

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRESENÇA DO GENE BRU1 E COMPORTAMENTO
DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E
ACESSOS EXÓTICOS A *Puccinia melanocephala***

Ana Caroline Neuber

Bióloga

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRESENÇA DO GENE BRU1 E COMPORTAMENTO
DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E
ACESSOS EXÓTICOS A *Puccinia melanocephala***

Ana Caroline Neuber

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Dr. Mauro Alexandre Xavier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2015

N478p Neuber, Ana Caroline
Presença do gene Bru1 e comportamento diferencial de genótipos de cana-de-açúcar e acessos exóticos a *Puccinia melanocephala* / Ana Caroline Neuber. -- Jaboticabal, 2016
iv, 45 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Luciana Rossini Pinto
Banca examinadora: Antonio de Goes, Ivan Antônio dos Anjos
Bibliografia

1. *Puccinia melanocephala*. 2. *Saccharum spp.* 3. Marcador molecular. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “PRESENÇA DO GENE BRU1 E COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E ACESSOS EXÓTICOS A *Puccinia melanocephala*”

AUTORA: ANA CAROLINE NEUBER

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MAURO ALEXANDRE XAVIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP

Prof. Dr. ANTONIO DE GOES
Departamento de Fitossanidade / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. IVAN ANTONIO DOS ANJOS
Instituto Agronômico de Campinas / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 30 de novembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA CAROLINE NEUBER- nascida em 15 de julho de 1988 em São Paulo (SP), Brasil. Ingressou em 2007, no curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário Barão de Mauá. No ano de 2012 recebeu o grau de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas e em março deste mesmo ano, iniciou o treinamento técnico (TT3) no Laboratório de Biotecnologia do Centro Avançado da Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana-IAC/ Apta, sendo bolsista FAPESP (Fundação de Amparo À Pesquisa Do Estado de São Paulo) durante o período, onde auxiliou alunos de mestrado e doutorado em seus projetos. Em agosto de 2013 ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Campus de Jaboticabal, sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) durante o curso.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine” (1 Coríntios 13:1)

Dedico

A minha família, meus pais Agda Beatris e Ismar Neuber, minha irmã Fernanda e minha avó Lenir por serem minha base, meu refúgio e maiores exemplos.

Ofereço

Ao meu namorado Igor Favero, exemplo de generosidade, bondade, honestidade e tantas outras qualidades. Apoiou-me nos momentos mais difíceis com suas palavras de carinho e incentivo, sempre acreditando no meu potencial. Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** o qual me dá força para enfrentar qualquer situação, me guiando sempre para o melhor caminho.

Aos meus **pais** por todo amor, dedicação e esforço para me proporcionar uma boa educação e me ensinar que o conhecimento é algo precioso e que ninguém pode nos tirar.

À minha amada **irmã**, que sempre me ajudou e incentivou em todos os momentos da minha vida.

Ao meu sobrinho **Miguel**, que mesmo tão pequeno me motivou.

À minha **avó**, querida que sempre torceu por meu sucesso, com suas orações e palavras de incentivo.

Ao meu **namorado**, o qual me apoiou durante toda minha jornada acadêmica e esteve sempre ao meu lado, fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos meus **sogros**, que sempre me incentivaram, apoiaram e torceram por mim.

À **Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal** e ao **Instituto Agrônomo de Campinas**, pela oportunidade de poder cursar o mestrado em genética e melhoramento de plantas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela concessão da bolsa de estudo.

À **Dra. Luciana Rossini Pinto**, pela orientação, dedicação e confiança a mim depositada. Meus sinceros agradecimentos por todo aprendizado durante todos esses anos de convivência.

Ao **Prof. Dr. Dilermano Perecinin**, por me ajudar nas análises estatísticas desse trabalho e pelo exemplo de professor.

Ao **Dr. Mauro Alexandre Xavier**, pela orientação, ensinamentos e por me auxiliar em todos os momentos que precisei.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana, os quais me acrescentaram não só conhecimento, mas me ensinaram a ser uma pessoa melhor, **Maicon**, pela amizade sincera, por me ajudar em todos os momentos que precisei e pelo exemplo de bondade, às

irmãs **Maria Letícia** e **Maria Natália**, pela alegria, amizade, risadas, carinho e pelo coração gigante das duas, sempre dispostas a ajudar; à **Fernanda Raquel**, pela ajuda com as inoculações, alegria e aprendizado; **Rafael**, pelas caronas, conversas interessantes e bom humor; **Izadora**, pela alegria, conversas e risadas, **Larissa**, pelo incentivo e amizade, **Thais**, pelos ensinamentos, conversas e ajuda, **Debora** pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar, **Carol Pani**, pela amizade e ajuda durante as disciplinas do mestrado, **Daniel Nunes** pelas caronas e conversas.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO -	iii
ABSTRACT-	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	3
2.1.1 O melhoramento genético da cana-de-açúcar	4
2.2 A ferrugem da cana-de-açúcar	6
2.2.1 História e importância econômica da doença	6
2.2.2 Etiologia e Sintomatologia	7
2.3 Aspectos genéticos da cana-de-açúcar e a resistência a ferrugem-marrom	9
2.3.1 O uso de marcadores moleculares no melhoramento de cana-de-açúcar ..	12
2.3.2 Marcadores moleculares associados à resistência a ferrugem-marrom	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Cultivares, clones e acessos selvagens de cana-de-açúcar	15
3.2 Extração, quantificação e integridade do DNA	19
3.3 Amplificação com os pares de primers R12H16 e 9020-F4	20
3.4 Visualização dos fragmentos de 570pb e 200pb	20
3.5 Agrupamento de cultivares e clones IAC quanto à suscetibilidade a <i>Puccinia melanocephala</i>	21
3.6 Inoculação artificial em casa de vegetação	21
3.7 Avaliação da severidade	22
3.8 Análise de dados	23

3.8.1 Análise de variância e correlação entre marcadores e notas de severidade a ferrugem-marrom dos acessos exóticos de cana-de-açúcar.....	23
3.8.2 Análise de agrupamento.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Frequência do gene Bru1 nas cultivares brasileiras e clones IAC.....	24
4.2 Frequência do gene Bru1 em acessos exóticos de cana-de-açúcar.....	24
4.3 Relação entre a presença dos marcadores indicativos da presença do gene Bru1 e o fenótipo de resistência a ferrugem marrom nas cultivares.....	26
4.4 Análise de severidade de sintomas resultantes da inculação de <i>Puccinia melanocephala</i> em acessos exóticos de cana-de-açúcar.....	27
4.5 Análise de correlação entre marcadores e resistência a ferrugem marrom para os acessos exóticos de cana-de-açúcar.....	31
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	35
7 REFERÊNCIAS.....	36

PRESENÇA DO GENE BRU1 E COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR E ACESSOS EXÓTICOS A *Puccinia melanocephala*

RESUMO - É sabido que a utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento constitui uma ferramenta importante, pois permite identificar indivíduos superiores em fases juvenis, acelerando o processo de desenvolvimento de cultivares. A ferrugem marrom é uma doença causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* responsável por grandes prejuízos no setor canavieiro. Recentemente foram desenvolvidos marcadores moleculares, 9020-F4 e R12H16, os quais flanqueiam o maior gene de resistência à ferrugem marrom, conhecido como Bru1. O presente trabalho objetivou determinar a frequência do gene Bru1 em acessos exóticos de cana-de-açúcar, cultivares brasileiras e clones do Programa IAC bem como avaliar a sua eficiência na identificação de genótipos resistentes. Através da reação de PCR utilizando os marcadores, foi possível inferir a frequência do gene Bru1, e comparar esses resultados com a classificação fenotípica das cultivares brasileiras e clones IAC (IAC, CTC, SP e RB), quanto à suscetibilidade a doença. Além disso, foi conduzido um experimento em casa de vegetação, utilizando acessos de *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinense* e *Saccharum robustum*, os quais foram inoculados artificialmente com o fungo *Puccinia melanocephala* e avaliados semanalmente visando determinar o grau de suscetibilidade à ferrugem marrom. Posteriormente, os resultados obtidos foram comparados com a presença ou ausência do gene Bru1. Nas cultivares brasileiras a frequência do gene Bru1 foi alta, 75,21%, porém nos acessos exóticos foi de apenas 18 %. Verificou-se que grande parte das cultivares que possuem o gene Bru1 é classificada como resistente. Nos acessos exóticos inoculados artificialmente, a correlação entre a presença dos marcadores indicativos do gene Bru1 com as notas de severidade foi baixa e não significativa, provavelmente devido à presença de outra fonte de resistência ou falha na complementariedade da sequência dos primers no genoma desses acessos.

Palavras-chave: Ferrugem marrom, *Saccharum spp* L., marcador molecular, resistência.

**SURVEY OF THE BRU1 GENE AND DIFFERENTIAL BEHAVIOR OF
SUGARCANE GENOTYPES AND WILD ACES TO *Puccinia*
*MELANOCEPHALA***

ABSTRACT- It is known that the use of molecular markers is an important tool which allows the identification of superior individuals in juvenile stages speeding up the cultivar development process. Sugarcane brown rust caused by the fungus *Puccinia melanocephala* is among the most important sugarcane diseases. Recently, two diagnostic molecular markers (R12H16, 9O20-F4) flanking the Bru1 gene, which is pointed as the major gene conferring brown rust resistance reported for sugarcane today were publish in the literature. The present study aimed to determine the frequency of the Bru1 gene in sugarcane exotic accessions, Brazilian varieties and elite clones from IAC program as well as to evaluate the efficiency of these markers to identify resistant genotypes. By using the Bru1 markers, it was possible to infer the frequency of Bru1 gene, and compare the results with the phenotypic classification of sugarcane Brazilian varieties and IAC clones (IAC, CTC, SP and RB) for susceptibility to the disease. Moreover, *S. spontaneum*, *S. sinense* and *S. robustum* accessions were artificially inoculated with the fungus *P. melanocephala* and weekly evaluated in greenhouse conditions. The degree of brown rust susceptibility of the accessions was compared with the presence or absence of Bru1 gene markers. The frequency of the Bru1 gene in the Brazilian varieties was high (75.21%) while only 18% of the sugarcane exotic accessions showed the Bru1 gene. Most of the varieties that presented the gene were classified as resistant. Low marker-phenotypic correlation was observed for the artificially inoculated sugarcane exotic accessions, probably due to the presence of other sources of resistance or failure of the sequence complementarity of the primers in the genome of these accesses. Generally these markers proved to be efficient in the selection of genotypes resistant to brown-rust.

Keywords: Brown rust, *Saccharum spp* L., molecular marker, resistance.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é conhecida mundialmente pela sua importância econômica, utilizada para a produção de açúcar, etanol, fonte de energia “limpa” e na alimentação de animais (MATSUOKA et al., 1999). O Brasil destaca-se na produção de açúcar e área plantada com cana-de-açúcar, liderando o ranking mundial (HENRY, 2010).

Entre os problemas fitossanitários da cana-de-açúcar, a ferrugem marrom possui forte impacto econômico, diante dos prejuízos que pode gerar. Atualmente a doença encontra-se distribuída em grande parte das áreas produtoras de cana-de-açúcar (RYAN & EGAN, 1989). Esta doença é causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, que provoca lesões no tecido foliar, reduzindo a área foliar verde e, conseqüentemente, interferindo no processo fotossintético da planta, a qual tem seu crescimento e produção prejudicados (TOKESHI & RAGO, 2005).

A característica de resistência é um fator de alta herdabilidade (SORDI et al., 1988; HOGARTH et al., 1993). Além disso, foi confirmada a presença de um gene com efeito maior de caráter dominante (DAUGROUIS et al., 1996; RAMDOYAL et al., 2000).

Com o advento dos marcadores moleculares, novos avanços no melhoramento de cana-de-açúcar têm sido observados, isso porque é possível analisar os materiais baseado em seu genótipo, descartando o efeito ambiental, o que aumenta a eficiência e auxilia o processo de melhoramento genético, visto que, a maioria das características de importância agrônômica são quantitativas e influenciadas pelo ambiente (CARLINI-GARCIA et al., 2012).

Por meio de estudos de mapeamento genético e detecção de QTL (Quantitative Trait Locus) em cana-de-açúcar, foram descobertos dois genes responsáveis pela resistência à ferrugem marrom, Bru1 (DAUGROIS et al., 1996) e Bru2 (RABOIN et al., 2006). A partir destas análises, foram desenvolvidos dois marcadores, R12H16 e 9020-F4, os quais estão fortemente associados um ao outro e que podem funcionar como marcador diagnóstico para o gene Bru1 (COSTET et al., 2012). Diversos programas de melhoramento de cana-de-açúcar ao redor do mundo utilizaram esses marcadores para determinar a frequência do gene Bru1 e validar a eficiência dos mesmos como marcador de diagnóstico de resistência (GLYNN et al., 2013; RACEDO et al., 2013; PARCO et al., 2014).

Os objetivos do presente trabalho foram determinar a frequência do gene Bru1 em grupos de acessos exóticos, cultivares brasileiras e clones de cana-de-açúcar do programa IAC, bem como avaliar a eficiência desses marcadores como diagnóstico na identificação de genótipos resistentes a ferrugem marrom.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma poaceae, alógama, da tribo Andropogonae pertencente ao gênero *Saccharum* o qual possui seis espécies principais: *S. officinarum* L. (2n= 80), *S. robustum* (2n= 60-205), *S. barberi* (2n= 81-124), *S. sinense* (2n= 111-120), *S. spontaneum* L. (2n= 40-128) e *S. edule* (2n=60-80), caracterizadas pelo alto grau de poliploidia e frequente aneuploidia (MATSUOKA et al., 1999). A história da domesticação da cana-de-açúcar não é totalmente conhecida, acredita-se que seu centro de origem é na região da Indonésia e Nova Guiné (D'HONT et al., 2008; HENRY, 2010).

Essa cultura possui capacidade de armazenar grandes quantidades de sacarose em seus colmos. A sacarose é processada e convertida em diferentes tipos de açúcares e matérias-primas para as indústrias alimentícias e de bebidas, e etanol combustível (NEVES & CONEJERO, 2010).

Considerada como a cultura industrial mais importante para a produção de energia e açúcar, a cana-de-açúcar é cultivada globalmente em ambientes tropicais e subtropicais, globalmente, sendo o Brasil o maior produtor mundial, destacando-se os estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Paraná (HENRY, 2010). Segundo a CONAB (2014), a produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15 é estimada em 642,1 milhões de toneladas, com queda de 2,5 % em relação à safra anterior, sendo a região sudeste a principal produtora de açúcar (70,75%) e etanol (59,84%).

