleta de urediniósporos de pústulas em folhas de cana-de-açúcar com bomba de vácuo

Com água destilada preparou-se uma suspensão de esporos que foi homogeneizada em agitador magnético (Marconi, Mod. MA 085) por 30 minutos. A suspensão foi quantificada sob microscópio de luz (Olimpus mod. CX 21) com a ajuda de hemacitômetro ou câmara de Neubauer (Boeco) (SOOD; COMSTOCK; GLYNN, 2009) para se obter 500 mL com uma concentração de  $10^4$  esporos por mL. Pulverizou se aproximadamente 4mL dessa suspensão em cada uma das plantas, por meio de borrifador manual de distribuição regular de gotas pequenas (BOWELL, 1984) (Figura 2). Priorizou-se atingir a face abaxial das folhas.



Figura 2 - Inoculação de suspensão de urediniósporo com borrifador manual em folhas de cana-de-açúcar com 40 dias de idade

A viabilidade média dos esporos utilizados como inóculo foi de 32% para o primeiro experimento e 54% para o segundo, testados em placas com meio Ágar-Água a 2% e deixados no escuro em câmara incubadora com temperatura média de 25°C. A avaliação foi feita sob microscópio de luz em observações diretamente nas placas, 12 horas após a semeadura. Consideraram-se germinados os esporos que tinham o tubo germinativo com comprimento maior que seu diâmetro.

Imediatamente após a inoculação as plantas foram colocadas em câmara de orvalho (Figura 3). Durante as primeiras 24 horas as plantas inoculadas permaneceram em temperatura média de 22 °C e com umidificador de ar (Waterclear Max) que ligava durante 15 minutos cada 2 horas, garantindo condições de umidade próxima a saturação.



Figura 3 - Plantas de cana-de-açúcar inoculadas no interior da câmara de orvalho

Após período de 24 horas na câmara de orvalho, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento até o encerramento dos experimentos. Metade das plantas de cada variedade foi acondicionada a 18 °C e a outra metade a 25 °C, com a finalidade de testar o efeito da temperatura no desenvolvimento da ferrugem. As condições de luminosidade nas câmaras de crescimento foram ajustadas para manter um fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente e 12 horas de escuro.

### 2.2.3 Avaliações

Para as avaliações foram consideradas as variáveis período de incubação, período de latência, germinação de esporos, frequência de infecção, tamanho de pústula, severidade, esporulação e viabilidade dos esporos produzidos.

#### 2.2.3.1 Pré-infecção

Segmentos com cerca de 1 cm<sup>2</sup> das folhas +2 (segunda folha completamente expandida) de cada uma das repetições foram retirados 24 horas após a inoculação e transferidos para microtubos de plástico (2 mL) contendo fixador Karnovsky modificado (2.5 % glutaraldeído, 2 % paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0.05 M pH 7.2 com 0.001 M CaCl<sub>2</sub>) e mantidos em geladeira por uma noite. Em seguida foram aderidas com fita dupla face de carbono a suportes de alumínio (“stubs”) e submetidas ao vapor de Tetroxido de Ósmio a 4% por uma noite. Após secagem em sílica gel 2 minutos, foram metalizadas em aparelho metalizador (Bal-Tec Mod. SCD 050) durante 180 segundos, conferindo cobertura de ouro de cerca de 100Å.

As amostras, assim preparadas, foram observadas no microscópio de varredura LEO 435 VP (Zeiss, Inglaterra) situado no NAP/MEPA da ESALQ/USP. Foram quantificados os urediniósporos que germinaram e formaram apressórios em cada uma das variedades. Dessa forma, assumiu-se que a formação de apressórios foi o evento que representou pré-infecção bem sucedida.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os dados de porcentagem de germinação dos urediniósporos foram transformados para  $\sqrt{(x+1)}$  e comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.

#### 2.2.3.2 Períodos de incubação e latência

Diariamente as plantas foram observadas para determinar o período de incubação compreendido entre os dias desde a inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas visíveis a olho nu em mais de 50 % das plantas. Avaliou-se também o período de latência, considerado o tempo transcorrido entre a inoculação e a esporulação em mais de 50% das pústulas.

### 2.2.3.3 Incidência: Freqüência de infecção

A freqüência de infecção foi quantificada por meio da quantidade de pústulas por  $\text{cm}^2$  no mesmo dia que determinou-se o período de latência: 11 a 24 dias após a inoculação (segundo temperatura e variedade do experimento). Foram feitas duas avaliações ao acaso nas folhas +2 e +3 de cada repetição, com auxílio de um molde com duas janelas com  $1 \text{ cm}^2$  cada (Figura 4). Para cada repetição, considerou-se o valor médio das duas contagens, que foram transformados para  $\sqrt{(x+1)}$  e comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.



Figura 4 - Molde utilizado para quantificar a freqüência de infecção. As janelas têm área de  $1 \text{ cm}^2$

### 2.2.3.4 Severidade

A severidade da ferrugem foi quantificada por meio da porcentagem da área foliar atacada após a determinação do período de latência, 11 a 24 dias após a inoculação (de acordo com a temperatura e variedade), com o auxílio do integralizador LI 3000A (LI-COR, USA) ou medidor de área foliar fixo (Figura 5). As pústulas de cada folha foram desenhadas em folhas de plástico transparente, as quais foram submetidas ao integralizador (Diaz et al., 2001) para estimativa da área foliar doente. Em seguida, as folhas inteiras também foram submetidas ao mesmo equipamento para cálculo da área total de cada folha. Desse modo, calculou-se a porcentagem de área atacada em relação à área total de cada folha. Cada leitura foi feita duas vezes e considerou-se a média das mesmas para os cálculos. Os dados de porcentagem de área foliar doente foram transformados em  $\sqrt{(x+1)}$  e comparadas

pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.



Figura 5 - Integralizador de área foliar LICOR Li 3000A

### 2.2.3.5 Tamanho de pústulas

A metodologia empregada para determinar o tamanho médio das pústulas foi mediante análise de fotos tiradas na lupa estereoscópica LEICA MZ 9 5 do NAP/MEPA com o software ASSESS 2.0 (Lamari APS, 2008). Tal software calculou a área das pústulas nas fotos, usando uma referência (papel milimetrado) como escala de tamanho (Figura 6). Para isso, utilizaram-se pústulas presentes em folhas 8 dias após o término do período de latência para cada tratamento. Foram medidas até 20 pústulas em cada repetição. As médias de cada repetição foram transformadas em  $\sqrt{(x+1)}$  e comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.

