

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESISTÊNCIA AO sugarcane yellow leaf virus E AO AFÍDEO VETOR
Melanaphis sacchari EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR E
SUAS INTERAÇÕES**

Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello
Mestre em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas

**Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESISTÊNCIA AO sugarcane yellow leaf virus E AO AFÍDEO VETOR
***Melanaphis sacchari* EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR E**
SUAS INTERAÇÕES

Eng. Agr. Ms. Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello
Orientador: Prof. Dr. Marcos Cesar Gonçalves
Coorientadora: Dra. Michele do Carmo de Sousa Timossi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal/SP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
2022

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RESISTÊNCIA AO sugarcane yellow leaf virus E AO AFÍDEO VETOR *Melanaphis sacchari* EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUAS INTERAÇÕES

AUTOR: LUIZ EDUARDO TILHAQUI BERTASELLO

ORIENTADOR: MARCOS CESAR GONÇALVES

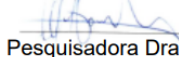
COORDINADORA: MICHELE DO CARMO DE SOUSA TIMOSSI

COORDINADOR: GUSTAVO VITTI MÔRO

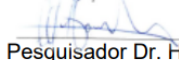
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



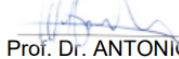
Prof. Dr. MARCOS CESAR GONÇALVES (Participação Virtual)
Instituto Biológico - Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Vegetal / São Paulo/SP



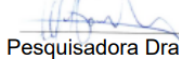
Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO (Participação Virtual)
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP



Pesquisador Dr. HAROLDO XAVIER LINHARES VOLPE (Participação Virtual)
FUNDECITRUS / Araraquara/SP



Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. PAULA MACEDO NOBILE (Participação Virtual)
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 17 de fevereiro de 2022

B536r

Bertasello, Luiz Eduardo Tilhaqui

Resistência ao sugarcane yellow leaf virus e ao afídeo vetor melanaphis sacchari em cultivares de cana-de-açúcar e suas interações / Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello. -- Jaboticabal, 2022

111 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcos Cesar Gonçalves

Coorientadora: Michele do Carmo de Sousa Timossi

1. Saccharum sp. 2. Amarelinho da cana. 3. Electrical Penetration Graph. 4. Desempenho biológico de pulgões. 5. Resistência de plantas a vírus. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR

LUIZ EDUARDO TILHAQUI BERTASELLO - Nascido em 30 de julho de 1992, na cidade de Pacaembu, interior do estado de São Paulo, filho de Luiz Carlos Bertasello e Clemilda Tilhaqui. Em 2010, ingressou no curso de Agronomia (Bacharelado) na Faculdades Adamantinenses Integradas - FAI campus II, em Adamantina-SP onde obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2014. Em 2012 e 2018 recebeu título de “Menção Honrosa” como melhor trabalho apresentado na área de agrárias durante congressos científicos. Em março de 2014 mudou-se para a cidade de Sorriso, no estado do Mato Grosso onde permaneceu por dois anos e meio exercendo a atividade de formação na multinacional holandesa “Schutter do Brasil”, posteriormente ingressou na multinacional americana “Monsanto do Brasil”, atuando na área de Genética e Melhoramento de Plantas na cultura do milho, sob supervisão do melhorista de milho Dr. Flávio Trevizoli Silveira. Em agosto de 2016 iniciou o curso de Pós-Graduação, nível de Mestrado em Agronomia, no Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal-SP - FCAV/Unesp, sendo bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), concluído em agosto de 2018. Orientado pelo Professor Dr. Gustavo Vitti Môro, adotou como linha de pesquisa o desempenho agrônomo de genótipos de milho frente à inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. Em 2018 durante o Mestrado, realizou intercâmbio pelo Programa *Escala Estudiantes de Posgrado* (Escala AUGM) via *Universidad Nacional de Mar del Plata* - Argentina, na FCA - *Facultad de Ciencias Agrarias - Balcarce*, sob orientação do Professor Dr. Fernando Castaño. Ainda em agosto de 2018 pela mesma instituição e programa de pós-graduação, iniciou o Doutorado sob orientação do professor Dr. Marcos Cesar Gonçalves e da pesquisadora Dra. Michele do Carmo de Sousa Timossi, com investigações sobre a resistência do sugarcane yellow leaf virus e do afídeo vetor *Melanaphis sacchari* em cultivares de cana-de-açúcar, em parceria com o Instituto Biológico de São Paulo, Centro de Cana (IAC) de Ribeirão Preto e ESALQ/USP de Piracicaba.