Além disso, a cana-de-açúcar tornou-se uma cultura importante do ponto de vista ambiental, visto que, um dos produtos gerados é o etanol, e a utilização do mesmo reduz 70% a emissão de CO₂ na atmosfera, comparado com combustível fóssil (CONAB, 2014).

As cultivares de cana-de-açúcar atuais apresentam origem interespecífica, ou seja, derivam no passado da hibridação entre a espécie produtora de açúcar ou espécie nobre, *S. officinarum*, com as espécies selvagens *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. robustum*, seguidas de diversos retrocruzamentos com *S. officinarum*, para recuperação dos teores de açúcar, processo conhecido como nobilização (D'HONT et al., 1995; MATSUOKA et al., 1999; ALBINO et al., 2006).

O número de trabalhos publicados referentes à cana-de-açúcar tem crescido constantemente, mas não têm sido proporcionais, comparado à sua importância mundial, como fonte de energia, alimento e outros (LANDELL & BRESSIANI, 2008).

2.1.1 O melhoramento genético da cana-de-açúcar

Embora a cana seja uma cultura de extrema importância, seu rendimento é baixo. Para reverter esse cenário, a estratégia adotada pelos programas de melhoramento é identificar, selecionar e propagar genótipos superiores, para que sejam desenvolvidas cultivares melhoradas e resistentes a diversos fatores abióticos e bióticos (ALBINO et al., 2006).

No Brasil, destacam-se os programas de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC, Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro-Ridesa e Centro e Tecnologia Canavieira- CTC (BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

Em todo programa de melhoramento de cana-de-açúcar é essencial que haja um bom banco de germoplasma ativo, constituído por genótipos silvestres, visto que os mesmos são utilizados como fonte de características agrônômicas desejadas (MATSUOKA et al., 1999).

A variabilidade genética disponível para seleção é obtida através do cruzamento sexual entre os genitores de interesse. Para isso é necessário promover o florescimento dos mesmos assim como o seu sincronismo. Muitos são os fatores que influenciam o florescimento da cana-de-açúcar, destacando-se o fotoperíodo, temperatura (18° a 35°C) e umidade (MATSUOKA et al., 1999; LABORD, 2007). No Brasil, as regiões litorâneas da Bahia e Alagoas possuem condições climáticas bastante favoráveis ao florescimento e viabilidade do pólen, onde estão localizadas as estações de hibridação de diferentes programas de melhoramento. Na ausência de condições edafoclimáticas específicas para o florescimento da cana, podem ser utilizadas câmaras de fotoperíodo, às quais aplicam condições artificiais que induzem o seu florescimento (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992).

O cruzamento entre os genitores é o ponto de partida para o desenvolvimento de novas cultivares, podendo ser realizado de três maneiras: i) cruzamento biparental, onde se utiliza apenas dois genitores, definindo qual será o genitor

masculino e o feminino, sendo o mais utilizado pelos melhoristas; ii) cruzamento múltiplo, ou policruzamento, neste são utilizados vários genitores masculinos e apenas um genitor feminino, de onde serão coletas as panículas fecundadas por vários machos; iii) polinização livre, pouco utilizado, as sementes são colhidas de inflorescência de plantas que crescem livremente (MATSUOKA et al., 1999; LANDELL & BRESSIANE, 2008). Por se tratar de uma cultura alógama que possui flores hermafroditas e taxa de autofecundação que varia de 2,8 a 17,6%, é necessário que haja um controle para evitar a autofecundação, determinando qual genitor será utilizado como receptor e qual será utilizado como doador de pólen (BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

No momento da seleção dos genitores é importante que os mesmos tenham características de interesse com boa performance *per se* (MATSUOKA et al., 1999). Para ferrugem marrom a herdabilidade tem se mostrado elevada. Dessa forma, a seleção de genitores resistentes à doença pode ser efetiva (SORDI et al., 1981; HOGARTH et al., 1983; BRESSIANI & SANGUINO, 1994).

IDO et al., (2006) avaliaram a incidência e severidade da ferrugem marrom em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná e concluíram que os primeiros meses do ciclo de desenvolvimento da cana-de-açúcar podem ser mais eficientes para a seleção de clones resistentes à ferrugem.

A seleção para indivíduos resistentes a ferrugem marrom é facilmente realizada na terceira fase de seleção (T3), onde os clones são avaliados quanto ao grau de severidade à doença. Nas fases finais, é feito um estudo detalhado com a finalidade de integrar resistência e manejo da época de plantio e colheita para controlar a doença em clones que possuem certo grau de suscetibilidade, mas que apresentam grande potencial produtivo (MATSUOKA et al., 1999)

Devido às diversas etapas de seleção, que varia de acordo com cada programa de melhoramento, o lançamento de uma nova cultivar pode exigir muito tempo, cerca de 9-13 anos. Durante esse período são realizados ensaios em diferentes condições edafoclimáticas e em diferentes anos, aumentando a precisão experimental e, dessa forma, permite identificar com maior segurança, genótipos superiores (BRESSIANI, 2001; LANDELL & BRESSIANI, 2008; BARBOSA & SILVEIRA, 2010).

Várias características são objetivadas durante o processo de seleção, tais como: resistência ou tolerância a doenças, tolerância à seca, ausência de

florescimento e isoporização, capacidade de brotação sob palha e elevada produtividade de açúcar (LANDELL & BRESSIANI, 2008).

2.2 A ferrugem da cana-de-açúcar

2.2.1 História e importância econômica da doença

A ferrugem marrom é um problema fitossanitário de grande importância para o setor sucroalcooleiro, devido aos grandes prejuízos que ela pode gerar. Essa doença é causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, pertencente à divisão Basidiomycota, classe Teliomycetes, ordem Uredinales, família Puccinaceae (MATSUOKA & MACCHERONI, 2010).

O primeiro registro do patógeno *P. melanocephala* ocorreu na Índia, em 1907, afetando *Erianthus ravennae*. Após algumas décadas foi relatado o primeiro surto da doença em cana de açúcar na África do Sul, em 1941 (MATSUOKA & MACCHERONI, 2010). Na década de setenta ocorreram surtos no Japão, Taiwan e Austrália. A doença chegou às Américas, em 1978, na República Dominicana, e foi proliferando-se rapidamente, dominando quase todas as indústrias de cana-de-açúcar das Américas no período de um ano (CARDOSO & SANGUINO, 1988).

A ferrugem marrom foi registrada pela primeira vez no Brasil em 1986, no município de Capivari, São Paulo, e em um período curto disseminou-se por todo o país causando grandes preocupações aos produtores (SANGUINO & TOLEDO, 1983). Acredita-se que o fungo chegou ao Brasil através de correntes de ventos vindas do Continente Africano (MACCHERONI & MATSUOKA, 2006).

A doença não provocou grande epidemia ao chegar ao Brasil, pois 90% dos canaviais eram plantados com cultivares resistentes. Segundo MATSUOKA, (1993) a utilização de genótipos suscetíveis pode causar um efeito destrutivo gerando perdas de mais de 60%. Essas perdas podem ser significativas até mesmo com a utilização de cultivares com resistência intermediária. Além disso, a ferrugem causa perdas indiretas aos programas de melhoramentos, dado à eliminação de clones em fase de seleção, com boas características agrônomicas, mas que são suscetíveis à doença (COMSTOCK, 1994; TOKESHI & RAGO, 2005).

Em 1992, a doença alcançou o seu pico nos canaviais paulistas, com perdas potenciais de até 107 milhões de dólares devido ao plantio de um grande número de

cultivares com níveis de resistência não satisfatórios como a SP70-1143, SP71-6163, SP71-1406 E NA56-79 (MOURA, 1999).

A forma mais econômica de controlar a doença, é através da utilização de genótipos resistentes a ferrugem. Além disso, é importante que os canaviais tenham uma boa diversidade de cultivares, tendo no máximo 15% plantado com a mesma cultivar. Outro método de controle é através da utilização de fungicida, porém o custo é alto e requer alguns cuidados para o sucesso da aplicação e eficiência do controle (TOKESHI & RAGO, 2005). Atualmente o foco dos principais programas de melhoramento do Estado de São Paulo é caracterizar as cultivares quanto à reação para esta doença (CDA, 2010).

2.2.2 Etiologia e Sintomatologia

A ferrugem marrom tem como agente etiológico *P. melanocephala*, o qual produz dois tipos de esporos, os urediniósporos, esporos de reprodução assexual, e os teliosporos, esporos de reprodução sexual. Os urediniosporos possuem coloração marrom canela a marrom escuro, sem espessamento apical, ovóides, ornamentação equinulada, com quatro a cinco esporos germinativos equatoriais (MOURA, 2004, APARECIDO, 2009; GIGLIOTI et al., 2009).

Ambos os esporos produzidos por *P. melanocephala* podem germinar, mas a infecção ocorre somente através dos urediniósporos, que são transportados principalmente pelo vento, além de gotas de água, roupas e materiais vegetais contaminados (CARDOSO & SANGUINO, 1988). A germinação do fungo é favorecida em temperaturas entre 21°C e 26°C e umidade relativa do ar acima de 99%. Para otimizar a germinação dos esporos é necessária a presença de água na superfície da folha (GIGLIOTI et al., 2009).

A manifestação da doença é sazonal, com pico de ocorrência em estações úmidas com temperaturas mais amenas, nos meses de junho a agosto, e de novembro a janeiro. Sob altas temperaturas e/ou baixa umidade os esporos tornam-se inviáveis (SANGUINO & TOLEDO, 1983; GARCIA et al., 2007; GIGLIOTI et al., 2009).

Após a germinação o tubo germinativo (Figura 1) é diferenciado em haustórios, o qual é essencial para a penetração do patógeno nos tecidos da planta,

pelas aberturas estomáticas, e são responsáveis pela absorção de nutrientes. Entre 10 a 14 dias após a infecção de genótipos suscetíveis, é possível observar as pústulas nas folhas, as quais irão liberar esporos para o ambiente (SAGUINO & TOLEDO, 1983).

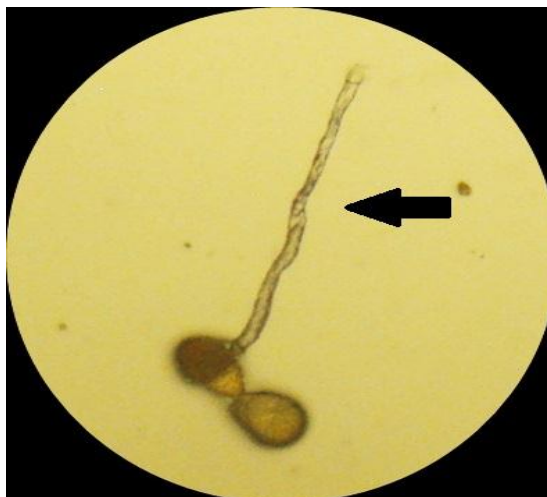


Figura 1: Urediniósporo de *Puccinia melanocephala* com tubo germinativo (seta), visualizado em microscópio óptico, objetiva de 100x. (Foto: Ana Caroline Neuber)

As plantas na primeira metade do ciclo vegetativo, de 2 a 8 meses, são mais suscetíveis ao ataque do patógeno, assim como em cana-planta, em relação canasoca. As pústulas se distribuem no terço médio posterior da folha (SAGUINO & TOLEDO, 1983).

A ferrugem marrom interfere na atividade fotossintética da planta, comprometendo seu desenvolvimento e produtividade, pois a mesma afeta o tecido foliar, prejudicando a fotossíntese da planta, diminuindo a área foliar verde. As folhas severamente infectadas secam prematuramente, resultando em colmos finos, ou até mesmo na morte de perfilhos, afetando plantas novas e reduzindo o acúmulo de sacarose (MOURA, 2004).

Os sintomas iniciais da planta infectada por *P. melanocephala*, são pequenas manchas cloróticas alongadas, denominadas “flecks”, que restringem basicamente às folhas, sendo mais frequente do meio para a parte apical (GIGLIOTI et al., 2009). Essas manchas evoluem rapidamente adquirindo coloração avermelhada. O fungo produz esporos que rompem a epiderme na superfície inferior da folha, formando

estruturas denominadas “pústulas”. As pústulas possuem tonalidade marrom a marrom escuras e são alongadas (CANAOESTE, 2013; SANGUINO, 1983)

Além do fungo *P. melanocephala*, que ataca plantas do gênero *Saccharum*, existe também o fungo *P. kuehnii*, conhecido como ferrugem alaranjada, o qual foi descrito no Brasil mais recentemente, em 2009. A ferrugem marrom e a ferrugem alaranjada são as principais ferrugens que podem atacar a cana-de-açúcar e que possuem importância econômica (BARBASSO, 2010).

A melhor maneira de se avaliar a doença é quantificando a porcentagem da área foliar sintomática, comparada à área foliar total (KLOSOWSKI et al., 2013).

A escala diagramática proposta por AMORIM et al., (1987) é a mais utilizada atualmente, a qual estipula 9 notas, onde 1 a 3 refere-se às plantas classificadas como resistentes, 4 a 6 intermediárias, e 7 a 9 suscetíveis plantas. A avaliação é feita utilizando a folha + 3 de cada planta.

SOOD et al., (2009) propuseram uma escala para classificar os dois tipos de ferrugem. As notas vão de 0 a 4, onde 0= sem sintomas, 1= manchas cloróticas, 2= lesões laranja ou marrom, 3= uma a cinco pústulas com esporulação e 4= cinco ou mais pústulas com esporulações que coalescem, causando necrose na área foliar. Genótipos que apresentam nota de 0-1, são classificados como resistentes, 2, considerados moderadamente resistentes, e 3-4, suscetíveis.

2.3 Aspectos genéticos da cana-de-açúcar e a resistência a ferrugem-marrom

O genoma da cana-de-açúcar é caracterizado por sua grande complexidade, mostrando alta poliploidia (octaploide), oriundo de cruzamento interespecífico entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, cujo genoma sofreu duplicações (D'HONT & GLASZMANN, 2001).

As cultivares de cana-de-açúcar cultivadas são complexos híbridos interespecíficos que possuem em torno de $2n=100-130$ cromossomos. Acredita-se que as cultivares comerciais suscetíveis à ferrugem-marrom possam ter herdado essa característica de clones de *S. officinarum*, visto que esta espécie contribui com 70% a 80% do genoma das cultivares comerciais (D'HONT et al., 1996; RAMDOYAL et al.; 2000; D'HONT, 2005). Estudos de hibridação *in situ* confirmaram que o genoma dos híbridos modernos é composto pela reunião dos genomas das espécies

S. officinarum e *S. spontaneum*. A estrutura do genoma da cultivar moderna R570, atualmente é muito utilizada como referência, conforme representado na Figura 2. (PIPERIDIS & D'HONT, 2001; D'HONT, 2005).