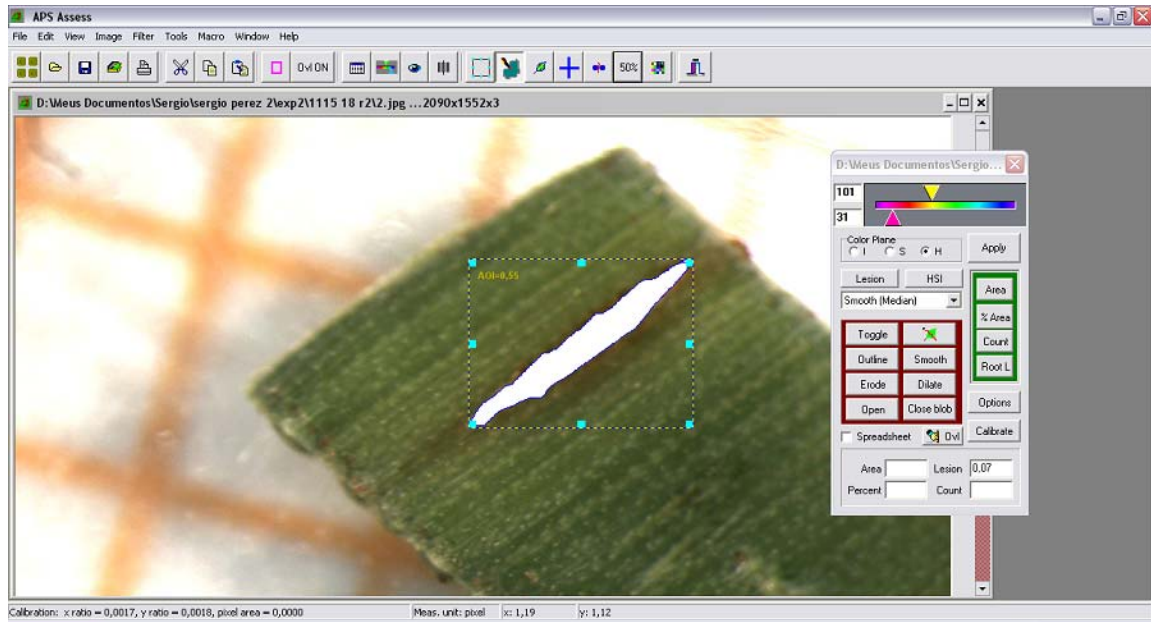


Figura 6 - Tela do programa ASSESS, no processo de medição da área de uma pústula

### 2.2.3.6 Esporulação e viabilidade dos esporos

A esporulação e a viabilidade dos esporos produzidos foram avaliadas oito dias após o término do período de latência em cada tratamento. Segmentos de folhas com aproximadamente 20 pústulas foram cortados e retirados cuidadosamente de cada uma das repetições. Tais segmentos foram acondicionados em microtubos de 2mL, aos quais adicionou-se 0,8mL de água destilada e agitou-se em agitador de tubos (IKA Mod. Lab dancer) por um minuto. Em seguida, retiraram-se os segmentos de folhas e centrifugou-se a fase líquida em centrífuga orbital (Eppendorf Mod. 5415 D) a 10000 RPM por 5 minutos. Descartou-se 0,6mL do sobrenadante e ressuspenderam-se os urediniósporos no volume restante. A quantificação foi realizada por meio de contagem dos urediniósporos em 5 alíquotas de 4 uL sob microscópio composto com aumento de 50X (figura 7). Para essa avaliação foram utilizadas as mesmas pústulas para as quais foram determinados seus tamanhos (ver item anterior). Assim, os resultados de esporulação foram calculados em número de esporos/mm<sup>2</sup> de pústula.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento. As medias das leituras foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT. Para efetuar a análise estatística os dados foram transformados em log dos valores.



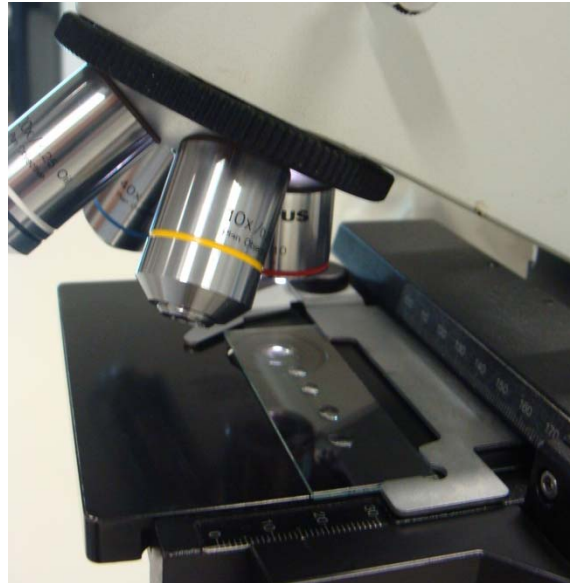


Figura 7 - Quantificação de uredíniosporos em cinco gotas de 4  $\mu$ L de suspensão

A viabilidade dos esporos foi avaliada mediante testes de germinação em Agar. Alíquotas de 100 $\mu$ L da mesma suspensão usada para quantificação da esporulação foram espalhadas na superfície de meio Ágar-Água a 2%, com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C e no escuro. A germinação dos uredíniosporos foi avaliada após 12 horas de incubação, por meio da observação de 100 esporos aleatoriamente em cada placa de Petri, para estimar a porcentagem de uredíniosporos germinados. Considerou-se germinado o uredíniosporo que apresentou tubo germinativo mais comprido que seu diâmetro (Figura 8). Os dados de porcentagem de germinação foram comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.



Figura 8 - Urediniosporos germinados e não germinados em placa de Petri contendo meio sólido Agar-água. Barra: 200 $\mu$ m

### 2.2.3.7 Estruturas características do fungo produzidas durante seu ciclo

Registraram-se, por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, as diferentes estruturas formadas por *P. kuehnii* durante seu ciclo sobre a cana-de-açúcar.

Em microscopia de varredura, analisaram-se as amostras com 24 horas e 12 dias após a inoculação. As amostras de segmentos de folhas foram fixadas em Karnovsky modificado e depois expostas ao vapor de Tetroxido de Ósmio a 4%, previamente aderidas ao suporte ou “stub” mediante fita dupla face de carbono. Após secagem em sílica gel por 2 minutos, foram metalizadas em aparelho metalizador (Bal- Tec Mod. SCD 050) durante 180 segundos. As amostras foram observadas no microscópio de varredura LEO 435 VP (Zeiss, Inglaterra) situado no NAP/MEPA da ESALQ/USP.

Em microscopia de luz, analisaram-se as amostras com 12 dias após a inoculação. As amostras, após serem conservadas em Karnovsky modificado, foram desidratadas em uma serie gradual de acetona (30, 50, 70, 90% por 10 minutos cada e três vezes em acetona 100% por 10 minutos cada). A seguir a inclusão em resina Spurr foi feita após infiltração em partes iguais (acetona e resina) primeiramente por 5 horas e, em seguida, resina pura por 12 horas. A polimerização foi feita em formas de silicone mantidas em estufa a 70 °C por três dias. Os blocos assim obtidos foram seccionados em ultramicrotomo LEICA mod. ULTRACUT UTC, obtendo-se secções de 2 $\mu$ m que foram fixadas em lâminas de vidro para

microscopia. Posteriormente as secções foram coradas com Azul de Toluidina e observadas em microscópio de luz.

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Pré-infecção**

No primeiro experimento a comparação das medias pela ANOVA não mostrou diferenças significativas para a formação de apressórios entre as 2 variedades. No segundo experimento as medias de formação de apressórios foram significativamente diferentes e maiores em relação ao primeiro experimento (Figura 9).

Os maiores valores de formação de apressórios no segundo experimento certamente ocorreram devido à maior viabilidade dos esporos em relação ao primeiro experimento (54% de viabilidade no segundo e 32% no primeiro). O inóculo utilizado no segundo experimento foi proveniente de plantas de cana jovens inoculadas e mantidas em câmara de crescimento, fato que conferiu maior qualidade a esse inóculo. Essa constatação comprova a superioridade de inóculos obtidos em condições controladas em relação àqueles obtidos de plantas infectadas no campo quando se inoculam doenças bióticas.