EPÍGRAFE

E no dia que eu me for. E eu me vou, e você também.

Mas eu não quero ir, quero ficar.

Só tem um jeito de ficar.

Ficar nas outras pessoas.

E você só fica, quando você é um irmão excelente,

um filho excelente,

um amigo excelente,

um profissional excelente.

E ser excelente não é você ser o melhor.

Se for isso ótimo.

É você ser o “teu melhor”.

“Mario Sergio Cortella”

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

Disse Jesus aos judeus que haviam crido nele: "Se vocês permanecerem firmes na minha palavra, verdadeiramente serão meus discípulos. E conhecerão a verdade, e a verdade os libertará".

João 8:31-32

OFEREÇO

Aos meus pais Luiz Carlos Bertasello
e Clemilda Tilhaqui.

À minha irmã Aracelli, e meu sobrinho Arthur.

Aos amigos de velha data, cuja presença prezo e
valorizo.

E por todos aqueles que se lembraram
de mim em suas orações.

DEDICO

Aos meus avós paternos
Orelho Bertasello (*in memoriam*)
e Iracilda Cirino Bertasello.

Aos meus avós maternos
Basílio Domingos Tilhaqui (*in memoriam*)
e Aracelli Correa Tilhaqui (*in memoriam*).

Ao meu querido Tio Miro
Ademir Tilhaqui (*in memoriam*).

Aos quais sempre amarei.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao nosso Senhor Jesus Cristo pelo dom da vida e por me permitir chegar até o dia de hoje com saúde e discernimento, caminhando lado a lado, sempre me abençoando e protegendo de todo o mal, dando forças para enfrentar as dificuldades encontradas pelo caminho.

À toda minha família em especial aos meus pais, Luiz Carlos e Clemilda, à minha irmã Araceli, por sempre estarem ao meu lado em todas as fases da minha vida, me apoiando e incentivando a batalhar pelos meus sonhos. Onde me ensinaram a conquistar meus objetivos com muito respeito ao próximo, educação e humildade.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), campus de Jaboticabal-SP, ao Departamento Ciências da Produção Agrícola (extinto departamento de Produção Vegetal - Fitotecnia) e todos os funcionários, por toda infraestrutura oferecida e pela oportunidade de vivenciar a experiência da pós-graduação, compartilhando conhecimentos, histórias e construindo grandes amizades.

À Universidade de São Paulo (USP), campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), em Piracicaba - SP e ao Departamento de Entomologia e Acarologia - Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos. Nas pessoas do Professor Dr. João Roberto Spotti Lopes, Dra. Michele do Carmo de Sousa Timossi e seus orientados, pelo acolhimento, ensinamento e experiências compartilhadas, principalmente por todo auxílio prestado durante os ensaios de EPG, preferência e criação de insetos.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas - Centro de Cana em Ribeirão Preto -SP e ao Laboratório de Biotecnologia, em especial aos Pesquisadores Dr. Ivan Antônio dos Anjos e Dra. Luciana Rossini Pinto, seus auxiliares Maicon Volpin, Juliana Borges, Thais Monteiro e toda equipe de colaboradores e pesquisadores da instituição, auxiliando com a instalação e condução do experimento de campo, assim como todas as etapas realizadas em bancada/laboratório.

Ao meu orientador e professor Dr. Marcos Cesar Gonçalves, por toda paciência, atenção, ensinamentos, cobranças, correções e pela confiança depositada em mim durante todo o tempo, sempre disposto a colaborar, seja de forma presencial

ou a distância “*online*”, um excelente profissional e pesquisador científico.

À minha coorientadora e amiga Dra. Michele do Carmo de Sousa Timossi, por todo carinho, atenção e dedicação em ensinar e compartilhar suas experiências de vida, entomológicas e principalmente sobre a técnica de EPG, sendo extremamente acolhedora durante os meses que estive na ESALQ/Piracicaba, uma pessoa extraordinária em âmbito pessoal e profissional.

Aos co-autores pelo apoio e contribuição referente ao artigo aceito e publicado no periódico científico *Plants* (JCR: 3.935) em 06/10/2021: Effect of sugarcane cultivars infected with Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) on feeding behavior and biological performance of *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae).