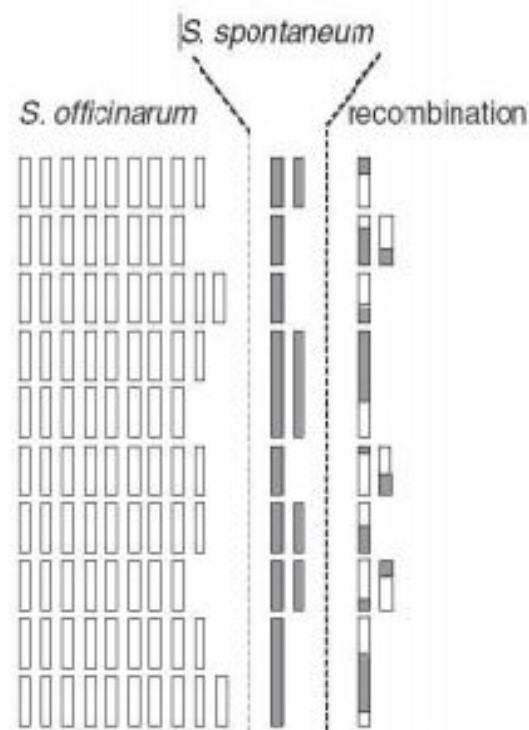


Figura 2: Representação do genoma da cultivar de cana-de-açúcar moderna R570, derivada da hibridação interespecífica entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Fonte: D'HONT et al.,(2008).

Diversos trabalhos foram realizados visando determinar o tipo de herança da resistência à ferrugem-marrom. Porém, tais resultados não foram muito conclusivos (MOURA, 2004).

TAI et al., (1981) sugeriram que a resistência a ferrugem marrom é parcialmente dominante. Além disso, o componente materno é maior em relação ao paterno devido a efeitos genéticos não aditivos e ao ambiente. Entretanto, HOGARTH et al., (1983), através de uma reanálise de dados, concluiu que 67% da variância genética é aditiva, e que a resistência a ferrugem marrom apresenta alta herdabilidade.

SORDI et al., (1988), destacaram a importância da escolha dos genitores, onde cruzamentos entre genitores resistentes dariam origem a progênie resistentes à doença, visto que essa é uma característica de alta herdabilidade e transmitida com eficácia.

DAUGROIS et al., (1996) e RAMDOYAL et al., (2000) utilizaram progênies de autofecundação da cultivar resistente a ferrugem marrom R570 e observaram uma segregação de 3:1 (resistência: suscetibilidade) indicando que exista um gene de efeito maior o qual confere resistência a ferrugem marrom.

ASNAGHI et al., (2001) inocularam a cultivar R570 com isolados de *P. melanocephala* provenientes do Brasil, Colômbia, Flórida, Guadalupe e Zimbábue, sendo verificado a existência de um único gene principal (“major gene”) responsável pela resistência a ferrugem marrom, sua indicação que este possui grande potencial de melhorar a resistência a ferrugem marrom em diversas regiões geográficas.

No programa de melhoramento de cana-de-açúcar da China (Yunnan Key of Sugarcane Genetic Improvement- YSRI) foram avaliados 62 clones provenientes do cruzamento entre *S. officinarum* L. cv. Ludashi (resistente à ferrugem) e *Erianthus rockii* Yunnan 95-19 (altamente resistente à ferrugem). A espécie *Erianthus rockii* é frequentemente utilizada na China em cruzamentos com *S. officinarum*, com o objetivo de aumentar a restrita base genética da cana-de-açúcar. Foi encontrada uma alta porcentagem (40,3%) de clones resistentes à ferrugem marrom. Este resultado é considerado promissor para incorporação de novos genes para resistência a ferrugem-marrom, porém é necessário realizar novos trabalhos com o objetivo de estudar a herdabilidade da resistência à ferrugem-marrom na China (WANG et al., 2013).

A durabilidade da resistência a ferrugem marrom é considerada finita devido à variabilidade do patógeno, bem como a habilidade de *P. melanocephala* se adaptar, superando a resistência da planta. Na Flórida, por exemplo, as cultivares CP 78-1247 (RAID et al., 1989), CL 73-239 e CP 74-2005 (SHINE et al., 2005), classificadas como resistentes, passaram a ser suscetíveis, caso semelhante aconteceu em Louisiana com a cultivar LCP 85-384, que ocupava 90% da área plantada (GLYNN et al., 2013). Esse fenômeno pode ser explicado pelo ciclo de “boom-and-bust” proposto por PRIESTLY (1978), que ocorre quando uma determinada cultivar resistente é largamente utilizada em campo, criando uma pressão de seleção pelo patógeno levando ao aparecimento de uma nova raça do fungo e que, por consequência quebra a resistência da cultivar.

2.3.1 O uso de marcadores moleculares no melhoramento de cana-de-açúcar

No melhoramento genético de cana-de-açúcar, para obter ganhos genéticos eficientes, é extremamente importante que se tenha um conhecimento detalhado da constituição genética da planta. A introdução de técnicas de genética molecular na década de 80, bem como o seu progresso ao longo dos anos, têm possibilitado ao desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (BERED et al., 1997).

É sabido que o desenvolvimento de uma nova cultivar comercial é um processo que exige tempo. A união entre as práticas convencionais atrelada com as técnicas de marcadores moleculares é uma alternativa para acelerar os progressos genéticos (BORÉM & MIRANDA, 2005).

Os marcadores moleculares são sequencias de DNA, utilizados para identificar alelos cuja expressão seja de difícil identificação, bem como revelar polimorfismo entre indivíduos. Para que a utilização de marcadores seja eficiente, é necessário que o mesmo seja herdável ($h \approx 1,0$), de fácil avaliação, ou seja, que o genótipo possa ser facilmente identificado através do seu fenótipo e, por fim, é necessário que o marcador esteja intimamente ligado ao alelo de interesse (RAMALHO et al., 2008).

As aplicações dos marcadores moleculares nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar são inúmeras, como por exemplo: 1) selecionar genitores com capacidade específica e geral de recombinação, a fim de explorar a heterose, direcionando os cruzamentos para o desenvolvimento de populações superiores; 2) identificar genes de interesse agrônômico, direcionando a seleção de indivíduos com base no seu genótipo, 3) estudo de divergência genética, utilizados para identificação de cultivares e teste de paternidade (BERED et al., 1997; CRESTE et al., 2008; RAMALHO et al., 2008).

2.3.2 Marcadores moleculares associados à resistência a ferrugem-marrom

Até o presente momento, foram identificados dois genes “maiores” que conferem resistência à ferrugem marrom, sendo: Bru1 (DAUGROIS et al., 1996; ASNAGHI et al., 2001) identificado em progênies de autofecundação da cultivar moderna R570, e Bru2 localizado a partir da construção de um mapa genético obtido através do cruzamento bi-parental entre a cultivar moderna R570, e um antigo clone australiano, MQ76-53. Esse gene Bru2 é responsável por controlar a esporulação do fungo na folha (RABOIN et al., 2006).

COSTET et al. (2012) analisaram 380 cultivares e acessos utilizados por 30 diferentes programas de melhoramento ao redor do mundo, utilizando-se 22 marcadores ligados ao gene Bru1: 12 RFLPs, 6 AFLPs, 2 PCRs e 1 CAPS desenvolvidos em trabalhos anteriores (ASNAGHI et al., 2001; HOARAU et al., 2001, LE CUNFF et al., 2008; GARSMEUR et al., 2011). Foram encontrados dois marcadores, R12H16-PCR e 9020-F4-RsaI, que estão ligados ao gene Bru1 no mapa genético da cultivar R570, e mostraram-se fortemente associados a resistência a ferrugem-marrom, visto que os marcadores foram totalmente ausentes em acessos suscetíveis.

GLYNN et al., (2013) utilizaram os marcadores que flanqueiam o gene Bru1 para determinar a frequência do mesmo em clones empregados em cruzamentos pelo programa de melhoramento genético da Flórida, Canal Point (CP). Os marcadores foram positivos em 285 dos 1.072 clones (27%), os quais representam a base genética das cultivares desenvolvidas na Flórida. Dos clones classificados como resistentes a ferrugem marrom, 59% possuem o gene Bru1, enquanto que nenhum dos clones classificados como suscetíveis contem o gene. Além disso, foram genotipados 603 clones, os quais foram separados de acordo com a década de seu lançamento. Neste estudo foi observado o crescimento da frequência do Bru1 ao longo dos anos, que coincide com a introdução da ferrugem-marrom na Flórida (1979). Os resultados apresentados mostram que o gene Bru1 é a principal fonte de resistência à ferrugem-marrom na Flórida.

Em Tucumán, Argentina, a frequência do gene Bru1 foi baixa. Dos 129 genótipos avaliados, 49 foram classificados como resistentes, e apenas 8 (16,3%) possuem o gene. A baixa frequência do gene indica que provavelmente existe outra fonte de resistência à ferrugem-marrom no banco de germoplasma de Tucumán, a

qual pode ser importante para ampliar a estreita base genética da resistência à ferrugem-marrom (RACEDO et al., 2013).

PARCO et al., (2014) determinaram a frequência do gene Bru1 em 506 clones, dentre os materiais estão inclusos: cultivares, clones elites, clones de primeira geração e acessos de germoplasma exótico/selvagem utilizados pelo programa de melhoramento de Louisiana-USA. A maior frequência do gene Bru1 (28,7%) foi observada no grupo de acessos de germoplasma. Em cultivares e clones elites apenas 4,3% dos genótipos possuem o gene. Além disso, alguns genótipos apresentaram variação no tamanho das bandas geradas através dos produtos de amplificação dos primers R12H16 e 9020-F4, sugerindo uma possível variação alélica em torno do gene Bru1.

3 Material e Métodos

3.1 Cultivares, clones e acessos exóticos de cana-de-açúcar

Um total de 386 genótipos de cana-de-açúcar pertencente a cultivares comerciais, clones elites, acessos exóticos e acessos de natureza híbrida, classificados como *Saccharum hybrid* foram investigados quanto à presença do gene Bru1. Do grupo formado pelas cultivares e clones, 51 foram provenientes do Centro de Tecnologia Canavieira (siglas CTC e SP), 30 da Ridesa (sigla RB), 21 do Instituto Agrônomo de Campinas (sigla IAC) e 15 clones elites também do Programa Cana-IAC (Tabela 1).

Para os acessos exóticos foram avaliados 269 acessos classificados conforme a respectiva espécie em: *S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense*, além de acessos de gênero *Erianthus* (*Erianthus arundinaceum*) e os de natureza híbrida (*S. hybrid*) (Tabela 2).

Tabela 1. Cultivares de cana-de-açúcar avaliadas quanto a presença do gene Bru1.

Cultivares de cana-de-açúcar					
CTC1	CTC22	SP85-3877	RB855035	RB965917	IACSP95-5094
CTC2	CTC23	SP86-155	RB855113	IAC82-3092	IACSP95-5000
CTC3	CTC24	SP86-42	RB855463	IAC82-2045	*IACSP96-3076
CTC4	CTC25	SP87-344	RB855511	IAC86-2210	IACSP96-2042
CTC5	CTC9002	SP87-365	RB855036	IAC86-2480	IACSP96-3060
CTC6	CTC9003	SP87-396	RB855546	IAC87-3396	IACSP97-4039
CTC7	SP77-5181	SP89-1115	RB855563	IAC91-1099	*IACSP97-6615
CTC8	SP80-185	SP90-1638	RB855536	*IACSP91-4168	*IACSP97-3331
CTC9	SP80-1520	SP90-3414	RB867515	IAC91-5155	*IACSP97-6610
CTC10	SP80-1816	SP91-1049	RB865230	IAC91-2218	*IACSP98-2072
CTC11	SP80-1836	SP81-3250	RB925268	IAC91-2195	*IACSP98-3099
CTC12	SP80-1842	RB813804	RB925211	IACSP93-2060	*IACSP98-5010
CTC13	SP80-3480	RB825336	RB925345	IACSP93-6006	*IACSP99-3009
CTC14	SP81-1763	RB835054	RB92579	IACSP93-3046	*IACSP99-3013

Tabela 1: Continuação

Cultivares de cana-de-açúcar					
CTC15	SP83-5073	RB845257	RB928064	IACSP94-2094	*IACSP99-3039
CTC17	SP84-1431	RB842021	RB931530	IACSP94-4004	*IACSP99-3090
CTC18	SP84-2025	RB845197	RB935744	IACSP94-2101	*IACSP04-065
CTC19	SP84-5560	RB845210	RB931011	*IACSP95-3018	
CTC20	SP85-5077	RB855156	RB93509	*IACSP95-6114	
CTC21	SP854-1201	RB855453	RB966928	IACSP95-3028	

*clones elites do programa IAC.