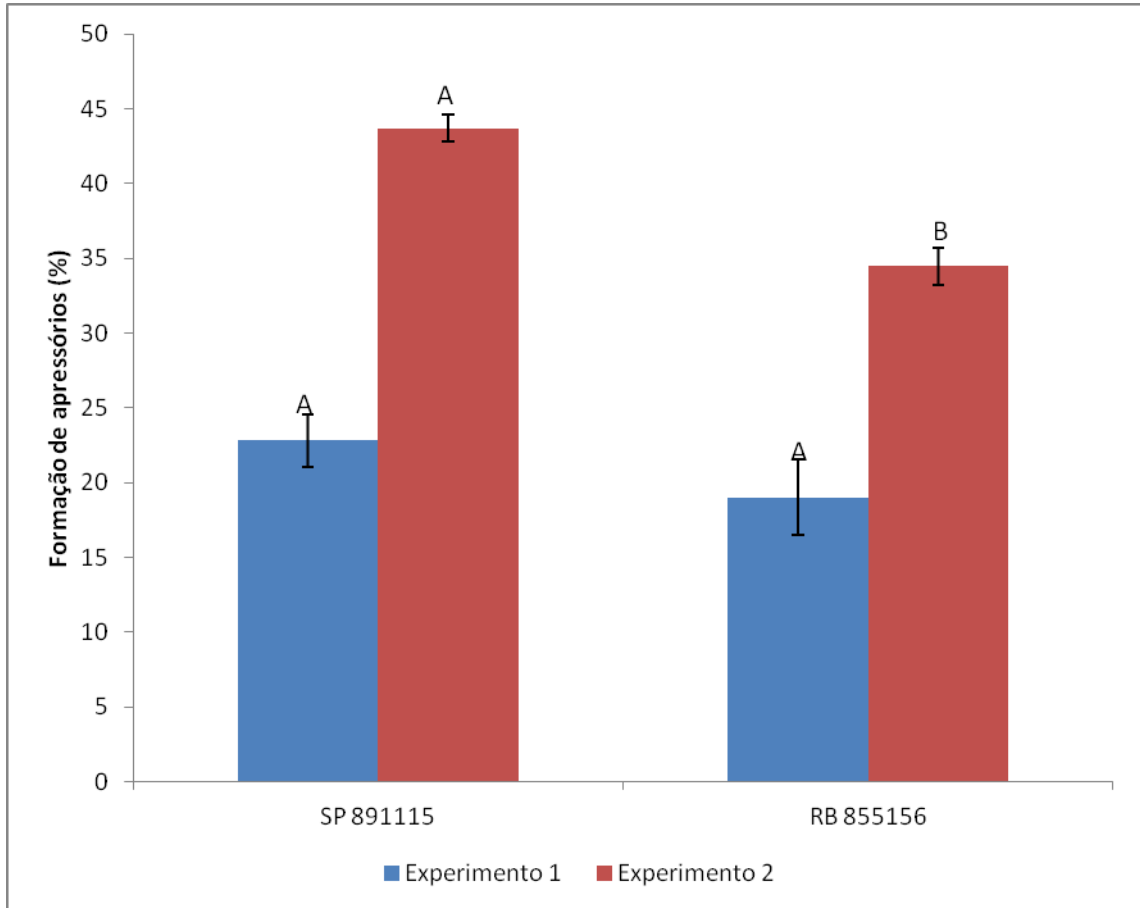


Figura 9 - Porcentagem de formação de apressórios pelos uredíniosporos de *Puccinia kuehnii* 24 horas após inoculação nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156. Letras iguais dentro do mesmo experimento não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em porcentagem não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.2 Determinação período de incubação e latência

Na temperatura de 25 °C a variedade SP 891115 foi a primeira a manifestar sintomas visíveis no 9º dia e esporulação da maioria das pústulas no 11º dia após a inoculação das plantas, em ambos os ensaios. No caso da variedade RB 855156, para essa mesma temperatura, o aparecimento das lesões ocorreu no 11º dia em ambos os ensaios e a esporulação no 13º dia no primeiro ensaio e no 14º dia no segundo ensaio. Na temperatura de 18 °C os períodos de incubação e de latência se estenderam, respectivamente, para 18 a 20 dias e 21 a 24 dias nas duas variedades (Tabela 1).

Esse efeito da temperatura no período de latência de ferrugens já foi mostrado para *Puccinia graminis tritici*. Esse patógeno necessitou de 22 dias para formar novos urediniosporos a 5 °C, e somente cinco a seis dias em temperatura de 23 °C (Agrios, 2005).

Se considerarmos somente a temperatura de 25 °C, a variedade RB 855156 mostrou períodos de incubação e latência mais longos que a variedade SP 891115, indicando maior resistência da primeira quando avaliada por essas variáveis.

Parlevliet (1979) considera o alongamento do período de latência como um dos maiores componentes de resistência que afeta o desenvolvimento dos patógenos, junto com a redução da frequência de infecção e a diminuição da produção de esporos.

Tabela 1 - Períodos de incubação e latência em dias de *Puccinia kuehnii* nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156 e duas temperaturas; 18°C e 25°C

TEMPERATURA	18°C				25°C			
	Incubação (dias)		Latência (dias)		Incubação (dias)		Latência (dias)	
Variedade	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
SP 891115	18	19	21	22	9	9	11	11
RB 855156	18	20	21	24	11	11	13	14

### 2.3.3 Incidência: Frequência de infecção

A frequência de infecção na variedade SP 891115 não foi influenciada pela temperatura, em ambos os ensaios. No primeiro experimento, essa variedade apresentou média de 2,9 pústulas/cm<sup>2</sup> em ambas as temperaturas. No segundo experimento suas médias foram 5,2 e 5,6 pústulas/cm<sup>2</sup> a 18 °C e 25 °C, respectivamente. A variedade RB 855156, no entanto, exibiu efeito da temperatura nessa variável. Em ambos os experimentos, a frequência de infecção a 25 °C foi muito superior à obtida a 18 °C (Figura 10).

Esses resultados provavelmente se relacionam com o tipo de resistência apresentado pelas variedades testadas. Conforme Agrios (2005) e Camargo (2011), a resistência poligênica, também chamada de resistência horizontal, é influenciada por fatores ambientais.

De fato, efeito quantitativo na reação de variedades de cana à ferrugem alaranjada foi relatado recentemente no Brasil. Klosowski (2012) trabalhando com oito progênies de cana, oriundas de cruzamentos entre parentais com diferentes reações à ferrugem alaranjada, encontrou somente uma progênie com comportamento condizente com a hipótese de um gene de efeito maior. Nas outras progênies as reações foram governadas por efeitos de vários genes de efeito menor

agindo quantitativamente. A autora concluiu que a resistência de nossas variedades à ferrugem alaranjada é governada por um gene principal e por vários genes menores agindo de forma quantitativa.

Assim, analisando-se os resultados de frequência de infecção obtidos neste trabalho à luz dessa informação, pode-se concluir que a variedade RB 855156 possui maior resistência horizontal à infecção em temperaturas mais baixas que a variedade SP 891115. Contrariamente, Park et al. (1992), demonstraram maior resistência de certos cultivares de trigo à *Puccinia striiformis* pv. *tritici* em temperaturas mais altas.

As médias de frequência de infecção no segundo ensaio foram bem superiores às do primeiro ensaio, com exceção para a RB 855156 a 18 °C (Figura 10). Esse fato está em concordância com os resultados de pré-infecção, já discutidos acima, e refletem a maior qualidade do inóculo utilizado no segundo experimento.