À todo corpo docente do programa de pós-graduação em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas da Unesp/FCAV, pelas instruções e conhecimentos transmitidos a nós discentes, assim como todos os funcionários da instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudos durante todo o Doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Às amizades sinceras construídas dentro e fora da universidade, as quais foram de suma importância para um bom acolhimento pessoal, durante disciplinas, auxílio em experimentos, trabalhos e dúvidas, sempre com muito entusiasmo e alegria, sem contar nossos momentos de descontração e inúmeras gargalhadas. Amigos esses escolhidos a dedo por Deus que levo para toda vida, especialmente por Anderson Prates Coelho, Guilherme Vieira Grunewald, Kian Eghrari, Marco Renan Félix, Lucas Revolti, Marcos Claudio Virtuoso, Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro e Rubens Libório (farofino).

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma participaram e compartilharam comigo, dia após dia, durante toda a trajetória desse Doutorado. Tudo aquilo que me desejara, desejo em dobro a vocês.

Deus nos abençoe sempre.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	ix
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Cultura da cana-de-açúcar e seu melhoramento genético	3
2.2 Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) e o afídeo vetor <i>Melanaphis sacchari</i>	6
2.3 Mecanismos de resistência de plantas a insetos	9
2.4 Técnica de gráficos de penetração elétrica - <i>Electrical Penetration Graph</i> (EPG) ..	11
2.5 Mecanismos de resistência de plantas a vírus	15
3. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 - Classes de resistência de cultivares de cana-de-açúcar ao sugarcane yellow leaf virus por meio de fenotipagem a campo e quantificação viral via RT-qPCR	25
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Local do experimento, grupo de cultivares e produção de mudas	28
2.2 Criação de colônias de <i>M. sacchari</i> virulíferas e não-virulíferas	30
2.3 Preparo, condução e delineamento experimental do ensaio de campo	31
2.4 Avaliação fenotípica de sintomas causados pelo ScYLV em campo e a classe de resistência em cultivares de cana-de-açúcar	32
2.5. Extração de RNA, detecção por RT-PCR e quantificação por <i>real time</i> RT-qPCR de plantas previamente inoculadas com ScYLV	34
2.5.1 Extração de RNA e síntese de cDNA	35
2.5.2 Escolha do gene de referência e avaliação da eficiência dos pares de <i>primers</i> utilizados nas reações de RT-qPCR	36
2.5.3 Reação de RT-qPCR	37
2.6 Análise de dados	37
3. RESULTADOS	39
3.1 Fenotipagem de campo e classificação de resistência e suscetibilidade ao ScYLV	39
3.2 Quantificação do título viral ao longo do tempo via RT-qPCR	41
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 3 - Effect of Sugarcane Cultivars Infected with Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) on Feeding Behavior and Biological Performance of <i>Melanaphis sacchari</i> (Hemiptera: Aphididae)	53
Abstract	53

1. Introduction	53
2. Results	54
2.1. Effects of ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars on the Life History of <i>M. sacchari</i>	54
2.2. Stylet Activities and Probing Behavior of <i>M. sacchari</i> in ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars	57
3. Discussion	59
4. Materials and Methods	61
4.1. Aphid Colony and Test Plants	61
4.2. Effects of ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars on the Life History of <i>M. sacchari</i>	62
4.3. Stylet Activities and Probing Behavior of <i>M. sacchari</i> in ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars	62
4.4. Statistical Analysis	62
5. References	63

CAPÍTULO 4 - Efeito de cultivares de cana-de-açúcar infectados com o vírus do amarelinho (ScYLV) sobre a preferência do vetor *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae)67

RESUMO	67
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Ensaio de preferência do vetor <i>M. sacchari</i> em diferentes cultivares de cana-de-açúcar	69
2.2 Efeito de cultivares de cana-de-açúcar infectadas com ScYLV sobre o comportamento de preferência de <i>M. sacchari</i>	70
2.3 Análise de dados	71
3. RESULTADOS	72
3.1 Efeito de cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre a preferência de <i>M. sacchari</i>	72
4. DISCUSSÃO	77
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS	81
7. CONCLUSÕES FINAIS	81
APÊNDICE	86
Table S1	87
Table S2	88
Table S3	89
Figura 1	90

RESISTÊNCIA AO sugarcane yellow leaf virus E AO AFÍDEO VETOR *MELANAPHIS SACCHARI* EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR E SUAS INTERAÇÕES