Tabela 2. Acessos de cana-de-açúcar utilizados nesse estudo e suas respectivas espécies

Genótipo	Espécie	Genótipo	Espécie
BADILA	<i>S. officinarum</i>	IJ76-361	<i>S. officinarum</i>
BADILA AJAX	<i>S. officinarum</i>	IJ76-418 Red	<i>S. officinarum</i>
BADILA DE JAVA	<i>S. officinarum</i>	IJ76-442	<i>S. officinarum</i>
BLACK BORNEO	<i>S. officinarum</i>	IJ76-470	<i>S. officinarum</i>
BOURBON SUR	<i>S. officinarum</i>	IJ76-480	<i>S. officinarum</i>
BRAVA DE PERICO	<i>S. officinarum</i>	IJ76560	<i>S. officinarum</i>
CAIANA FITA	<i>S. officinarum</i>	IJ76566	<i>S. officinarum</i>
CAIANA LISTRADA	<i>S. officinarum</i>	IN 84 126	<i>S. officinarum</i>
CAIANA MANTEIGA	<i>S. officinarum</i>	IN 84105	<i>S. officinarum</i>
CAIANA RISCADA	<i>S. officinarum</i>	IS 76- 155	<i>S. officinarum</i>
CAIANA ROXA	<i>S. officinarum</i>	IS 76-116	<i>S. officinarum</i>
CAIANA VERDADEIRA	<i>S. officinarum</i>	KHAJURIA	<i>S. officinarum</i>
CANA ALHO	<i>S. officinarum</i>	L. STRIPES	<i>S. officinarum</i>
CANA BLANCA	<i>S. officinarum</i>	LAM 76- 427	<i>S. officinarum</i>
CAYANA	<i>S. officinarum</i>	MUNTOK JAVA	<i>S. officinarum</i>
CB 47 355	<i>S. officinarum</i>	MZ 151	<i>S. officinarum</i>
CERAM RED	<i>S. officinarum</i>	NB 2121	<i>S. officinarum</i>
CINCA 77-318	<i>S. officinarum</i>	NG 57- 221	<i>S. officinarum</i>
CREOULA	<i>S. officinarum</i>	NG 57-213	<i>S. officinarum</i>
CRIOLA RAIADA	<i>S. officinarum</i>	NG 77-18	<i>S. officinarum</i>
FIJI 19	<i>S. officinarum</i>	NG 77-92	<i>S. officinarum</i>
FIJI 62	<i>S. officinarum</i>	NG271124	<i>S. officinarum</i>
FLOR DE CUBA	<i>S. officinarum</i>	PANAMA	<i>S. officinarum</i>
GREEN GERMAN	<i>S. officinarum</i>	PITU	<i>S. officinarum</i>
IJ 6325	<i>S. officinarum</i>	RP8	<i>S. officinarum</i>
IJ 76-313	<i>S. officinarum</i>	S. MANILA	<i>S. officinarum</i>
IJ 76317	<i>S. officinarum</i>	S. OFF. 8272	<i>S. officinarum</i>
IJ 76-478	<i>S. officinarum</i>	SABURA	<i>S. officinarum</i>
IJ76-315	<i>S. officinarum</i>	SAC. OFF.	<i>S. officinarum</i>
IJ76-319	<i>S. officinarum</i>	SAC. OFF. 8284	<i>S. officinarum</i>

Tabela 2: Continuação

Genótipo	Espécie	Genótipo	Espécie
TAINAN 2N=96	<i>S. officinarum</i>	IN84-042-37	<i>S. spontaneum</i>
WHITE TRANSPARENT	<i>S. officinarum</i>	IN84-088	<i>S. spontaneum</i>
ZOPILOTA	<i>S. officinarum</i>	IN84-091-8	<i>S. spontaneum</i>
B68-264	<i>S. spontaneum</i>	IN8488	<i>S. spontaneum</i>
B68-269	<i>S. spontaneum</i>	IND 81-101	<i>S. spontaneum</i>
B73-348 (14/20)	<i>S. spontaneum</i>	IND 81-170	<i>S. spontaneum</i>
BROWN-33	<i>S. spontaneum</i>	IND81-09	<i>S. spontaneum</i>
CANE6044-17	<i>S. spontaneum</i>	IND81-38-19	<i>S. spontaneum</i>
CANE6044-18	<i>S. spontaneum</i>	IND81-82-35	<i>S. spontaneum</i>
COIMBATORE	<i>S. spontaneum</i>	IND82-257	<i>S. spontaneum</i>
DACCA	<i>S. spontaneum</i>	IND82-318-4	<i>S. spontaneum</i>
DJANTOER II	<i>S. spontaneum</i>	IS 76-125	<i>S. spontaneum</i>
FORMOSA	<i>S. spontaneum</i>	IS 76-173	<i>S. spontaneum</i>
FORMOSA 4-29	<i>S. spontaneum</i>	IS 76-186	<i>S. spontaneum</i>
FORMOSA NO 4	<i>S. spontaneum</i>	IS 76-192	<i>S. spontaneum</i>
GEHRA-BOM	<i>S. spontaneum</i>	IS 76-196	<i>S. spontaneum</i>
GLAGAH KLOET	<i>S. spontaneum</i>	IS76-171-5	<i>S. spontaneum</i>
GUGU	<i>S. spontaneum</i>	IS76-177	<i>S. spontaneum</i>
HOLE 1	<i>S. spontaneum</i>	IS76-201	<i>S. spontaneum</i>
IJ385 (22/8)	<i>S. spontaneum</i>	ISIOLO	<i>S. spontaneum</i>
IJ76-111	<i>S. spontaneum</i>	KAWANDA	<i>S. spontaneum</i>
IJ76-386	<i>S. spontaneum</i>	KLOET	<i>S. spontaneum</i>
IK 76-006	<i>S. spontaneum</i>	KRAKATAU	<i>S. spontaneum</i>
IK 76-049	<i>S. spontaneum</i>	LONGCHUAN (YUNAN)	<i>S. spontaneum</i>
IK 76-067	<i>S. spontaneum</i>	M. MOENTAI	<i>S. spontaneum</i>
IK76-66	<i>S. spontaneum</i>	MOL4503	<i>S. spontaneum</i>
IM 76-234	<i>S. spontaneum</i>	NG 77-176	<i>S. spontaneum</i>
IN 76-086	<i>S. spontaneum</i>	NG21-035 (3/22)	<i>S. spontaneum</i>
IN 84-009	<i>S. spontaneum</i>	PAL 84-01	<i>S. spontaneum</i>
IN 84-011	<i>S. spontaneum</i>	PBG84-12-16	<i>S. spontaneum</i>
IN 84-021	<i>S. spontaneum</i>	PBG84-5-23	<i>S. spontaneum</i>
IN 84-022	<i>S. spontaneum</i>	PBG84-5-25	<i>S. spontaneum</i>
IN 84-089	<i>S. spontaneum</i>	PCA SUR 84-13	<i>S. spontaneum</i>
IN 8482	<i>S. spontaneum</i>	PCANOR84-02	<i>S. spontaneum</i>
IN 8485	<i>S. spontaneum</i>	PCA-NOR84-1-27	<i>S. spontaneum</i>
IN81-014	<i>S. spontaneum</i>	PCANOR84-3-6	<i>S. spontaneum</i>
IN84-016-34	<i>S. spontaneum</i>	PCASUR 84-01	<i>S. spontaneum</i>
IN84-022-7	<i>S. spontaneum</i>	PCASUR 84-03	<i>S. spontaneum</i>
IN84-033-36	<i>S. spontaneum</i>	PCASUR 84-13	<i>S. spontaneum</i>
IN84-042-21	<i>S. spontaneum</i>	PCASUR 84-08	<i>S. spontaneum</i>

Tabela 2: Continuação

Genótipo	Espécie	Genótipo	Espécie
PCAV 84-13	<i>S. spontaneum</i>	SES 260	<i>S. spontaneum</i>
PCAV 84-20	<i>S. spontaneum</i>	SES 264-20	<i>S. spontaneum</i>
PCAV84-18-11	<i>S. spontaneum</i>	SES 277-10	<i>S. spontaneum</i>
PCAV84-18-12	<i>S. spontaneum</i>	SES 277-3	<i>S. spontaneum</i>
PCAV84-6-30	<i>S. spontaneum</i>	SES 288	<i>S. spontaneum</i>
PCAV84-6-9	<i>S. spontaneum</i>	SES 295	<i>S. spontaneum</i>
Philippine Wild	<i>S. spontaneum</i>	SES 297 A	<i>S. spontaneum</i>
PIN	<i>S. spontaneum</i>	SES 308 ^a	<i>S. spontaneum</i>
PIN 84-001	<i>S. spontaneum</i>	SES 323	<i>S. spontaneum</i>
PONAPE WILD		SES 35-377	
SLENDER	<i>S. spontaneum</i>		<i>S. spontaneum</i>
PPGN 84-08	<i>S. spontaneum</i>	SES 35-379	<i>S. spontaneum</i>
PPGN84-2-26	<i>S. spontaneum</i>	SES 365	<i>S. spontaneum</i>
PPGN84-8-13	<i>S. spontaneum</i>	SES 367	<i>S. spontaneum</i>
PPGN84-8-14	<i>S. spontaneum</i>	SES 519	<i>S. spontaneum</i>
PQ 84-09	<i>S. spontaneum</i>	SES 602	<i>S. spontaneum</i>
PQ84-04	<i>S. spontaneum</i>	SES073-38	<i>S. spontaneum</i>
P-SOR 84-13	<i>S. spontaneum</i>	SES205 A	<i>S. spontaneum</i>
PURPLE-32	<i>S. spontaneum</i>	SES84-58-24	<i>S. spontaneum</i>
S 66-084	<i>S. spontaneum</i>	SH 301	<i>S. spontaneum</i>
S 66-097	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-32	<i>S. spontaneum</i>
S 66-105	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-62	<i>S. spontaneum</i>
S SPONT#15	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-77	<i>S. spontaneum</i>
S SPONT#37	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-82	<i>S. spontaneum</i>
S. SPONT #28	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-85	<i>S. spontaneum</i>
SES 033	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-94	<i>SS. Spontaneum</i>
SES 073-22	<i>S. spontaneum</i>	SLC 92-98	<i>S. spontaneum</i>
SES 084/58	<i>S. spontaneum</i>	SM 7916	<i>S. spontaneum</i>
SES 088C	<i>S. spontaneum</i>	SM8116	<i>S. spontaneum</i>
SES 090	<i>S. spontaneum</i>	SPONTANEUM (45/93)	<i>S. spontaneum</i>
SES 092	<i>S. spontaneum</i>	TAIWAN 11-40	<i>S. spontaneum</i>
SES 103	<i>S. spontaneum</i>	TAIWAN SPONT 072	<i>S. spontaneum</i>
SES 113 A	<i>S. spontaneum</i>	THA 83-171	<i>S. spontaneum</i>
SES 184 A	<i>S. spontaneum</i>	THA82-060	<i>S. spontaneum</i>
SES 184 B	<i>S. spontaneum</i>	TONGZA	<i>S. spontaneum</i>
SES 196	<i>S. spontaneum</i>	UM69-015	<i>S. spontaneum</i>
SES 197 A	<i>S. spontaneum</i>	UNK 39-71	<i>S. spontaneum</i>
SES 208	<i>S. spontaneum</i>	UNK45-111	<i>S. spontaneum</i>
SES 208-1	<i>S. spontaneum</i>	US 4633	<i>S. spontaneum</i>
SES 234	<i>S. spontaneum</i>	US 56-016-01	<i>S. spontaneum</i>
SES 234-2	<i>S. spontaneum</i>	US 78-518	<i>S. spontaneum</i>

Tabela 2: Continuação

Genótipo	Espécie	Genótipo	Espécie
US 78-519	<i>S. spontaneum</i>	US-851008	<i>S. hibryd</i>
US 78-523	<i>S. spontaneum</i>	YASAWA	<i>S. hybrid</i>
US46-25-15	<i>S. spontaneum</i>	ZEUS	<i>S. hybrid</i>
US4633	<i>S. spontaneum</i>	75//09	<i>Erianthus arundinaceum</i>
US71-0017	<i>S. spontaneum</i>	FIJI10	<i>Erianthus arundinaceum</i>
US72-1319	<i>S. spontaneum</i>	IJ 76-358	<i>Erianthus arundinaceum</i>
US76-121-28	<i>S. spontaneum</i>	IJ 76-358	<i>Erianthus arundinaceum</i>
US78-519-39	<i>S. spontaneum</i>	IJ 76-389	<i>Erianthus arundinaceum</i>
YACHENG #12	<i>S.spontaneum</i>	IJ 76-410	<i>Erianthus arundinaceum</i>
AJAX	<i>S. hybrid</i>	IJ76359	<i>Erianthus arundinaceum</i>
D 152	<i>S. hybrid</i>	IJ76-364	<i>Erianthus arundinaceum</i>
DEMOS	<i>S. hybrid</i>	IJ76-381	<i>Erianthus arundinaceum</i>
ENDOR	<i>S. hybrid</i>	57NG2	<i>S. robustum</i>
FIJI 59	<i>S. hybrid</i>	IJ 76293	<i>S. robustum</i>
FIJI15	<i>S. hybrid</i>	IM76229	<i>S. robustum</i>
Hj5741	<i>S. hybrid</i>	IM76-232	<i>S. robustum</i>
HQ 469	<i>S. hybrid</i>	MUNDAU	<i>S. robustum</i>
IA 3135	<i>S. hybrid</i>	US 57 14105	<i>S. robustum</i>
MALI	<i>S. hybrid</i>	CHIN	<i>S. barberi</i>
MANA II	<i>S. hybrid</i>	CHUNNEE	<i>S. barberi</i>
NG 5750	<i>S. hybrid</i>	GANDA CHENI	<i>S. barberi</i>
P 57-150-4	<i>S. hybrid</i>	MATNA SHAHJ	<i>S. barberi</i>
RAGNAR	<i>S. hybrid</i>	MANEIRA	<i>S. sinensi</i>
SM 81-36	<i>S. hybrid</i>	UBA DEL NATAL	<i>S. sinense</i>
US 74-069	<i>S. hybrid</i>		

3.2 Extração, quantificação e integridade do DNA

A extração do DNA foi feita de acordo com o protocolo de Al-JANABI et al., (1999) a partir de tecido foliar.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop ND- 2000c (Thermo Scientific) e 1 µL de cada amostra. A relação entre as absorvâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas, e as absorvâncias 230/260 nm para verificar possível contaminação por sais ou compostos fenólicos. Foram considerados de boa qualidade os DNAs cuja relação 230/260 nm e 260/280 nm estivessem entre 1,8 e 2,0. Além disso, para comprovar a integridade do DNA, o mesmo foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.3 Amplificação com os pares de primers R12H16 e 9020-F4

Para a obtenção dos fragmentos específicos (marcadores) de 570 pares de bases (pb) e de 200 pb indicadores da presença do gene *Bru1*, foram utilizados respectivamente os pares de primers R12H16 Fw: CTACGATGAACTACACCCTTGTC e Rv: CTTATGTTAGCGTGACCTATGGTC e 9020-F4 Fw: TACATAATTTTAGTGCGCACTCAGC e Rv: ACCATAATTCAATTCTGCAGGTAC descritos por COSTET et al. (2012).

O protocolo para a reação de PCR foi o mesmo descrito por COSTET et al., (2012), com algumas modificações efetuadas na concentração de $MgCl_2$ e dos primers forward (Fw) e reverse (Rv). Desta forma, as reações de amplificação utilizando o par de primer R12H16 e 9020-F4 foram conduzidas em um volume final de 25 μ L e 50 μ L respectivamente, contendo 50 ng de DNA genômico, buffer 10x, 2,5 mM de dNTPs, 0,4 mM de $MgCl_2$, 0,4 μ M do primer forward e 0,4 μ M do primer reverse, 0,5 u de DNA polimerase.

Para o par de primer 9020-F4, após a PCR foi feita a digestão do produto amplificado utilizando 15 μ L do mesmo, 5 U/ μ L da enzima *RsaI*, Buffer 1x, 50 nM acetato de potássio, 20 nM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnésio e 100 μ L/mL BSA, pH 7.9, completando-se com água até o volume de 25 μ L. Os produtos da reação foram incubados em termociclador a 37° C por 2 horas para a produção de um fragmento específico de 200 pb.