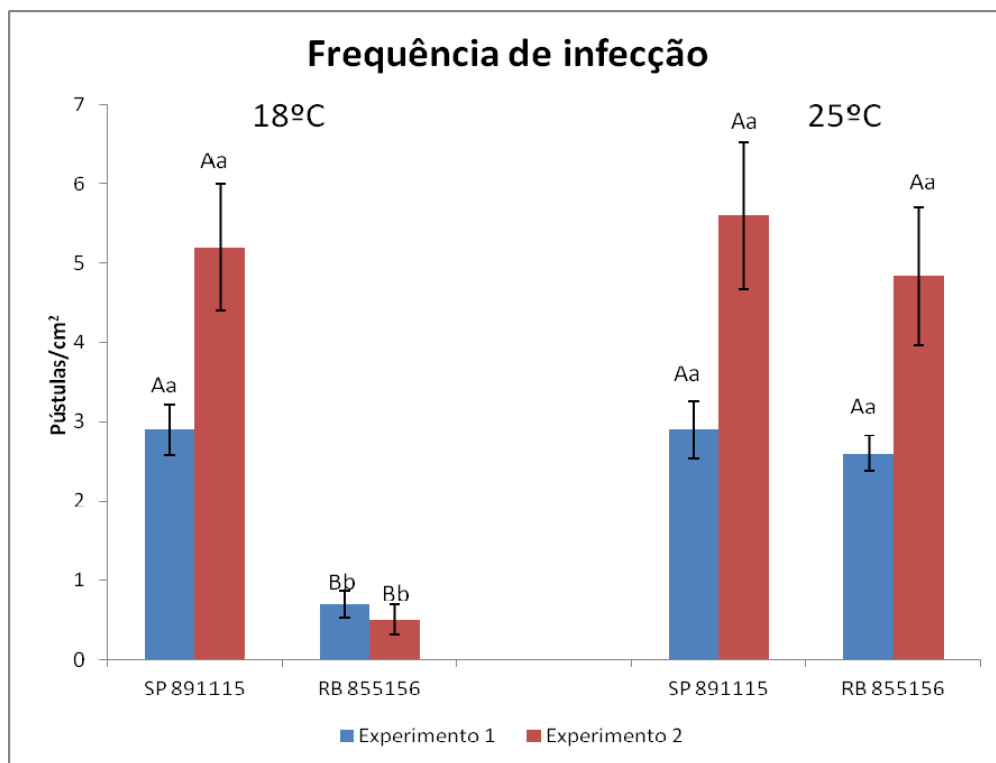


Figura 10 - Número médio de pústulas por cm<sup>2</sup> de área nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156, sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em cm<sup>2</sup> não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média

#### **2.3.4 Severidade: Área foliar afetada**

A temperatura influenciou significativamente a severidade da ferrugem alaranjada nas duas variedades de cana e nos dois experimentos. Comparando-se a mesma variedade, a severidade da doença foi de 4 a 11 vezes maior na temperatura de 25 °C (Figura 11).

A menor severidade em temperaturas mais baixas pode ser explicada por três hipóteses: (i) a temperatura baixa reduz o desenvolvimento do patógeno e, conseqüentemente, da doença; (ii) menor freqüência de infecção na temperatura mais baixa e (iii) a temperatura mais baixa pode intensificar as respostas de resistência da planta. A primeira hipótese é facilmente compreendida, pois a temperatura tem grande influência no desenvolvimento de microrganismos. A segunda hipótese é válida especialmente para a variedade RB 855156, pois essa variedade apresentou menor freqüência de infecção, conforme já mostrado. A terceira hipótese se relaciona com o conceito de resistência horizontal e sua influência por variáveis ambientais, já discutido anteriormente e demonstrado por Park et al. (1992).

Conforme já mostrado para a variável freqüência de infecção, a variedade RB 855156 parece ser mais resistente em baixas temperaturas. Assim, para essa variedade, a menor severidade a 18 °C pode ser devido à combinação das três hipóteses acima. Para a variedade SP 891115, no entanto, somente as hipóteses (i) e (iii) podem explicar a baixa severidade a 18 °C, uma vez que essa variedade não mostrou diferenças na freqüência de infecção entre as duas temperaturas estudadas.

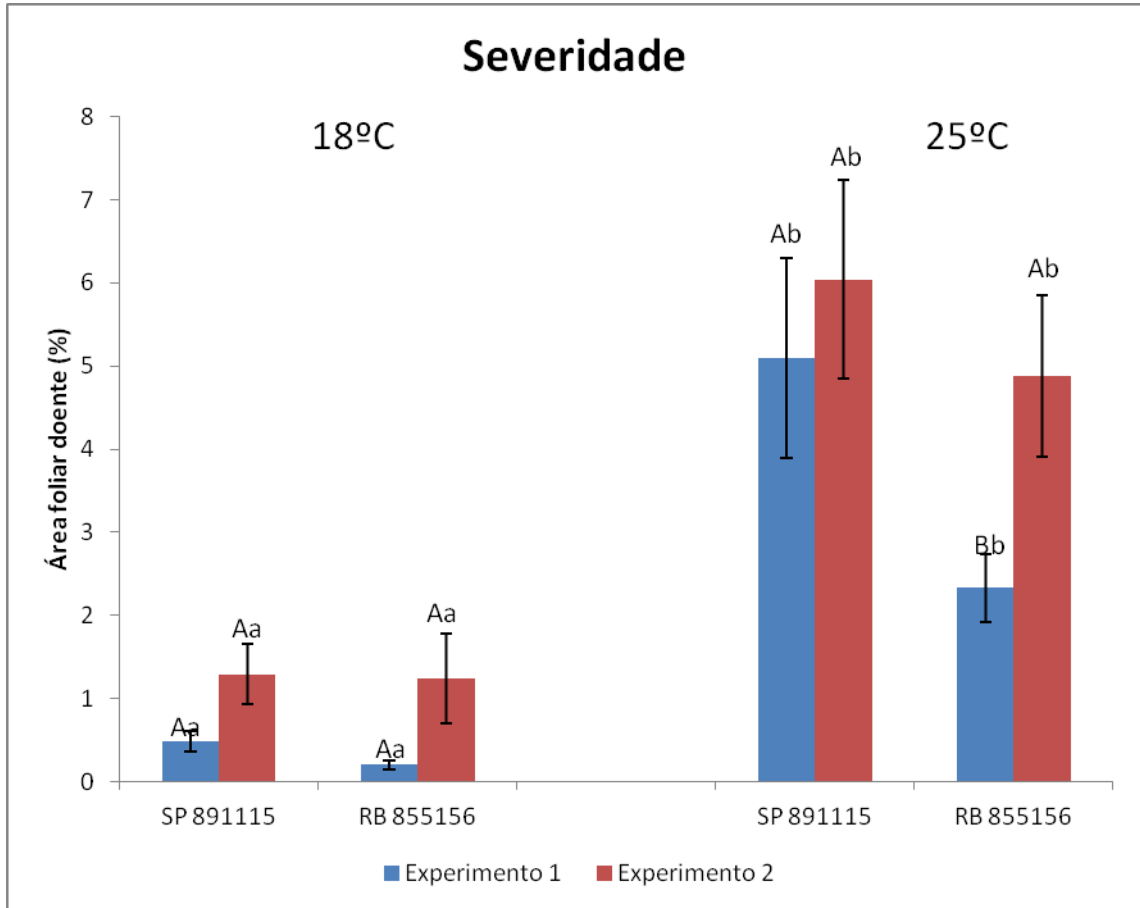


Figura 11 - Área foliar das variedades de cana SP 891115 e RB 855156 afetadas pela ferrugem alaranjada sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em porcentagem não transformados. Para a análise estatística as médias foram transformadas para  $\sqrt{x+1}$ . As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.5 Área das pústulas

Na temperatura de 25 °C ambas as variedades apresentaram área das pústulas semelhantes, para os dois ensaios. A 18 °C, a área média das pústulas da variedade SP 891115 foi ligeiramente menor que a área para essa mesma variedade a 25 °C, porém essa diferença não foi significativa pelo teste estatístico, mostrando que essa variedade foi pouco afetada nessa variável pela temperatura. Entretanto, a 18 °C a variedade RB 855156 mostrou pústulas significativamente menores em relação à variedade SP 891115, em ambos os ensaios (Figura 12). De acordo com Simons (1979) cultivares de aveia com diferentes graus de resistência a *Puccinia coronata* mostram reações que vão de pequenas manchas até pústulas de tamanho pequeno a médio, necróticas ou cloróticas bem definidas.