RESUMO - O amarelecimento foliar da cana-de-açúcar, causado pelo sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) e transmitido pelo afídeo *Melanaphis sacchari*, é uma das doenças mais importantes dessa cultura, provocando danos às plantas e perdas econômicas. A principal forma de controle da doença é o uso de cultivares resistentes, no entanto, para adoção de estratégias de controle mais eficientes é necessário um melhor conhecimento sobre as interações do patossistema planta-vírus-vetor. O objetivo da pesquisa foi compreender melhor as interações entre o ScYLV, cultivares de cana-de-açúcar e o afídeo vetor *M. sacchari* bem como avaliar e caracterizar oito cultivares de cana-de-açúcar visando identificar potenciais fontes de resistência. Os experimentos de fenotipagem em campo e a quantificação viral por RT-qPCR foram conduzidos no Centro de Cana do Instituto Agrônomo - IAC em Ribeirão Preto/SP, e os experimentos de comportamento alimentar por meio da técnica de EPG, preferência e desempenho biológico foram realizados no Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP em Piracicaba/SP. Foram avaliados a severidade dos sintomas foliares da doença em campo, os mecanismos de resistência ao inseto por desempenho biológico, preferência e comportamento alimentar, e quantificação da concentração viral por RT-qPCR, em diferentes estádios fenológicos das plantas. Destaca-se a cultivar IACBIO-266, a única caracterizada como resistente, sem presença de sintomas em campo e com título viral em níveis não detectáveis ao decorrer do tempo. As cultivares SP71-6163 e IACSP01-3127, com 12 meses após o plantio, apresentaram maior aumento do título viral em 15,4 e 23,7 vezes, respectivamente, em comparação com 0 meses após o plantio. De maneira geral, durante os registros de EPG, na cultivar IACSP96-7569 os insetos apresentaram dificuldades mecânicas durante a penetração estiletar no processo de alimentação, com atividades floemáticas mais curtas, principalmente na fase de ingestão, portando a cultivar foi considerada a mais resistente ao *M. sacchari* frente as outras cultivares testadas. A infecção viral apresentou resultados significativos quanto ao desempenho biológico dos insetos, demonstrando variação entre os parâmetros observados, destacando-se as cultivares IACBIO-266 e IACSP95-5000. A correlação entre os resultados observados em todos os experimentos possibilitou caracterizar as cultivares de cana quanto aos padrões de suscetibilidade e resistência ao ScYLV, assim como ao inseto vetor. Inferimos que o conjunto de fatores envolvidos na infecção pelo ScYLV, nas diferentes cultivares de cana-de-açúcar, podem induzir alterações fisiológicas na planta hospedeira, influenciando o desempenho e comportamento do inseto vetor, podendo favorecer ou dificultar a transmissão viral.

Palavras-chave: Amarelinho da cana, concentração viral, desempenho biológico de pulgões, *Electrical Penetration Graph*, resistência de plantas a vírus, *Saccharum* sp.

EVALUATION OF RESISTANCE TO sugarcane yellow leaf virus AND TO THE APHID VECTOR *Melanaphis sacchari* IN SUGARCANE CULTIVARS AND THEIR INTERACTIONS

ABSTRACT - Sugarcane yellow leaf disease, caused by sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) and transmitted by the aphid *Melanaphis sacchari*, is one of the most important diseases of this crop, causing damage to plants and high yield losses. The control of this disease is mainly done by deploying cultivar genetic resistance. However, to achieve high efficient control an extensive knowledge of the plant-virus-vector interactions is required. The objective of the research was to better understand the interactions between ScYLV, sugarcane genotypes and the aphid vector *M. sacchari*, by evaluating and characterizing eight sugarcane cultivars aiming to identify potential sources of resistance. The phenotyping assays and the viral quantification by RT-qPCR were carried out at the Agronomic Institute Sugarcane Research Centre - IAC in Ribeirão Preto/SP, while the virus-vector interactions assay at the Department of Entomology and Acarology of ESALQ-USP, in Piracicaba/SP. The severity of virus infection symptoms, the insect biological performance, preference, feeding behavior via EPG and the quantification of viral concentration by RT-qPCR were assayed at different plant phenological stages. The cultivar IACBIO-266 stands out as the only one characterized as virus resistant, free from symptoms in the field and the low viral titre reaching levels no longer detectable over time. The cultivars SP71-6163 and IACSP01-3127 showed, at 12 months after planting the highest increases in virus titer by 15.4 and 23.7 folds, respectively. ScYLV was detected in all sugarcane cultivars, with viral titre varying over sampling time. In general, during the EPG records in the cultivar IACSP96-7569 the insects showed mechanical difficulties for feeding with a shorter phloem feeding time, mainly in the ingestion phase, therefore it was considered the most resistant to *M. sacchari*. The viral infection significantly affected the biological performance of insects in the cultivars, which varied between the parameters observed, mainly on the cultivars IACBIO-266 and IACSP95-5000. The correlation among all the parameters allowed the classification of cultivars in different patterns of susceptibility and resistance to ScYLV and to the vector. We also inferred that the set of factors involved in ScYLV infection in each sugarcane cultivar can induce physiological changes in the host plant, affecting the performance and feeding habits of the insect vector, which may favor or hinder viral transmission.