O programa de amplificação foi o mesmo para os dois primers de acordo com a ciclagem a seguir: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos, cada ciclo a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 55°C por 45 segundos, e extensão de 72°C por 72 segundos, seguida de um passo de extensão final a 72°C por 8 minutos em termociclador My thermocycler (BioRad).

3.4 Visualização dos fragmentos de 570pb e 200pb

Aos produtos da amplificação pelo par de primers R12H16 e da digestão do produto da amplificação gerado pelo par de primer 9020-F4 foram adicionados cerca de 5 μ L de azul de bromofenol. Os produtos destas reações foram submetidos separadamente a eletroforese em gel de agarose a 2%, para o par de primer R12H16, e a 3%, para o par de primers 9020-F4 *RsaI*, corado com brometo de

etídeo e utilizando como marcador de peso molecular o *ladder* de 50pb. Os marcadores foram visualizados em transluminador UV (Apha Inooteck).

A cultivar R570 foi utilizada em todas as reações de amplificação como padrão positivo, visto que, a mesma possui o gene Bru1, como descrito em literatura. (DAUGROIS et al., 1996; ASNAGHI et al., 2001; COSTET et. al., 2012).

3.5 Agrupamento de cultivares e clones IAC quanto à suscetibilidade a *Puccinia melanocephala*

A associação da presença do gene Bru1 com a resistência à ferrugem-marrom foi feita com base em informações bibliográficas (DOS SANTOS 2008; CATÁLOGO NACIONAL DE CULTIVARES RB DE CANA-DE-AÇÚCAR 2010) a respeito da resistência/suscetibilidade à doença das cultivares em estudo.

Entre as cultivares e clones IAC genotipados, foi possível obter informação fenotípica de 94, as mesmas foram classificadas como resistente ou suscetível.

3.6 Inoculação artificial em casa de vegetação

Foram selecionados 15 acessos exóticos de cana-de-açúcar para serem avaliados quanto à severidade de sintomas à ferrugem marrom, por meio de inoculação artificial com *P. melanocephala* em casa de vegetação. Para tanto, foi instalado um ensaio adotando-se delineamento inteiramente casualizado com dez repetições.

Esses acessos foram selecionados com base na presença ou ausência dos marcadores, sendo três acessos positivos para ambos marcadores do gene Bru1 (IA 3135, UBA DEL NATAL e US 56-016-01), seis positivos apenas para o marcador 9020-F4-RsaI (IM76-232, M. MOENTAI, SH 301, SES 297 A, IN84-009, IK 76-049) e seis negativos para a presença de ambos marcadores do gene Bru1 (SES 196, SES 367, SES 308 A, SES 295, SES 208 e PCASUR84-13). Além disso, foram utilizadas duas cultivares como controle de resistência e suscetibilidade, IACSP955000 e IAC86-2480 respectivamente.

A inoculação foi conduzida com urediniósporos de *P. melanocephala* previamente coletados a campo, de folhas com sintomas de ferrugem, coletados por sucção mediante uma bomba a vácuo. Posteriormente, os esporos depositados em

tubos coletores, foram armazenados em freezer -80°C até o momento da inoculação. Um dia anterior à inoculação, amostras de urediniósporos foram colocados em meio ágar-água para avaliação da viabilidade e porcentagem de germinação. No dia da inoculação, os esporos foram submetidos a choque térmico (a 42°C por 2,5 minutos) em estufa. Em seguida, foi preparada uma suspensão de urediniósporo com água destilada contendo 0,1% (vol/vol) de Tween 20 e 0,002% (vol/vol) de 1-nonanol 98%, sendo a concentração ajustada para 10^4 esporos/mL com auxílio de hemacitômetro (câmara de Neubauer). Plantas em torno de dois a três meses de idade foram inoculadas em ambas as superfícies das folhas (abaxial e adaxial) por aspersão utilizando “air brush”.

Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 horas em câmara úmida, 80-90% de umidade, no escuro e com temperatura entre 20°C e 27°C (Figura 3). Para assegurar a infecção pelo patógeno foram realizadas duas inoculações, sendo a primeira em 12 /02 /2015, e a segunda 14 dias após a primeira.

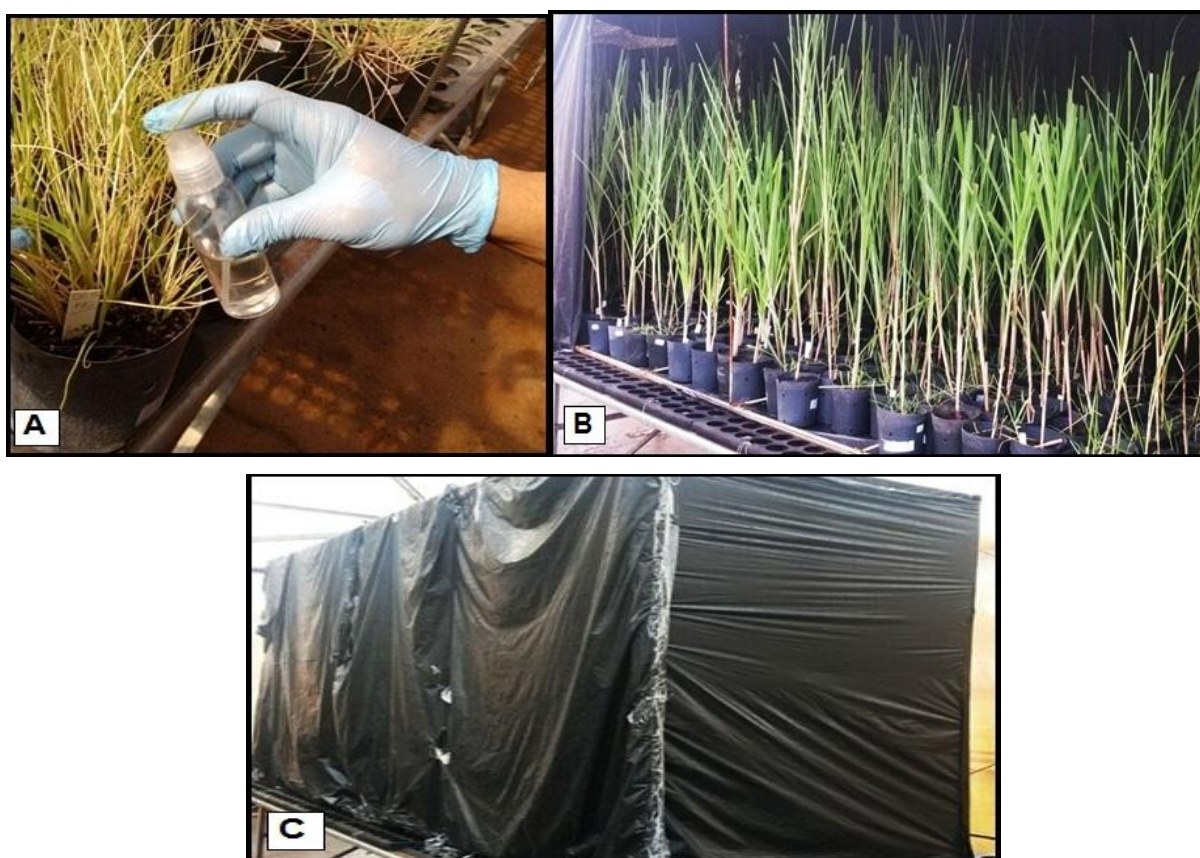


Figura 3. Vista parcial das etapas de inoculação de plantas de cana-de-açúcar, com 2 a 3 meses de idade, via “air brush”. A) Inoculação de suspensão de urediniósporos, (B) Plantas inoculadas (C): Plantas inoculadas e mantidas em casa de vegetação em 80-90%UR, 21 a 27°C , no escuro. (Fotos: Ana Caroline Neuber)

3.7 Avaliação da severidade

As avaliações foram iniciadas a partir do 14^o dia após a primeira inoculação, em 26/02/15, 06/03/15 e 13/03/15, em intervalo semanal, por três avaliadores, utilizando a escala diagramática proposta por AMORIM et al., (1987). Nesta escala, as notas variam de um a três (resistente), de quatro a seis (intermediária) e de sete a nove (suscetível), atribuídas de acordo com a porcentagem de lesões na planta toda.

3.8 Análise de dados

3.8.1 Análise de variância e correlação entre marcadores e notas de severidade a ferrugem marrom dos acessos exóticos de cana-de-açúcar

Os dados de severidade, referentes às três avaliações, foram transformados para $(x+0,1)^{-1/2}$ e utilizados para a análise de variância, adotando-se o procedimento *Proc GLM* e teste t, LSD Test; $P < 0,05$, para comparações de médias, utilizando o programa SAS (SAS, 2008). Foram também obtidas as correlações de Pearson (r) entre as notas médias obtidas de ferrugem e cada um dos marcadores (Bru1-PCR1 ou Bru1-PCR2).

3.8.2 Análise de agrupamento

Para verificar as relações entre os acessos exóticos de cana-de-açúcar quanto à resposta a resistência ou suscetibilidade à ferrugem marrom foi realizada uma análise de agrupamento adotando como variáveis as notas de severidade das três avaliações. A matriz de distância euclidiana entre os acessos foi utilizada para a construção de um dendrograma, segundo o método de agrupamento da média aritmética não ponderada (*UPGMA-Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) pelo programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

4 Resultados

4.1 Frequência do gene Bru1 nas cultivares brasileiras e clones IAC

A presença do gene Bru1 foi verificada em 77 (73%) cultivares e 12 (92%) clones dentre os genótipos de cana-de-açúcar avaliados. Isto representa 75% (88) de frequência do gene Bru1 entre os 117 genótipos avaliados (Figura 4). Nas 36 cultivares e clones do programa de melhoramento IAC, 61% apresentaram os marcadores indicativos da presença do gene Bru1. Nas cultivares pertencentes à RIDESA, 77% foram classificadas como positivas para a presença do gene. Da mesma forma, a frequência do gene Bru1 foi alta, entre as cultivares do programa de melhoramento do CTC/SP, presente em 73%.

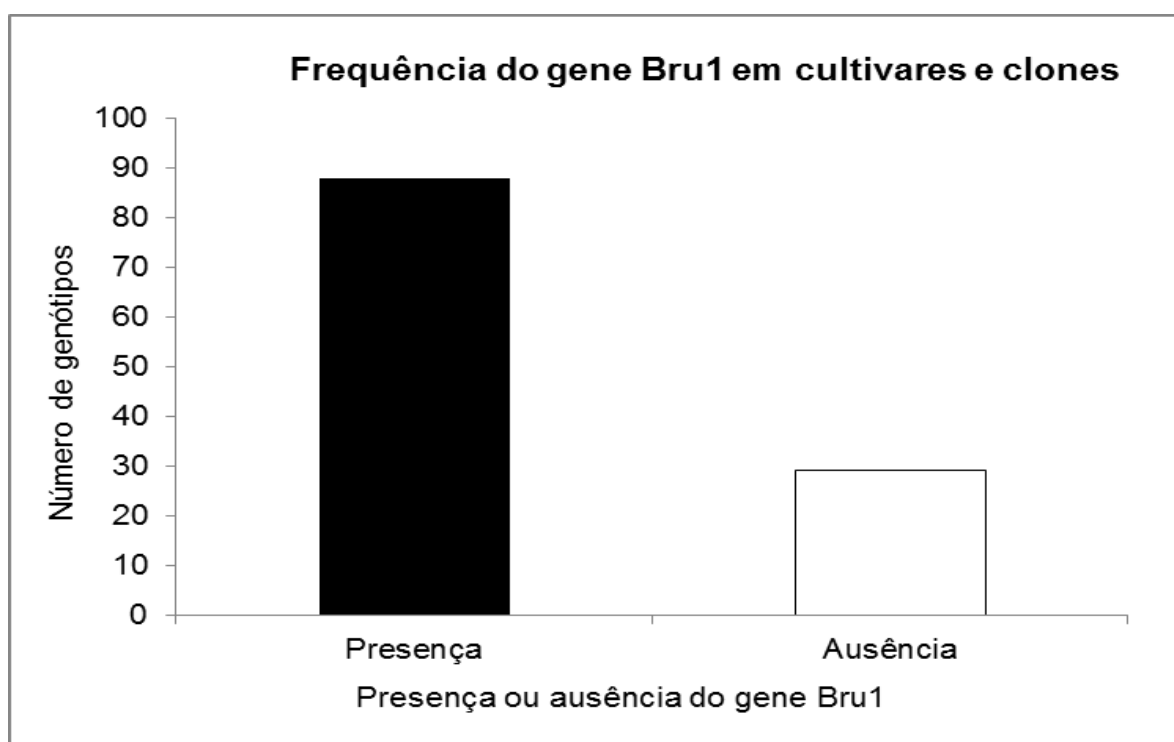


Figura 4. Frequência do gene Bru1 em cultivares e clones de cana-de-açúcar submetidos à genotipagem com marcadores moleculares que flanqueiam o gene Bru1.

4.2 Frequência do gene Bru1 em acessos exóticos de cana-de-açúcar

A frequência do gene Bru1 foi muito baixa entre os acessos, totalizando apenas 18% de genótipos identificados como positivo para o Bru1. Oito acessos representados por: „IN 84-009“, „SES297A“, „SH301“, IM76-232“, „IJ76293“, „IM76229“,

„M. MOENTAI“ e „IK 76-049“, não apresentaram ambos os marcadores, gerados respectivamente pelos pares de primers R12H16, marcador de 570pb, e 9024-F4, marcador de 200 pb. Estes foram negativos para o marcador 9024-F4 e positivos para o marcador R12H16, após digestão do produto da PCR com a enzima *RsaI* (Figura 5). Para esses acessos, a reação de PCR com ambos os pares de primers de diagnóstico do gene *Bru1* foi repetida três vezes para comprovar a sua efetiva ausência.