Esses resultados reiteram a hipótese comentada anteriormente de que a variedade RB 855156 possui maior nível de resistência horizontal na temperatura de 18 °C. A menor área de pústulas observada para essa variedade não pode ser atribuída ao menor desenvolvimento do fungo nessa temperatura, uma vez que na variedade SP 891115 esse efeito não foi observado.

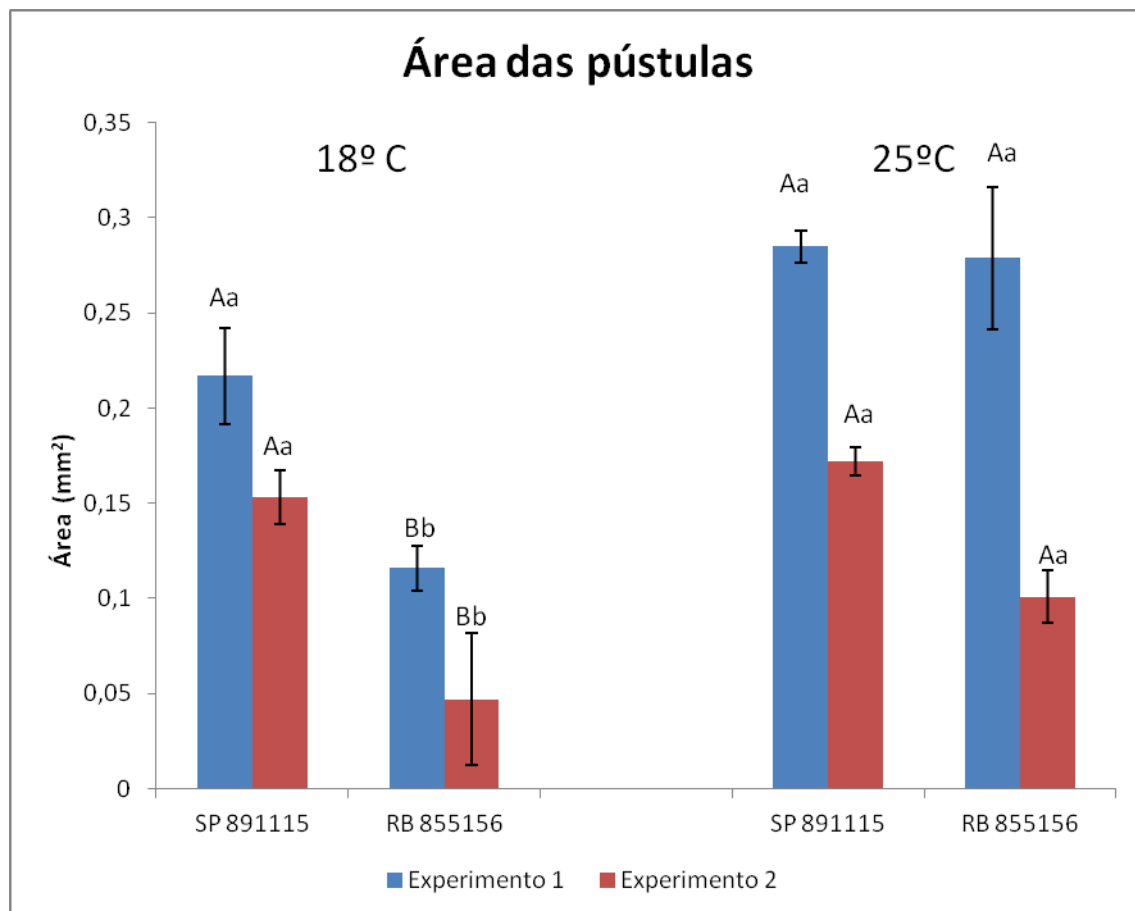


Figura 12 - Área média das pústulas de ferrugem alaranjada nas variedades de cana SP 891115 e RB 855156 sob duas temperaturas. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em mm<sup>2</sup> não transformados. Para a análise estatística as medias foram transformadas para  $\sqrt{(x+1)}$ . As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.6 Esporulação

As médias da contagem dos urediniósporos demonstraram diferença no primeiro experimento, sendo que as melhores condições para o desenvolvimento da doença levou à maior esporulação. No segundo experimento, entretanto, apesar da

melhor qualidade do inóculo utilizado, a esporulação foi bem menor em relação ao primeiro e a diferença em função da temperatura não foi observada (Figura 13).

Segundo Parlevliet (1979) a menor quantidade de inóculo formado pode constituir um componente de resistência, porém esse efeito não foi observado entre as duas variedades testadas, indicando que, para essa variável, ambas possuem mesmo nível de resistência.