Keywords: Sugarcane yellow leaf disease, viral titer, aphid biological performance, Electrical Penetration Graph, plant virus resistance, *Saccharum* sp.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Páginas
Tabela 1. Classe de níveis de resistência ao ScYLV de acordo com a média das avaliações fenotípicas de campo	34
Tabela 2. Valores médios das notas de sintomas e classe de resistência ao ScYLV nas oito cultivares de cana-de-açúcar mediante avaliação fenotípica em campo	40
Tabela 3. Valores de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ na quantificação do título do ScYLV, via RT-qPCR, nas oito cultivares de cana-de-açúcar ao longo do tempo	43
Tabela 4. Valores de $2^{-(\Delta Ct)}$ na quantificação do título do ScYLV, via RT-qPCR, nas oito cultivares de cana-de-açúcar ao longo do tempo	43
Capítulo 3	
Table 1. Factor-variable correlations in the first two main components for eight sugarcane cultivars regarding the biological performance of <i>M. sacchari</i> under no-choice conditions. Data submitted to multivariate exploratory analysis by principal components (PCA)	56
Capítulo 4	
Tabela 1. Correlações fator-variáveis nos dois primeiros componentes principais para oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de <i>M. sacchari</i> ápteros em condições de livre escolha a 30 min, 1, 3, 6 e 24 h após liberação dos insetos. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por componentes principais (CP)	74
APÊNDICE	
Table S1. Mean (\pm SEM) of non-sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of <i>Melanaphis sacchari</i> on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV)	87
Table S2. Mean (\pm SEM) of sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of <i>Melanaphis sacchari</i> on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV)	88
Table S3. Proportion of <i>Melanaphis sacchari</i> that produced a specific waveform type (PPW) on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) during 8-h recording	89

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Páginas
Figura 1. Gráficos de penetração Elétrica (EPG). Diferentes padrões de ondas de EPG de afídeos. Fonte: próprio autor	14
 Capítulo 2	
Figura 1. Dados de precipitação acumulada (mm) e temperaturas (°C) médias durante condução do experimento nos anos 2019 e 2020, no Centro de Cana - IAC em Ribeirão Preto/SP	28
Figura 2. Produção das mudas pré-brotadas (MPB) para os ensaios de campo. A. Coleta dos colmos no campo. B. Corte e seleção das gemas com guilhotina. C. Organização e identificação das gemas em bandejas de plástico. D. Gemas em bandejas de plástico cobertas com substrato. E. Câmara de germinação controlada. F. Gemas germinadas em tubetes de plástico em casa de vegetação	29
Figura 3. A. Criação de <i>M. sacchari</i> em folhas destacadas de cana-de-açúcar na cultivar IACSP95-5000 em tubos de ensaio com solução de ágar a 1%. B. Colônia de pulgões <i>M. sacchari</i> , mostrando adultos e ninfas vistos ao microscópio estereoscópico (aumento 10x)	31
Figura 4. Amostragem de afídeos avirulíferos (Luiz 1 e Luiz 2) submetidos a análise de RT-PCR. C-: controle negativo para ScYLV, 6163: controle positivo para ScYLV	31
Figura 5. Instalação do experimento de campo. A. Preparo do solo, adubação de base e abertura dos sulcos. B. Área finalizada e pronta para o plantio. C. Plantio das oito cultivares de cana-de-açúcar em sistema de parcelas experimentais. D. Ensaio instalado recebendo irrigação via aspersão	32
Figura 6. Escala de notas (1 a 4) para a infecção pelo ScYLV. Nota 1. folha verde sem sintomas, Nota 2. amarelecimento leve da nervura central na face abaxial e leve avermelhamento da face adaxial da nervura central, Nota 3. amarelecimento da face abaxial da nervura central e avermelhamento parcial da face adaxial, com perda de pigmentação e Nota 4. Amarelecimento e avermelhamento intenso da nervura central nas faces abaxial e adaxial	33
Figura 7. Coleta e extração de RNAs de amostras foliares provenientes do experimento de campo, para detecção e quantificação do ScYLV via RT-qPCR	35
Figura 8. Avaliação visual das oito cultivares de cana-de-açúcar por escala de notas de severidade de sintomas do ScYLV durante avaliação fenotípica mensal, de 6 a 8 meses do plantio em campo. *Letras iguais não diferem dos demais tratamentos pelo teste LSD-Fisher ($p < 0,05$). MAP: meses após o plantio	39
Figura 9. Evolução do título viral no decorrer do tempo em oito cultivares de cana-de-açúcar calculada via RT-qPCR. MAP: meses após o plantio	42