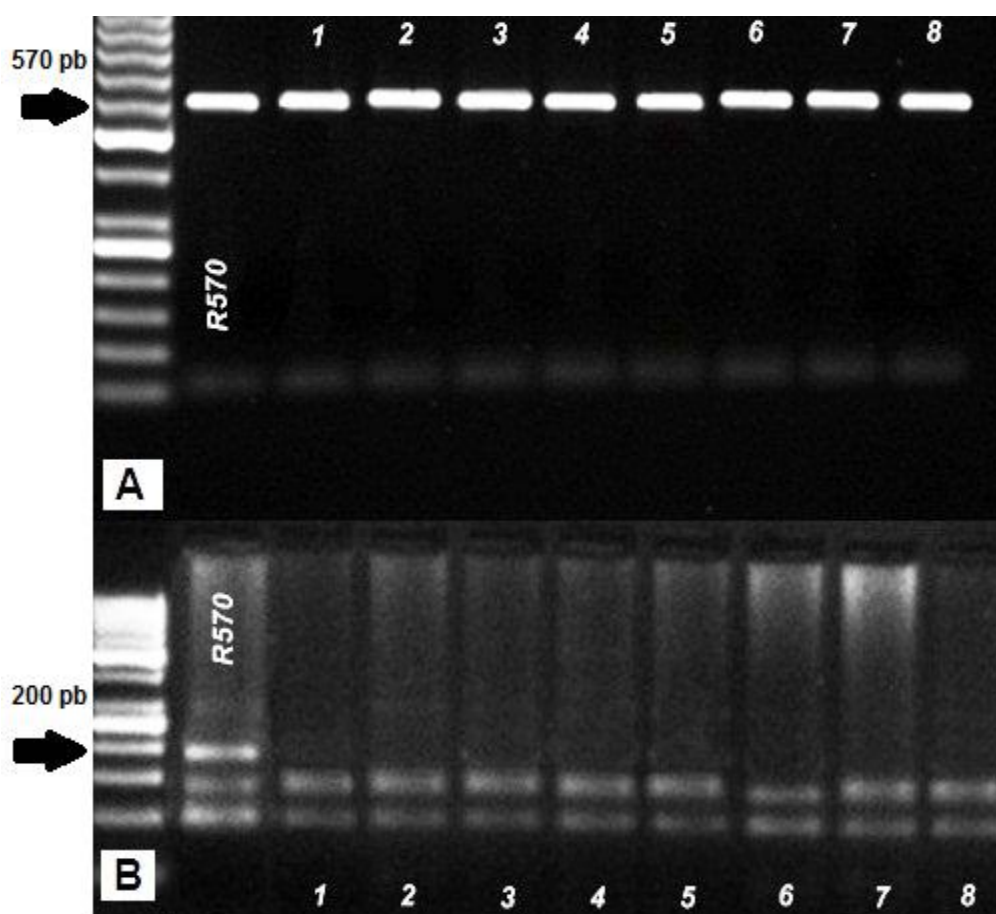


Figura 5. Gel de agarose 2 e 3%, mostrando respectivamente a amplificação do produto de PCR utilizando os pares de “primers” R12H16 (A), e ausência de amplificação utilizando os pares de “primers” 9020-F4 após digestão com enzima *RsaI*.

Analisando a frequência do gene *Bru1* em cada grupo, foi observado que apenas 12 (7,23%) dos 166 acessos de *S. spontaneum*, 20 (32%) dos 63 acessos de *S. officinarum*, 7 (37%) dos 19 acessos de *S. hybrid*, apresentam o gene *Bru1*.

Nos grupos formados pelos acessos de *S. robustum*, *S. barberi* e *S. sinense* a frequência de genótipos com o *Bru1* foi maior, 4 (67%) de 6 acessos e 3 (75%) de

4 acessos e 2 (100%) de 2 acessos, respectivamente. No grupo formado pelos acessos de *Erianthus arundinaceum* nenhum dos 9 genótipos apresentaram o gene Bru1 (Figura 6).

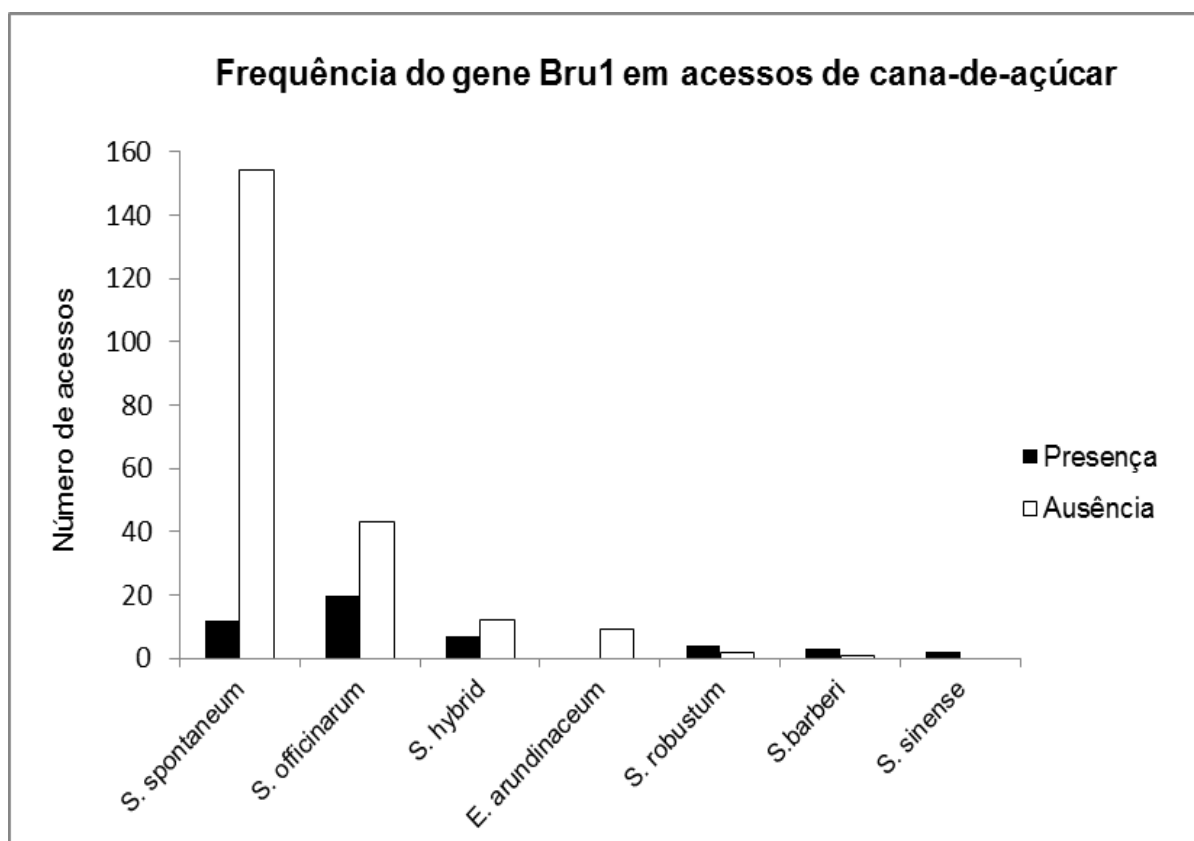


Figura 6. Frequência do gene Bru1 em acessos exóticos de cana-de-açúcar genotipados com os marcadores moleculares que flanqueiam o gene Bru1.

4.3 Relação entre a presença dos marcadores indicativos da presença do gene Bru1, e o fenótipo de resistência a ferrugem marrom nas cultivares

A associação entre o marcador de diagnóstico para o gene Bru1 e o fenótipo de resistência foi alta no grupo constituído pelas cultivares. Entre as cultivares classificadas como resistente, 68 (77%) apresentam ambos os marcadores indicativos da presença do gene Bru1. (Figura 7).

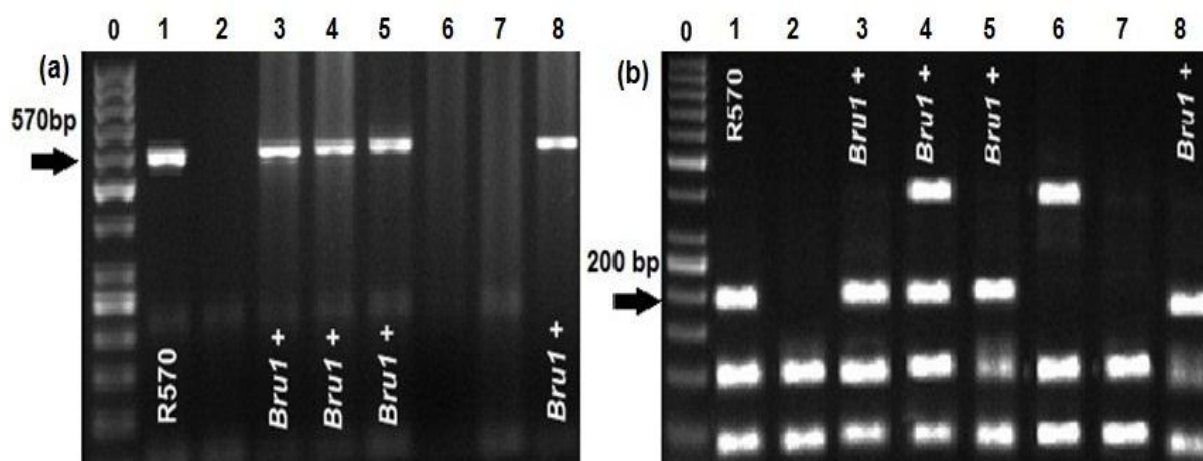


Fig. 7. Gel de agarose a 2% (A) e 3% (B) **(a)** Produto da PCR utilizando o par de primers R12H16, indivíduos positivos para o gene Bru1 com o marcador de 570 bp **(b)** Produto da PCR utilizando o par de primer 9020-F4, após digestão com enzima *RsaI*, diagnóstico positivo para as cultivares com o marcador de 200 pb.

De maneira contrária, apenas 2 (33%) das cultivares suscetíveis apresentam o gene Bru1(Tabela 3)

Tabela 3. Relação entre a presença (Bru1+) e ausência (Bru1-) dos marcadores indicativos do gene Bru1 e a resistência/suscetibilidade das cultivares brasileiras.

Fenótipo	Genótipo	
	Bru1+ (R12H16 e 9020-F4)	Bru1- (R12H16 e 9020-F4)
Resistente	68	20
Suscetível	2	4
Total	70	24

4.4 Análise da severidade de sintomas resultantes da inoculação de *Puccinia melanocephala* em acessos exóticos de cana-de-açúcar

A análise de variância para as notas de severidade de sintomas resultantes da inoculação de *P. melanocephala*, mostraram valores de F significativo a 1% de probabilidade para as avaliações (datas) e também para os acessos (Tabela 4) com um coeficiente de variação do ensaio de 10,62%.

Tabela 4 Dados relativos a análise de variância para notas de severidade de ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) em acessos de cana-de-açúcar.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Pr > F
Avaliações (datas)	2	0,153	0,076	11,83	<,0001
Acessos (genótipos)	16	7,753	0,484	74,91	<,0001
CV(%)					10,62

Considerando que houve diferença significativa entre as notas para severidade a ferrugem marrom, procedeu-se ao teste de comparação de médias, considerando a média das três avaliações para os acessos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 Comparações de médias pelo Teste t ($p < 0,05$) de genótipos para notas transformadas $(x+0,1)^{-1/2}$ de severidade dos sintomas causados por *Puccinia melanocephala* avaliadas em casa de vegetação e respectivas presença (1) e ausência (0) dos marcadores do gene Bru1.

Genótipo	Espécie	Nota	Bru1-PCR1 (9020-F4-RsaI)	Bru1-PCR2 (R12H16-PCR)
		*Média		
IACSP955000	Cultivar	1.02 (0,945) A	1	1
IK 76-049	<i>S. spontaneum</i>	1.23 (0.876) B	1	0
SH301	<i>S. spontaneum</i>	1.25 (0.872) B	1	0
SES196	<i>S. spontaneum</i>	1.28 (0.862) BC	0	0
SES 295	<i>S. spontaneum</i>	1.36 (0.836) BCD	0	0
IA3135	<i>S. spontaneum</i>	1.53 (0.831) CD	1	1
SES308 A	<i>S. spontaneum</i>	1.37 (0.828) D	0	0
SES297A	<i>S. spontaneum</i>	1.48 (0.804) D	1	0
US 56-016-01	<i>S. spontaneum</i>	1.56 (0.800) D	1	1
IN 84-009	<i>S. spontaneum</i>	1.55 (0.798) D	1	0
SES367	<i>S. spontaneum</i>	1.96 (0.707) E	0	0
UBA DEL NATAL	<i>S. sinense</i>	1.95 (0.714) E	1	1
SES208	<i>S. spontaneum</i>	2.11 (0.680) E	0	0
M. MOENTAI	<i>S. spontaneum</i>	2.10 (0.681) E	1	0
IM76-232	<i>S. robustum</i>	2.47 (0.631) F	1	0
PCASUR84-13	<i>S. spontaneum</i>	3.88 (0.510) G	0	0
IAC86-2480	Cultivar	4.10 (0.494) G	0	0

*Média não transformada e média transformada $(x+0,1)^{-1/2}$ em parênteses; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ($P < 0,05$).

De acordo com os dados demonstrados na Tabela 5, a menor nota de severidade do sintoma causado por *P. melanocephala* foi obtida na cultivar

IACSP955000 utilizada como controle de resistência que também diferiu significativamente dos demais acessos avaliados. O acesso PCASUR84-13, o qual não possui os marcadores indicativos do gene *Bru1*, mostrou-se suscetível, sendo semelhante à IAC86-2480, usada como padrão de suscetibilidade a ferrugem marrom. De fato, esse acesso PCASUR84-13 foi o que mais mostrou sintomas característicos da doença (Figura 8).