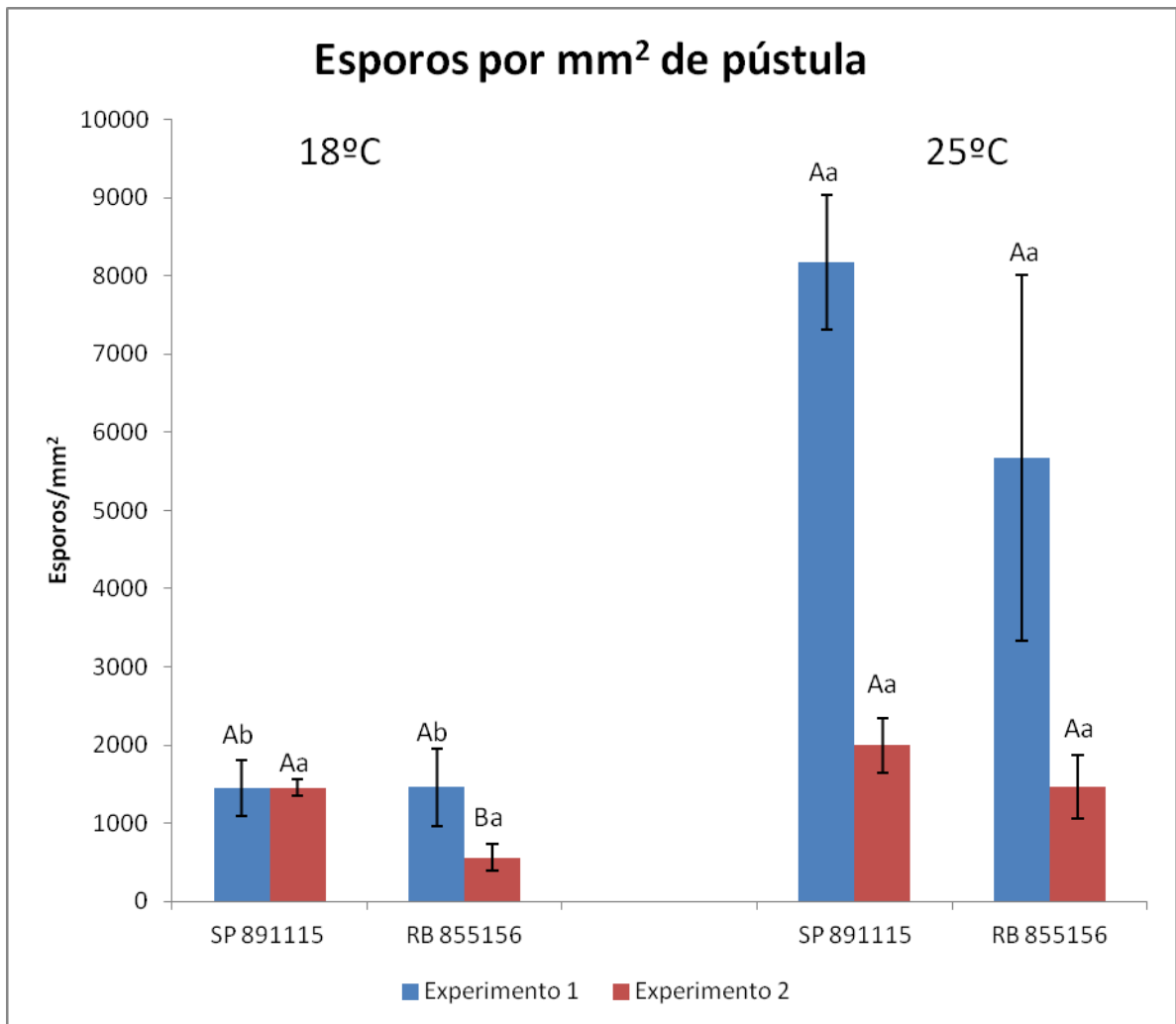


Figura 13 - Medias de urediniósporos em relação a área das pústulas onde foram produzidas. Avaliações em condições de 18 e 25 °C para SP 891115 e RB 855156. Letras maiúsculas servem para comparar entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas para comparar entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em medias de numero de esporos por mm<sup>2</sup> não transformados. Para a análise estatística as medias foram transformadas para log x. As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.7 Viabilidade dos esporos

A viabilidade dos esporos produzidos nas duas variedades e nas duas condições de temperatura foi alta (Figura 14). De modo geral, em ambos os

experimentos, pouco ou nenhum efeito de variedade ou temperatura foi observado na viabilidade dos esporos produzidos, indicando que esses fatores não têm influência sobre essa variável. Valores de viabilidade ligeiramente superiores foram obtidos para o segundo experimento em relação ao primeiro, o que pode refletir a maior qualidade do inóculo inicial utilizado naquele ensaio.

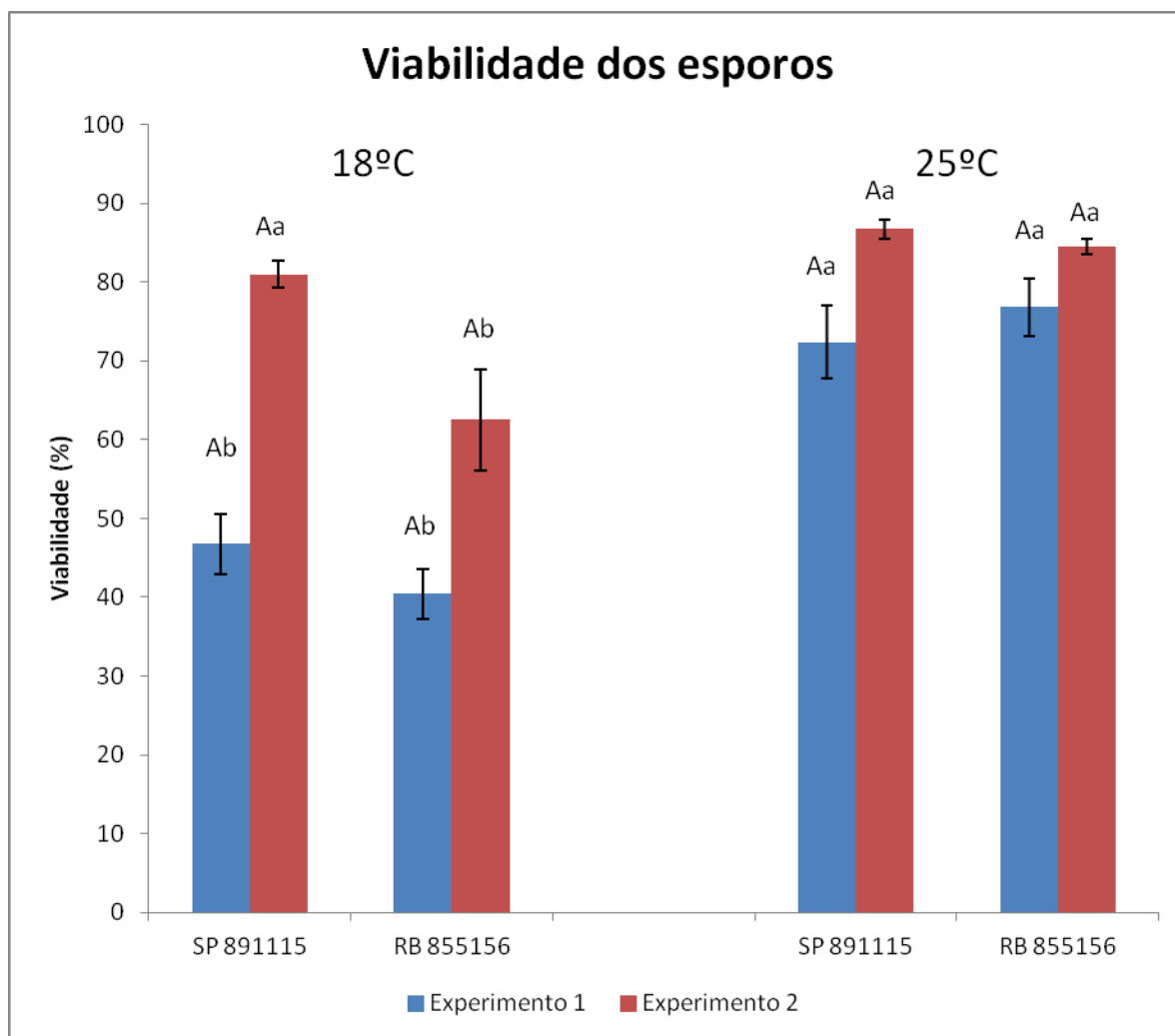


Figura 14 - Porcentagem de viabilidade dos esporos produzidos a 18 e 25 °C em SP 891115 e RB 855156. Letras maiúsculas são para comparação entre variedades dentro de uma mesma temperatura e mesmo experimento. Letras minúsculas são para comparação entre temperaturas dentro da mesma variedade e mesmo experimento. Nessas situações letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados em médias de porcentagem de germinação de esporos. As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.8. Estruturas características do fungo produzidas durante seu ciclo

Nas observações feitas com Microscopia de Varredura, podem-se visualizar nitidamente algumas estruturas características do fungo no tecido foliar.

Urediniósporos com tubo germinativo e apressório desenvolvido encima do estômato foram detectados, indicando pré-infecção bem sucedida (Figura 15 e 16). Em alguns casos foi possível notar até mesmo o ponto de onde o “peg” de penetração se originou no apressório e invadiu o estômato (Figura 15).