Capítulo 3

- Figure 1.** Effect of sugarcane cultivars infected with ScYLV on the biological performance of *M. sacchari*. Mean \pm SE that share the same letter for each parameter are not significantly different ($p > 0.05$). Statistical comparisons between treatments for each parameter were done using the non-parametric Kruskal–Wallis test or parametric ANOVA/Fisher test (**A**, **B**, **C** and **D**)55
- Figure 2.** Biplot with dispersion of eight sugarcane cultivars regarding biological performance in the reproduction of wingless insects under no-choice conditions, analyzed seven days after release. Data submitted to exploratory multivariate principal component analysis (PCA)56
- Figure 3.** Dendrogram based on the Euclidean distance between eight sugarcane cultivars regarding the biological performance of wingless *M. sacchari* under no-choice conditions, analyzed seven days after release. Data submitted to multivariate exploratory cluster analysis using Ward's method57
- Figure 4.** Mean \pm SE of the number of waveform event per insect (NWEI) (**A**) and the total waveform duration per insect (WDI) (**B**) of the non-phloematic parameters of non-viruliferous *M. sacchari* on ScYLV-infected sugarcane cultivars during 8 h of recording. The columns and bars represent the means and the standard error of the mean for each variable, respectively. Statistical comparisons between treatments (in the same EPG parameter) were conducted by a Tukey test (for Gaussian variables) or Kruskal–Wallis test (for non-Gaussian variables). Means that share the same letter for each variable are not significantly different ($p > 0.05$). Waveform C: stylet pathway; np: non-probing and probe; F: mechanical disturbance during feeding58
- Figure 5.** Mean \pm SE of the number of waveform event per insect (NWEI) (**A**) and the total waveform duration per insect (WDI) (**B**) of the phloematic parameters of non-viruliferous *M. sacchari* on ScYLV-infected sugarcane cultivars during 8 h of recording. The columns and bars represent the means and the standard error of the mean for each variable, respectively. Statistical comparisons between treatments (in the same EPG parameter) were conducted with a non-parametric Kruskal–Wallis test. Means that share the same letter for each variable are not significantly different ($p > 0.05$). Waveform E1: phloem salivation; E2: phloem ingestion; and E2s: sustained phloem ingestion >10 min59

Capítulo 4

- Figura 1.** Casa de vegetação do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP em Piracicaba/SP, utilizada para os ensaios de preferência70
- Figura 2.** Ensaio de preferência do pulgão *M. sacchari*. A e C. Gaiolas de acrílico 30 x 30 x 30 cm posicionadas com a distribuição das plantas. B. Arena circular com as folhas de cada variedade dispostas sobre a plataforma. D. Plataforma de liberação dos insetos ápteros. E. Distribuição das folhas no interior da gaiola.....71

- Figura 3.** Efeito das cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre a preferência de *M. sacchari* ápteros em condições de livre escolha, avaliados aos 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação dos insetos. *Não apresentou diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Medidas Repetidas ao Tempo/Anova, ($p < 0,05$).73
- Figura 4.** Gráfico *biplot* com a dispersão de oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de ápteros de *M. sacchari* em condições de livre escolha, analisada ao longo do tempo de 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por componentes principais (CPs)75
- Figura 5.** Dendrograma baseado na distância euclidiana entre oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de ápteros de *M. sacchari* em condições de livre escolha, analisada ao longo do tempo de 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por agrupamentos pelo método de *Ward's*76
- APÊNDICE**
- Figura 1.** Curvas de temperatura de *melting* de 8 cultivares de cana-de-açúcar analisadas durante reações de RT-Qpcr90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