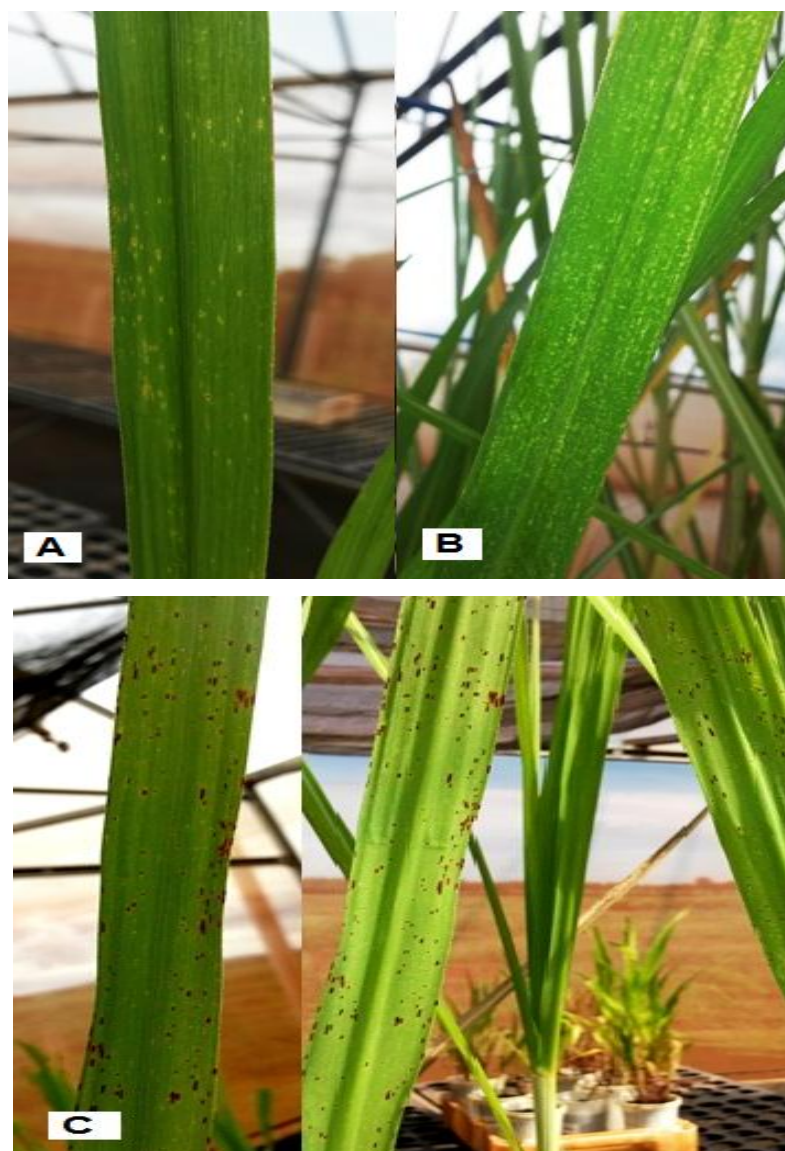


Figura 8 Vista parcial de folhas de cana-de-açúcar pertencente ao acesso PCASUR84-13 após inoculação com urediniósporo de *Puccinia melanocephala*. (A) Presença de “flecks” ou manchas cloróticas, após 7 dias da inoculação; (B) Presença de muitas manchas cloróticas de aspecto indefinido, na fase superior do limbo foliar, após 14 dias da inoculação; (C) Presença de pústulas, de coloração avermelhada, após 21 dias da inoculação. (Fotos: Ana Caroline Neuber)

Os acessos IK 76-049, SH301, SES196 e SES295 não diferiram entre si quanto à severidade a ferrugem marrom. Da mesma forma, os acessos SES295,

IA3135, SES 308A, SES 297S, US 56-016-01 e IN84-009, todos *S. spontaneum*, não diferiram significativamente entre si, apresentando a mesma resposta quanto à severidade à ferrugem marrom. Os acessos UBA DEL NATAL, SES208, M. MOENTAL e IM76-232 também não diferiram entre si quanto à severidade a ferrugem marrom e foram os que apresentaram notas de severidade mais próximas ao do controle de suscetibilidade (IAC86-2480), porém, diferiram significativamente da IAC86-2480.

Para permitir uma melhor visualização da relação entre os acessos exóticos avaliados quanto à severidade a ferrugem marrom, foi feita uma análise de agrupamento com base nas notas de severidade (Figura 9).

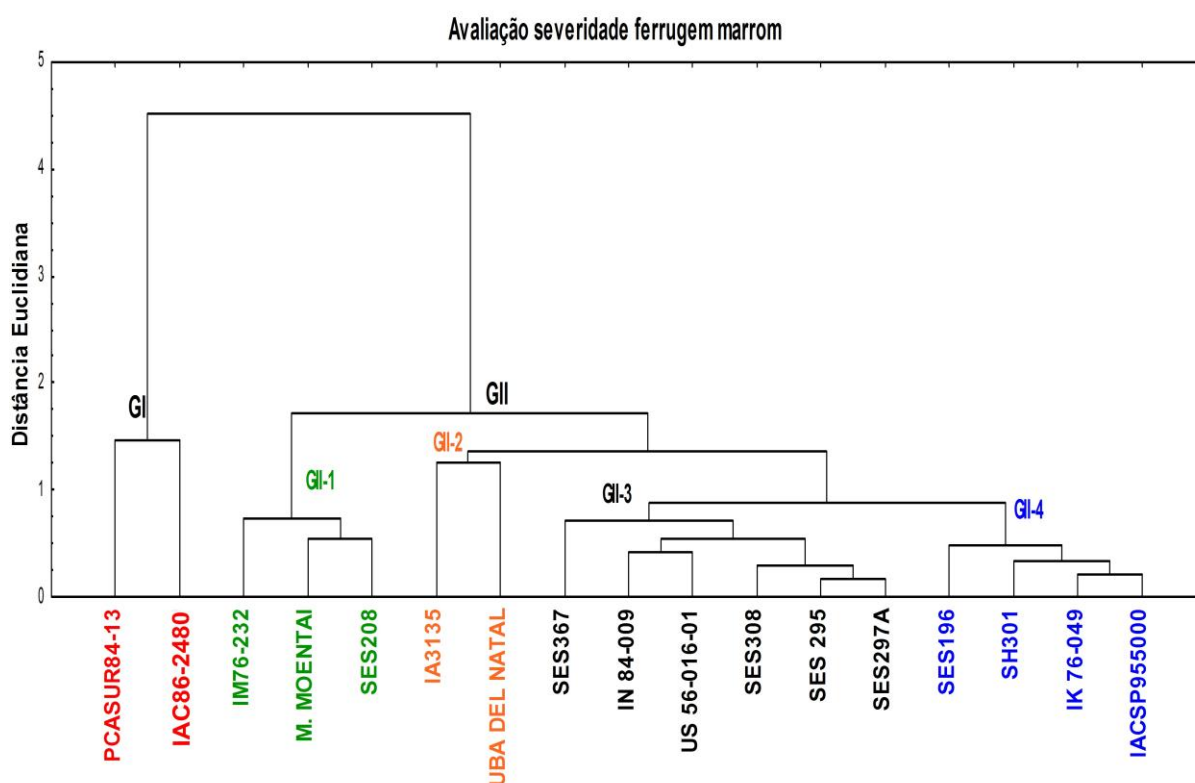


Figura 9 Análise de agrupamento de acessos exóticos de cana-de-açúcar com base na distância euclidiana calculada em função da severidade a ferrugem marrom. Agrupamento segundo o método de agrupamento da média aritmética não ponderada (UPGMA).

Com base no dendrograma foi possível observar a separação dos acessos em dois grandes grupos: o grupo I, constituído pela cultivar IAC86-2480 utilizada como controle de suscetibilidade e o acesso PCASUR84-13; e o grupo II formado pelos demais acessos. Ainda no grupo II, foi possível observar, basicamente 4 sub-

grupos: GII-1 (IM76-232, M. MOENTAI e SES208); GII-2 (IA3135 e UBA DEL NATAL); GII-3 (SES367, IN 84-009, US 56-016-01, SES308 e SES297A) e GII-4 (SES196, SH301, IK 76-049 e IACSP955000) cujos acessos contidos por estes sub-grupos, em linhas gerais vão de encontro com o resultado obtido pelo teste de comparação de médias. Pelo dendrograma fica evidente que as duas cultivares contrastantes quanto à severidade a ferrugem marrom estão em posições distantes e opostas.

4.5 Análise de correlação entre marcadores e resistência a ferrugem marrom para os acessos exóticos de cana-de-açúcar

Para verificar a eficiência dos pares de primers de diagnóstico do gene Bru1 nos acessos exóticos de cana-de-açúcar foi realizada análise de correlação. Nesta análise buscou-se verificar se a presença dos marcadores indicativos da presença do gene Bru1 está correlacionada com as repostas de severidade a ferrugem marrom dos acessos investigados.

A correlação entre as classes genótípicas obtidas com os pares de primers para diagnóstico do gene Bru1 e as notas de severidade estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 Valores obtidos para a correlação (r) entre os marcadores de diagnóstico para presença do gene Bru1 e as notas de severidade de ferrugem marrom.

Classes de correlação	r (p valor)
r (nota; Bru1-PCR1)	-0,39 ($p=0,12$)
r (nota; Bru1-PCR2)	-0,25 ($p=0,34$)
r (nota; Bru1-PCR1 e Bru1-PCR2)	-0,38 ($p=0,13$)

Os valores de correlação obtidos entre as notas e os genótipos marcadores foram no geral considerados de média baixa (0,25 a 0,50) e não significativos aos níveis de significância de 5%. Entretanto, os valores negativos de correlação indicam que a presença do marcador, quer seja Bru1-PCR1 ou Bru1-PCR2, ou ambos, esta associada à diminuição da severidade da doença e, portanto em direção à resistência.

5 Discussão

Desde o desenvolvimento dos marcadores de diagnóstico para inferência da presença do gene Bru1 (COSTET et. al. 2012; RABOIN et. al. 2006) diversos programas de melhoramento no mundo estão avaliando a eficiência deste marcador como ferramenta de diagnóstico para resistência a ferrugem marrom em cana-de-açúcar (PARCO et. al. 2014; GLYNN et. al. 2013; RACEDO et. al. 2013).

De acordo com os resultados apresentados, a elevada frequência dos marcadores de diagnóstico do gene Bru1 nas cultivares brasileiras (75%) indica que esse gene é a principal fonte de resistência à ferrugem marrom nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil. A alta frequência deste gene nas cultivares brasileiras e clones do programa IAC, pode ser atribuída à prática pelos programas de melhoramento da utilização de cultivares promissoras e sabidamente resistentes as principais doenças da cana como genitores (parentais), em cruzamentos, principalmente, a partir de 1986 quando foi feito o primeiro relato da incidência da ferrugem marrom nos canaviais brasileiros, no município de Capivari, São Paulo (COPERSUCAR, 1986) A partir daí, esta doença ganhou importância direcionando os programas de melhoramento a priorizar cruzamentos entre cultivares e ou clones resistentes.

RACEDO et al. (2013) avaliaram a frequência do gene Bru1 em 129 cultivares e clones frequentemente utilizados em cruzamentos pelo programa de melhoramento EEAO, Tucumán- Argentina, 49 (38%) genótipos foram classificados como resistentes e apenas 8 (16,3%) possuem os marcadores indicativos do gene Bru1. Além disso, todos os genótipos classificados como suscetíveis, não apresentaram os marcadores. GLYNN et al. (2013) também observaram baixa frequência do gene Bru1 nos clones usados em cruzamentos, os quais representam a base genética das cultivares desenvolvidas na Flórida, ou seja, 285 de 1.072 (27%) clones, possuem o gene Bru1. Por outro lado, a frequência do gene Bru1 foi alta em clones CP (Canal Point) e baixa em clones Louisiana (6%). Analisando a frequência do gene Bru1 em clones de Louisiana, PARCO et al, (2014) também observou baixa frequência deste gene, apenas 14 dos 208 (6,7%) clones avaliados possuem os marcadores indicativos do gene Bru1.

Através das informações, quanto à resposta das cultivares brasileiras e clones IAC, a ferrugem marrom, já disponível da literatura, bem como das informações

genotípicas (presença ou ausência dos marcadores) geradas no presente trabalho, o gene Bru1 mostrou-se fortemente associado com a resistência à ferrugem-marrom, visto que 77% das cultivares que possuem o marcador de diagnóstico do gene Bru1 também foram classificadas como resistentes a ferrugem marrom.

Provavelmente, existe outra fonte de resistência a esta doença entre as cultivares brasileiras avaliadas, visto que 23% das cultivares negativas para a presença do gene Bru1, foram classificadas como resistentes. Descartando a possibilidade da perda do marcador por recombinação, a identificação de genótipos negativos para o gene Bru1, mas que apresentam resistência à ferrugem-marrom é de grande importância aos programas de melhoramento de cana-de-açúcar, visto que esses genótipos provavelmente possuem fontes alternativas de resistências que podem ser introduzidas e combinadas com o gene Bru1, a fim de tornar a resistência ao patógeno mais eficiente e durável diante da natureza dinâmica do mesmo.

Em relação aos acessos exóticos utilizados no presente trabalho, foi observada uma baixa frequência do gene Bru1, apenas 18%. O maior número de acessos positivos para o Bru1 (32%) foi encontrado no grupo de *S. officinarum*. Provavelmente, as cultivares atuais podem ter herdado este gene dessa espécie cuja utilização foi intensificada durante o processo de nobilitação. Esse fato pode ser reforçado pela quase total ausência deste gene (7%) no expressivo número de acessos (166) de *S. spontaneum* investigados no presente trabalho. De forma semelhante, PARCO et al., (2014) encontraram baixa frequência de acessos positivos para o gene Bru1 em acessos de *S. spontaneum*, apenas 5 de 66 (7,6%).

No nosso estudo, 8 acessos exóticos não apresentaram correspondência entre os dois marcadores de diagnóstico para o gene Bru1 (R12H16 e 9020-F4). PARCO et al.,(2014), também observou ausência de correlação entre os marcadores em 11 genótipos, todos esses foram negativos para o marcador R12H16, o qual apresenta 570 pb, e positivos apenas para o marcador 9020-F4/*RsaI*, com 200 pb, ao contrário do que foi obtido no presente trabalho, onde os 8 acessos foram positivos apenas para o marcador R12H16. A falta de correlação entre os marcadores pode ser atribuída às alterações nos sítios da enzima de restrição, ou fraco desequilíbrio de ligação entre os marcadores (PARCO et al., 2014).

As plantas correspondentes aos acessos de *S. spontaneum*, inoculados artificialmente em casa de vegetação com o fungo *P. melanocephala*, na sua maioria

foram classificados como resistentes ou intermediárias, fato qual também pode ser atribuído à estrutura morfológica de suas folhas, ricas em fibras e quase ausente de limbo foliar, região onde o fungo penetra através de estômatos e se multiplica (PURDY; 1983). A inoculação artificial em casa de vegetação mostrou-se eficiente, os controles de resistência e suscetibilidade utilizados no experimento, comportaram-se conforme o esperado.

Ainda dentro do grupo de acessos exóticos avaliados em casa-de-vegetação, foi observada baixa correlação entre as notas obtidas a partir das avaliações e o marcador indicativo do gene Bru1. Esse resultado pode ser atribuído à presença de outra fonte de resistência ou a falha na complementariedade da sequência dos primers de diagnóstico no genoma desses acessos. GLYNN et al.(2013), destacam a possibilidade do gene Bru1 ter sido herdado como outro haplótipo que não está fortemente ligado aos marcadores de diagnóstico utilizados no presente estudo.

É válido lembrar que os marcadores de diagnóstico para o gene Bru1 foram desenvolvidos a partir de uma cultivar, R570, que assim como todas as cultivares de cana-de-açúcar apresentam em sua base genética maior contribuição do genoma de *S. officinarum*, devido ao processo de nobilitação, e baixa porcentagem do genoma de *S. spontaneum*. Dessa forma, a utilização desses marcadores para inferir a presença do gene Bru1 talvez não seja tão eficiente em acessos exóticos de *Saccharum spontaneum*. PARCO et al., (2014), observaram variações de padrões de bandas em 8 acessos, incluindo híbridos e clones exóticos, os fragmentos amplificados pelos dois *primers* foram clonados e sequenciados, o resultado sugere a existência de provável variação alélica em torno do gene Bru1 que pode levar a bandas (marcas) com intensidade e tamanhos diferentes.