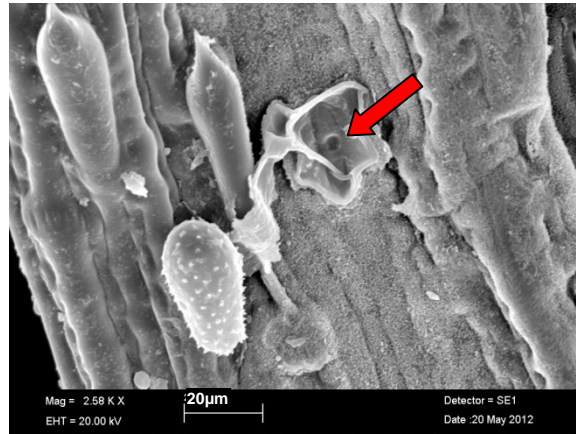


Figura 15 - Urediniósporo germinado com tubo germinativo e apressório formado encima do estômato de uma folha da variedade SP 891115. Notar o ponto de emissão do “peg” de penetração (seta)

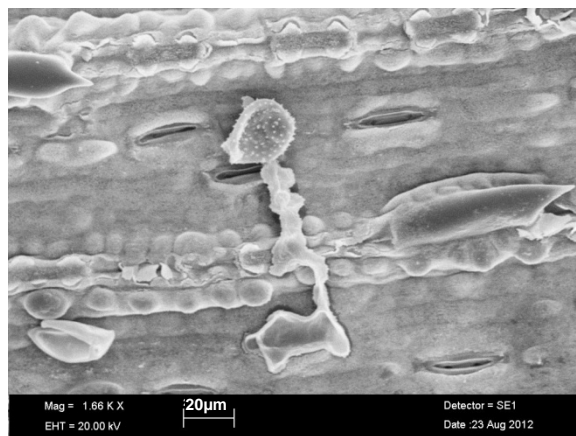
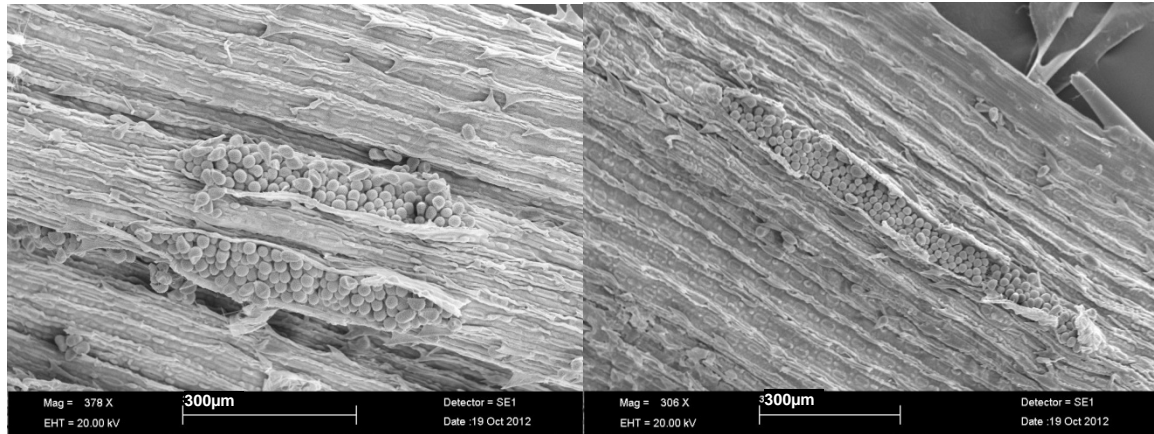
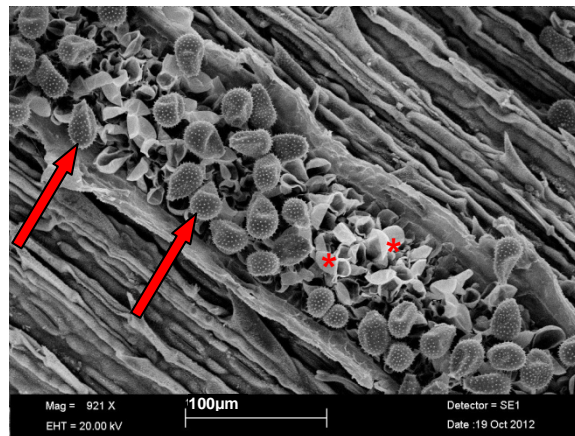


Figura 16 - Urediniósporo germinado com tubo germinativo e apressório formado encima do estômato da variedade RB 855156

Também puderam ser vistas pústulas abertas, onde pode-se observar urediniósporos maduro proximos a serem liberados (Figura 17 e 18). Na figura 18 observa-se uma pústula madura da variedade SP 891115, onde é possível se observar, além dos urediniósporos nitidamente equinulados, as paráfises.

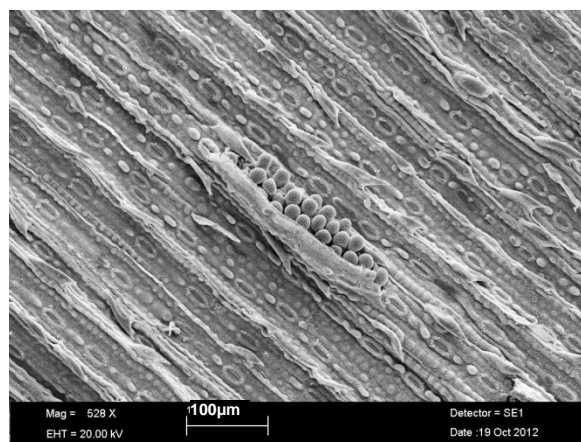


Figuras 17 - Pústulas abertas nas variedades SP 891115 (esquerda) e RB 855156 (direita) com exposição de urediniósporos



Figuras 18 - Pústula aberta na variedade SP 891115 com exposição de urediniósporos (setas) e paráfises (asterisco)

Na figura 19 observa-se uma pústula de pequeno tamanho recém formada na variedade RB 855156.



Figuras 19 - Pústula de tamanho pequeno em folha do cultivar RB 855156

Os cortes transversais das amostras incluídas em resina Spurr mostraram detalhes das pústulas (Figuras 20 e 21). Assim, puderam ser visualizados os danos nos tecidos internos da folha em pústulas em avançado estágio de desenvolvimento, rompimento da epiderme e formação dos urediniósporos. Em maior magnificação (Figura 21) foi possível observar detalhes dos urediniósporos maduros equinulados.



Figura 20 - Corte transversal de uma pústula aberta em folha de cana-de-açúcar da variedade SP 891115. Setas indicam a epiderme foliar rompida



Figura 21 - Corte transversal de uma pústula aberta em folha de cana da variedade SP 891115. A seta mostra um urediniósporo com equinulas



### 3 CONCLUSÕES

- Inóculo constituído por urediniósporos produzidos em plantas mantidas em condições controladas é mais adequado para inoculações artificiais da ferrugem alaranjada, visando estudar os parâmetros monocíclicos da doença.
- A temperatura de 25 °C é mais favorável ao desenvolvimento da ferrugem alaranjada em relação à de 18 °C.
- A variedade RB 855156 mostrou maior nível de resistência poligênica à ferrugem alaranjada em relação à variedade SP 891115. Essa resistência manifestou-se em maiores períodos de incubação e latência, menor frequência de infecção e menor área das pústulas.
- A resistência poligênica da variedade RB 855156 à ferrugem alaranjada mostrou ser influenciada pela temperatura, sendo maior na temperatura de 18 °C do que a 25 °C.





## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5<sup>th</sup> ed. London:Elsevier, 2005. 922p.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia I**. 4 ed. Piracicaba:Ceres, 2011. cap 4. p.59-99.
- ARAÚJO, K.L.; GILIO, T.A.S.; SANCHES, P.R.B.; NEUBAUER, R.A.; FAGUNDES, C.; BASSAN, B.E.; RODERO,D.P.; RODERO, D.C.P.; GIGLIOTI, E.A.; CANTERI, M.G. Monitoramento da favorabilidade genotípica para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil, Valparaíso, SP, 2010. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA,44., 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, Brasília: Associação Brasileira de Fitopatologia, 2011. v.36 (suplemento). p.839. 1CD-ROM.
- ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of Sugarcane Cultivar R 570 to *Puccinia melanocephala* Isolates from Different Geographic Locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85,n. 3, p. 123-158, 2001.
- 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,
- BEDENDO, I.P. Ferrugens. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia I**. 4 ed. Piracicaba:Ceres. 2005. cap. 28 p.479-492.
- BOWELL, J.B. Controlled Infection by *Puccinia graminis f. sp. tritici* under Artificial Conditions. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**. New York: Academic Press, 1984 .chap.10 p. 308
- BRAITHWAITE, K.S.; CROFT, B.J.; MAGAREY, R.C.; SCHARASCHKIN, T. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 38, n. 4, p. 380-388, 2009.
- CADAVID, M.; ÁNGEL, J.C.; VICTORIA, J.I. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 1, p. 143, 2012.
- CAMARGO, L.E.A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – v.1: Princípios e conceitos**. São Paulo:Agronômica Ceres, 2011. Cap. 15 p. 325-341.
- CHAVARRÍA, E.; SUBIRÓS, F.; VEGA, J.; RALDA, G.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; CASTLEBURY, L.A. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Costa Rica and Nicaragua. **Plant disease**, Saint Paul, v. 93, n. 4, p. 425, 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.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Cana-de-açúcar: Segundo levantamento agosto, 2012. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_05\\_09\\_11\\_59\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_agosto\\_2012\\_2o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf). Acesso em: 10 nov. 2012.

DÍAZ, C.G.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; LOPES, D.B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v.26 n.1, p.71-76, 2001.

DIXON, L.J.; CASTLEBURY, L.A.; AIME, M.C.; GLYN, N.C.; COMSTOCK, J.C. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. **Mycological progress**. Germany: Springer, v. 9, p. 459-468, 2010.

FLORES, R.C.; LOYO, J.R.; OJEDA, R.A.; RANGEL, O.C.A.; CERÓN, F.A.; MÁRQUEZ, W.; GUERRA-MORENO, A.S.; HERNANDEZ-IBARRA, H.M.; GONZÁLEZ, R.E.; CASTLEBURY, 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.

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**, Saint Paul, v. 59, n. 4, p. 703-711, 2010.

HARDER, D.E. Developmental ultrastructure of hyphae and spores. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**. I. New York: Academic Press, 1984 chap.11 p. 322-361.

HARDER, D.E. ; CHONG, J. Structure and Physiology of Haustoria. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**. New York: Academic Press, 1984. chap.14 p. 416-460.

HIRATSUKA, Y.; SATO, S. Morphology and taxonomy on rust fungi. In: SCOTT, K.J.; CHAKRAVORTY, A.K. **The rust fungi**. Antrim:Academic Press, 1982. chap.1, p. 1-36.

INDEX FUNGORUM. *Puccinia kuehnii*. 2012. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=243512>. Acesso em: 23 out. 2012.

INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, E.; GONZALEZ, N. *Puccinia kuehnii* (Kruger) Butler y *Puccinia melanocephala* H. Sydow y P. Sydow. en el cultivo de la caña de azúcar. **Revista Protección Vegetal**, La Habana, v. 24, n. 1, p. 22-28, 2009.

ISSARD, S.A.; RUSSO, J.M. Risk assessment of aerial transport of rust pathogens to the Western Hemisphere and within North America. **Proceedings Borlaug Global Rust Initiative**, Minnesota, p.25-34, 2011.

KLOSOWSKY, A.C. **Escala diagramática, segregação da resistência em progênies de cana-de-açúcar e reação de cultivares à ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*)**. 2012.76p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LITTLEFIELD, L.J.; HEATH, M.C. **Ultrastructure of rust fungi**. New York:Academic Press,1979. chap.12 p. 3-91.

MACLEAN, D.J. Axenic cultura and metabolism of rust fungi. In: SCOTT, K.J.; CHAKRAVORTY, A. K. **The rust fungi**. Antrim:Academic Press, 1982. chap.2 p. 37-122.

MAGAREY, R.C. Orange Rust. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed.). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 121-125.

MAGAREY, R.C.; WILLCOX, T.; CROFT, B.; CORDINGLEY, A. Orange rust, a major pathogen affecting crops of Q124 in Queensland in 2000. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technology**, Queensland, v. 23, p. 274-280, 2001.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*), 2010. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Ferrugem%20A laranjada.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Ferrugem%20A%20alaranjada.pdf)>. Acesso em: 18 set. 2012.

MASSOLA, N.S. ; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos.In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia** I. 4 ed. Piracicaba:Ceres. 2011. cap. 8. p. 149-206

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

MORDUE, J.E.M. Urediniospore ornamentation in the sugarcane pathogens *Puccinia kuehnii* and *Puccinia melanocephala*. **Transaction of the British mycological society**, Cambridge, v 84, n. 4, p.758-760, 1990

MOREIRA, A.S.; GONÇALVES, C.R.;RICCI, A.; BERGAMIN FILHO, A. Reaction of thirteen sugarcane varieties to orange rust, caused by *Puccinia kuehnii* . ANNUAL MEETING, 2012 .

OVALLE, W.; COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N.C.; CASTLEBURRY, 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.

PARK, R.F.; ASH GJ, REES R.G. Effects of temperature on the response of some Australian wheat cultivars to *Puccinia striiformis* f.sp *tritici*. **Mycological Research**, New York, v. 96, p. 166–170, 1992.

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, v.17. p. 203-222, 1979.

PÉREZ-VICENTE, L.; MARTÍN-TRIANA, E.L.; BARROSO, F.; MARTÍNEZ-DE LA PARTE, E.; BORRÁS-HIDALGO, O.; HERNÁNDEZ ESTÉVEZ, I.H. Definitive identification of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Cuba. **New Disease Reports**, Reading, v. 20, p. 16, 2009.

PURDY, L.H. Sugarcane rust. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**. New York: Academic Press, 1985. v.2. p. 238-255

RAID,R.N COMSTOCK, J.C.; GLYNN, N.C. Evaluation of fungicides for control of orange rust on sugarcane. ASSCT – Joint Meeting abstract presented. Revista Sugar Journal. Junho de 2009. Disponível em: <[http://www.sugarjournal.com/articles/active\\_subs/2009/June2009/SJ\\_June09\\_ASSCT.pdf](http://www.sugarjournal.com/articles/active_subs/2009/June2009/SJ_June09_ASSCT.pdf)> Acesso em: 10 Nov. 2012.

REZENDE, J.A.M.; MASSOLA, N.S.; BEDENDO, I.P. ;KRUGNER, T.L. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia** I. 4 ed. Piracicaba. Ceres. 2011. cap. 3 p.37-58.

SAVILE, D.B.O. Taxonomy of the cereal rust fungi. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**. New York: Academic Press ,1984 .ch.3 117p.

SEADE. Fundação Sistema Estadual de Análises de Dados. O PIB Paulista em 2010. Disponível em: <[http://www.seade.gov.br/produtos/pib/pdfs/pib\\_analise\\_2010.pdf](http://www.seade.gov.br/produtos/pib/pdfs/pib_analise_2010.pdf)> Acesso em: 4 jan. 2013.

SIMONS, M.D. Crown Rust. In: ROELFS; A.P.; BUSHNEL, W.R. **The cereal rusts**.. New York: Academic Press, 1985. v.2 p. 131-172

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

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. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, cap. 21, p.185-196.

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

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

WALLIS, E.S. Research and development for the Australian sugar industry: Developments since 1995. **Proceeding of South African Sugar Technology Association**, South Africa, v.2, n.6, p. 1-8, 2002.

WOLF, G. Physiology and biochemistry of spore germination. In: : SCOTT, K.J.; CHAKRAVORTY, A.K. **The rust fungi**. Antrim: Academic Press, 1982.chap. 4, p. 151-178.

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