BOD - Demanda bioquímica do oxigênio

C - Onda com potencial extracelular

CR - Classe de resistência

cDNA - DNA complementar

cm - Centímetros

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento

CPs - Componentes principais

Ct - *Cycle threshold*

CTC - Centro de Tecnologia Canavieira

DBC - Delineamento em blocos casualizados

DC - Corrente contínua

DEPC - Dicarbonato de dietila

df - Grau de liberdade

E1 - Salivação e inoculação de vírus persistente

E2 - Ingestão floemática e aquisição de vírus persistente

EPG - *Electrical Penetration Graph* / Gráficos de Penetração Elétrica

F - Dificuldade estiletar

FaoStat - *Food and Agriculture Data*

g - Gramas

G - Ingestão dos vasos do xilema

h - Horas

ha - Hectares

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

kg - Quilograma

log - Logaritmo

MAP - Meses após o plantio

min - Minutos

ml - Mililitro

MPB - Mudas pré-brotadas

MR - Moderadamente resistente

MS - Moderadamente suscetível

NaCl - Cloreto de sódio

np - Não prova

NPK - Nitrogênio, fósforo e potássio

NWEI - Número total de uma determinada onda por inseto

pd - Picadas de prova

PPW - Proporção de indivíduos que fizeram uma determina onda

QR - Quantificação relativa

R - Resistente

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

RT-PCR - *Reverse transcriptase*-PCR

RT-qPCR - *Reverse transcriptase quantitative*-PCR

S - Suscetível

ScYLV - sugarcane yellow leaf virus

WDI - Duração total em minutos de uma determinada onda por inseto

X - Amostras não realizadas

X^2 - Qui-quadrado

YLS - *Yellow leaf syndrome*

°C - Grau Celsius

μL - Microlitro

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar está entre as grandes *commodities* presentes em todo o mundo, figurando entre as principais culturas de importância econômica do Brasil, destacando-se como matéria - prima na elaboração de açúcar, etanol e subprodutos, como álcool em gel 70% para higienização e prevenção de contaminações por patógenos, principalmente em períodos de pandemia de COVID-19. O Brasil se destaca como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, apresentando estimativa de produção para a safra 2021/2022 em 628,1 milhões de toneladas, seguido da Índia e China, com 376,9 e 151,5 milhões de toneladas, respectivamente (FaoStat, 2020). A safra 2021/2022 estima redução de 4% em relação à safra anterior, devendo chegar à produtividade média de 74,576 t ha⁻¹ (Conab, 2021).

A produtividade apresentada nos últimos anos pelos canaviais brasileiros é considerada baixa, tendo em vista o potencial genético que a cultura pode expressar, demandando assim novas pesquisas e melhorias no setor para que esse potencial seja alcançado. É indispensável o uso de novas tecnologias e ferramentas no desenvolvimento de cultivares, tornando-os adaptados a diferentes condições ambientais, altamente produtivos e resistentes às principais pragas e doenças. Nesse contexto, a aplicação de ferramentas moleculares e métodos de melhoramento genético de plantas são fundamentais para que o Brasil mantenha a competitividade, qualidade e a liderança mundial na produção agrícola.

Um dos grandes entraves no rendimento da produtividade é a incidência de doenças causadas por uma série de vírus (Xu et al., 2008). Dentre os vírus responsáveis por danos e perdas, destaca-se o sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) ou vírus do amarelinho, transmitido principalmente pelo afídeo vetor *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae) (Fartek et al., 2012; Garzo et al., 2020). Os sintomas característicos causados pelo ScYLV são o amarelecimento foliar, começando pela nervura central (Schenck et al., 1997), podendo apresentar coloração avermelhada (Cronje et al., 1998), encurtamento dos internódios (Comstock et al., 1998) e

acumulação de sacarose nas nervuras foliares (Gonçalves et al., 2005). Aliada a disseminação pelo uso de mudas e toletes infectados para o plantio, a presença do vetor *M. sacchari* em canaviais espalhados por todo país tem contribuído fortemente para a disseminação deste importante vírus.

Para a confirmação da infecção viral em plantas assintomáticas, existem vários métodos confiáveis e rápidos para um diagnóstico preciso do vírus, como imunoenaios enzimáticos como ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) e suas variantes (Schenck et al., 1997; Debibakas et al., 2014) e técnicas de RT-PCR (*Reverse transcriptase*-PCR) ou RT-qPCR (*Reverse transcriptase quantitative*-PCR) (Comstock et al., 1998; Gonçalves et al., 2002; Chinnaraja e Viswanathan, 2015).

O uso em conjunto entre a fenotipagem a campo e o diagnóstico preciso da doença, Fartek et al (2012) demonstraram padrões de resistência em uma cultivar de cana-de-açúcar quanto a infecção do ScYLV, expressando os mecanismos de antibiose e antixenose em ensaios de preferência e desempenho biológico com *M. sacchari*. Estudos envolvendo diferentes cultivares de cana-de-açúcar e o ciclo de vida dos vetores, são importantes para o avanço no conhecimento da transmissão de vírus. O ciclo reprodutivo e os efeitos repelentes ou de não-preferência do inseto vetor frente a variedades suscetíveis ou resistentes, provocam mudanças no comportamento alimentar do inseto. Segundo Salas (2010) o sucesso da transmissão de fitovírus está associado com as atividades estiletares e o comportamento alimentar do vetor.