Os resultados aqui apresentados fornecem informações importantes aos programas de melhoramento, direcionando estratégias futuras para o controle da doença, a fim de utilizar preferencialmente genótipos que possuam o gene Bru1, como uma maneira de controlar a ferrugem-marrom da cana-de-açúcar. Além disso, os genótipos que apresentaram resistência à ferrugem-marrom, porém não possuem o gene Bru1, podem ser utilizados em outros estudos a fim de serem exploradas novas fontes de resistência a ferrugem-marrom, associado com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares.

6 Conclusões

Diante dos resultados aqui apresentados é possível concluir que:

O gene Bru1 é a principal fonte de resistência à *P. melanocephala* em cultivares e clones de cana-de-açúcar no Brasil, porém esta resistência não é exclusiva.

A baixa correlação entre os marcadores indicativos do gene Bru1 e as notas de severidade a ferrugem-marrom, demonstraram que existe outra fonte de resistência à ferrugem-marrom presente nos acessos exóticos, ou até mesmo que esses marcadores não são eficientes quando utilizados em acessos exóticos de *Saccharum spontaneum*.

Genótipos caracterizados como resistentes à ferrugem-marrom, mas que não apresentam os marcadores indicativos do gene Bru1, podem ser utilizados na identificação de gene candidatos para resistência à *P. melanocephala*.

7 Referências

ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento Genético de cana-de-açúcar: uso de marcadores moleculares no mapeamento genético visando o melhoramento da cana-de-açúcar. **Biociências e Desenvolvimento**, Brasília, n. 36, p. 82-91, 2006.

AL-JANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reports**, Netherlands, v. 17, n. 3, p. 1-8, 1999.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO A.; CARDOSO C.; MORAES V. A.; FERNANDES C.R. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, Brasil, v. 39, n. 1, p. 13-16, 1987.

APARECIDO, C. C. **Diagnose de Uredinales (ferrugens)**. 2009 Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/Diagnose/Index.htm>. Acesso em: 31 de julho de 2013.

ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C.; ROTT P. Resistance of cultivar R 570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n. 3, p. 282-286, 2001.

BARBOSA, M. H. P.; SILVEIRA, L. C. I. Melhoramento genético e recomendação de cultivares. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds). **Cana-de-açúcar- Bioenergia, Açúcar e Álcool- Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa: UFV, 2010. p. 313-331.

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 Brasil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 9, p. 1170, 2010.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; DE CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27,n.3,p. 513-520, 1997.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Marcadores Moleculares. In:_____. **Melhoramento de plantas**, 4 ed. Viçosa: UFV, 2005, cap. 30, p. 441-463.

BRESSIANI, J. A.; SANGUINO, A. Herança genética da resistência à ferrugem (*Puccinia melanocephala* H&P Sydow) na cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, **Anais...**Copersucar, 1994. p. 151-164.

BRESSIANI, J. A.; **Seleção sequencial em cana-de-açúcar**. 2011. 104p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CARDOSO, C. O. N.; SANGUINO, A. Ferrugem da cana-de-açúcar. In: 4º SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA COPERSUCAR, 4., 1988, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: Ave Maria LTDA, 1988. p. 609-625.

CDA, COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Ferrugem Alaranjada da cana-de-açúcar**. 2010 Disponível em: <<http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/arquivos/ferrugem-alaranjada.pdf>> Acesso em: 03 de agosto de 2013.

CARLINI-GARCIA, L. A.; NUNES, D.; PINTO, L. R.; XAVIER, M. A.; CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A. Aplicações de marcadores moleculares no melhoramento genético da cana-de-açúcar. **Pesquisa e tecnologia**, 2012. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br>>Acesso em: 17 de agosto de 2015.

CANAOESTE, ASSOCIAÇÃO DOS PLANTADORES DE CANA DO OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Doenças da cana**. Disponível em <<http://www.canaoeste.com.br/conteudo/doencas-da-cana>>. Acesso em: 05 de agosto de 2001

CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES RB DE CANA-DE-ACÚCAR / **Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro**. – Curitiba, 2010. Disponível em: < <http://socicana.com.br/2.0/wp-content/uploads/2012-10-31-11-22-CatalogodeVariedadesRB.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2015.

COMSTOCK, J. C.; RAID, R. N. Sugarcane common rust. In: **Current Trends in Sugarcane Pathology (Pro. K. S. Bhargava Festschrift)**, RAO, G. P.; GILLASPIE JR., A. G.; UPADHYAYA, P. P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V. P.; CHEN, C. T. (Eds.), New Delhi: International Books and Periodical Supply Service, 1994. p. 1-10.

COPERSUCAR. Ferrugem da cana-de-açúcar e sua constatação no município de Capivari. **Boletim técnico Copersucar**, Cooperativa Central dos produtores de açúcar e álcool do Estado de São Paulo, São Paulo, n. 32, p. 3-8, 1986.

COSTET, L.; CUNFF, L.; ROYAERT, S.; RABOIN, L. M.; HERVOUET, C.; TOUBI, L.; TELISMART, H.; GARSMEUR, O.; ROUSSELE, Y.; PAUQUET, J.; NIBOUCHE, S.; GLASZMANN, J. C.; HOARAU, J. Y.; D'HONT, A. Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for Brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 825-836, 2012.

COMPAINHA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar, 2º Levantamento**. Brasília, 2014, 22p.

CRESTE, S.; ROSA JÚNIOR, V. E.; PINTO, L. R.; ALBINO, J. C.; FIGUEIRA, A. V. O. A. biotecnologia como ferramenta para o melhoramento genético. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; DE VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 157-176.

DAUGROIS, J. H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J. Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with na RFLP marker in sugarcane cultivar R570. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, n. 5, p. 1059-1064, 1996.

DOS SANTOS, A. DA S. Doenças causadas por fungos. In. DINARDO-MIRANDA, L.L.;DE VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.C.A. (Eds). **Cana-de-açúcar**. Campinas:Instituto Agrônômico, 2008. cap. 19, p. 423-435.

D'HONT, A.; RAO, P. S.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. C. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with moleculars markers and DNA in situ hybridisation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 320-326, 1995.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMAN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, v. 250, n. 4, p 405-413, 1996.

D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologist**, v. 24, n 3, p. 556-559, 2001.

D'HONT, A. Unravelling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Switzerland, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005.

D'HONT, A.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M. A.; GLASZMANN, J. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. In: MOORE, P.; MING, R. (Eds). **Genomics of Tropical Crop Plants**, New York: Springer, 2008. cap. 21, p. 484-513.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana de açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.

GIGLIOTI, E. A.; CANTERI, M. G.; FRANÇA, J. A.; CARDIM, M.; DEL PONTE, E. M.; ABI SAAD, O. Informações básica para o monitoramento, diagnóstico e manejo da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Boletim técnico SCORALERT**, Adamantina, v. 25, n 1, p. 1-6, 2009.

GLYNN, N. C.; LABORDE, C.; DAVIDSON, R. W.; IREY, M. S.; GLAZ, B.; D'HONT, A. COMSTOCK JC. Utilization of major Brown rust resistance gene in sugarcane breeding. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 31, n. 2, p. 323-331, 2013.

GRASMEUR, O.; CHARRON, C.; BOCS, S.; JOUFFE, V.; SAMAIN, S.; COULOUX, A.; DROC, G.; ZINI, C.; GLASZMANN, J.C.; VAN SLUYS M. A, D'HONT, A. High homologous gene conservation despite extreme autopolyploid redundancy in sugarcane. **New Phytologist**, Espanha, v. 189, n. 3, p. 629-642, 2011.

HENRY, J. R. Basic Information on the Sugarcane Plant. In: HENRY, J. R.; KOLE, C. (Eds.). **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. Science Publishers Enfield, 2010. p.1-8.

HOGARTH, D. M.; RYAN, C. C.; TAYLOR, P. W. J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 187-193, 1993.

HOGARTH, D. M.; RYAN, C. C.; SKINNER, J. C. Inheritance of resistance to rust in sugarcane-comments. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 313-316, 1983.

HOARAU, J. Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A. M.; ROQUES, D.; GLASZMANN J. C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.).I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, n. 7, p. 84-97, 2001.

IDO, O. T.; LIMA-NETO, V. C.; DAROS, E.; POSSAMAI, J. C.; ZAMBON, H. W.; OLIVEIRA, R. A. Incidência e severidade da ferrugem em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasil, v. 36, n. 2, p. 159-163, 2006.

KLOSOWSKI, A. C.; RUARO, L.; BESPALHOK FILHO, J. C.; MIO, L. L. M. Proposta e avaliação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasil, v. 38, n. 5, p. 166-171, 2013.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LABORD, C. M. **Sugarcane tasseling under artificial photoperiod conditions as affected by nitrogen rate and temperature**. 2007. 76f. (Tese de doutorado em Fisiologia de Plantas). The School of Plant, Environmental, and Soil Sciences, Louisiana.

LANDELL, M. G. A.; BRESSIANI, J.A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. cap. 5, p.101 – 155.

LE CUNFF, L.; GARSMEUR, O.; RABOIN, L. M.; PAUQUET, J.; TELISMART, H.; SELVI, A.; GRIVET, L.; PHILIPPE, R.; BEGUM, D.; DEU, M.; COSTE, L.; WING, R.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. Diploid/polyploid syntenic shuttle mapping and haplotype-specific chromosome walking toward a rust resistance gene (Bru1) in highly polyploid sugarcane ($2n \sim 12x \sim 115$). **Genetics**, Baltimore, v. 180, n. 3, p. 649-660, 2008.

MACCHERONI, W.; MATSUOKA, S. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Orgs). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Prol, 2006. cap. 14, p. 239-256.

MATSUOKA, S. Análise retrospectiva de perdas pela ferrugem da cana-de-açúcar em São Paulo. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 1993, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: STAB, 1993. p. 148-156.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém, A. (Eds). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 205-251.

MATSUOKA, S.; MACCHERONI, W. Manejo de Doenças. In. SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Eds). **Cana-de-açúcar. Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologias e Perspectivas**. Viçosa: UFV, 2010, p. 161-180.

MOURA, G. L; GHELLER, A. C. A; MATSUOKA, S. and GIGLIOTI, E. A. The impact of rust (*P. melanocephala*) on sugarcane production in the state of São Paulo. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, Brasil. **Anais...** Fitopatologia Brasileira 24 (supl), 1999, p.279.

MOURA, G. L. **Análise da herança da resistência da cana-de-açúcar à ferrugem (*Puccinia melanocephala* H. & R. Syd)**. 2004. Tese (Mestrado em genética e evolução, Área de Concentração: Genética e Evolução)- Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos, 2004.

NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Estratégias da indústria da cana. In: _____. (Ed.) **Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial**. São Paulo: Atlas, 2010, p. 59-88.

PARCO, A. S.; AVELLANEDA, M. C.; HALE, A. H.; HOY, J. W.; KIMBENG, C. A.; PONTIF, M. J.; GRAVOIS, K. A.; BAISAKH, N. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene *Bru1* and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. **Plant Breeding**, Berlin, v. 3, n. 4, p. 1-6, 2014.

PIPERIDIS, G.; D'HONT, A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic in situ hybridization (GISH). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 24., Brisbane, Australia, 2001. **Proceedings...** Brisbane: International Society of Sugar Cane Technologists, v.2, 2001. p. 565-566.

PRIESTLY, R. Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust. In: Scott Pr, bainbridge a (Eds) **Plant Disease Epidemiology**. Oxford: Blackwell scientific, 1978. p. 63–70.

PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Relatório anual** 1999. Araras, UFSCar/CCA/DBC, 2000. 39p.

PURDY, L. H.; LIU, L.; DEAN, J. L. **Sugarcane rust, a newly importante disease**. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 3, p. 1292-1296, 1983.

RABOIN, L. M.; OLIVEIRA, K. M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J. Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk color and a new rust resistance gene. **Theoretical and Applied**, Berlin, v.112, n. 2, p. 1382-1391, 2006.

RACEDO, J.; PERERA, M.F.; BERTANI, R.; FUNES, C.; GONZÁLEZ, V.; CUENYA, M.I.; D'HONT, A.; BJORN, W.; CASTAGNARO, A.P. *Bru1* gene and potencial alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. **Euphytica**, Wageningen, v.191, n. 4, p. 429-436, 2013.

RAID, R. N. Physiological specialization in sugarcane rust (*Puccinia melanocephala*) in florida. **Plant disease**, Saint Paul, v. 73, n. 3, p. 183, 1989.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na agropecuária. In: _____. (Ed.) **Marcadores moleculares**. Lavras: UFLA, 2008. cap. 18, p. 367-403.

RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; LIM-SHIM-CHONG, L. C. Y.; BADALOO, G. H.; SAUMTALLY, S.; DOMAINGUE, R. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 1, p. 557-563, 2000.

RYAN, C. C.; EGNAN, B. T. Rust. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE, A. G.; HUGHES, C. G. (Eds) **Diseases of sugarcane**, Amsterdam, 1989. p. 189-210.

SANGUINO, A.; TOLEDO, A. C. D. Considerações sobre a ferrugem da cana-de-açúcar. **Boletim técnico Copersucar**, São Paulo, v. 22, p. 25-31, 1983.

SAS Institute. **SAS/STAT user's guide, version 9.2** SAS, Cary, 2008.

SHINE J. M.; COMSTOCK, J. C.; DEAN, J.L. Comparison of five isolates of sugarcane brown rust and differential reaction of six sugarcane clones. **Sugar Cane International**, Londres, v. 23, n. 5, p.24-29, 2005.

STATSOFT, INC. **Statistica data analysis software system, versão 7.0**, 2004.

SATHE, A. V. Nomenclature revision of the common rust fungus affecting sugarcane. **Current Science**, Índia, v.40, n. 3,p. 42-43, 1971.

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

SORDI, R. A.; MATSUOKA, S.; MASUDA, Y.; AGUILLERA, M. M. Sugarcane rust: a new problem in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasil, v. 13, n. 4,p. 313-316, 1988.

TAI, P. Y. P.; MILLER, J. D. DEAN, J. L. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. **Field Crops Research**, Netherlands, v. 4, n. 5, p. 261-268, 1981.

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.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 7, p. 496, 1992.

WANG, X.; LI, W.; HUANG, Y.; LU, X.; LUO, Z.; Y, J.; SHAN, H.; ZHANG, R. Evaluation of sugarcane introgression lines for resistance to brown rust disease caused by *Puccinia melanocephala*. **Tropical Plant Pathology**. Brasil, v. 38, n. 097-101, p. 97- 101, 2013.