Durante a interação vetor-planta, o inseto realiza sondagens (diversas picadas de prova) nas plantas, escolhendo a planta hospedeira mas adequada. Essa interação é tão complexa que diversos patógenos pode induzir mudanças fenotípicas e fisiológicas nas plantas, a tal ponto que plantas infectadas podem tornarem-se mais atrativas, aumentando o desempenho biológico dos insetos vetores e sua eficiência na transmissão do patógeno (Carmo-Sousa et al., 2016). Para que ocorra a transmissão dos fitovírus, os afídeos vetores inserem seus estiletos no interior dos tecidos da planta, atingem os vasos do xilema e floema, onde salivam e se alimentam, ocorrendo então a inoculação desses fitopatógenos. Tjallingii (1988), por meio da técnica de Gráficos de Penetração Elétrica - EPG (*Electrical Penetration Graph*), conseguiu descrever o comportamento estiletar dos afídeos, observando distintos padrões de ondas de EPG, originados por meio da variação de amplitude e frequência

dessas ondas. Esse estudo padronizou os diferentes padrões de ondas que caracterizam as diversas atividades estiletas realizadas pelos afídeos no interior da planta.

A técnica de EPG trouxe avanços nas pesquisas quanto ao comportamento alimentar de insetos sugadores, possibilitando estudos mais aprofundados das atividades estiletas desses insetos, entendendo um pouco mais a relação entre os fitopatógenos e seus vetores (Prado e Tjallingii 1994). Por meio desta técnica, elucidam-se os diferentes aspectos da interação planta-vírus-vetor, avaliando e caracterizando graus de resistência em plantas hospedeiras ao inseto vetor (Sun et al., 2018), contribui nas investigações do modo de ação dos inseticidas nas pragas alvo (Carmo-Sousa et al., 2020) e avalia os mecanismos de transmissão de fitopatógenos pelos vetores nos hospedeiros (Feres et al., 2009; Jiménez et al., 2020).

A identificação e caracterização dos fitopatógenos, são ferramentas básicas para melhoristas, fitopatologistas e outros pesquisadores na seleção de fontes de resistência, além de agregar informações vitais em estudos epidemiológicos e no planejamento de estratégias de controle.

Mediante o exposto, o objetivo do presente estudo foi compreender melhor as interações existentes entre o patossistema ScYLV - cana-de-açúcar - *M. sacchari*, avaliar e caracterizar oito cultivares de cana-de-açúcar, visando identificar potenciais níveis de resistência nessas cultivares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da cana-de-açúcar e seu melhoramento genético

A cana-de-açúcar, conhecida e cultivada em todo o mundo, é uma cultura semi-perene, alógama, pertencente à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*, com grande capacidade de armazenamento de sacarose em seus colmos (Matsuoka et al., 2005), sendo de extrema importância nos setores comerciais e industriais, pelo volume de

produção e de seus subprodutos. O continente asiático é o centro de origem da cultura, tendo como principais espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Essa gramínea apresenta alto potencial de rebrota em campo, podendo ser facilmente propagada vegetativamente por meio das gemas presentes nos entrenós. Suas raízes são fasciculadas, com folhas lanceoladas e alternadas entre os nós dos colmos, flores hermafroditas e sua inflorescência é caracterizada pela categoria de panícula ramificada (Jadoski et al., 2010). Seu longo ciclo vegetativo é característico, compreendendo desde a brotação e emergência, perfilhamento, desenvolvimento e estruturação de colmos até a fase de maturação, responsável pelo acúmulo de açúcar na planta (Diola e Santos, 2010).

O Brasil é líder mundial no cultivo e produção de cana-de-açúcar e segundo a Companhia Nacional de Abastecimento, Conab (2021), no primeiro levantamento de monitoramento agrícola para a cultura na safra 2021/2022, a área colhida está estimada em 8,422 milhões de hectares. Na totalidade de produção estimada, o açúcar deverá atingir 38,9 milhões de toneladas, apontando redução de 5,7% em relação à última safra. A produção total de etanol também reduziu em 9,14% e tem estimativas de produção em 27 bilhões de litros.

Em termos regionais, o Brasil apresenta dois períodos distintos de safras, sendo que de setembro a março a colheita acontece nas regiões Norte e Nordeste, e de abril a novembro na região Centro-Sul. Dessa forma, o país atinge o potencial de cultivo e produção durante o ano todo, apesar da região Norte-Nordeste representar apenas 8% (53,3 milhões de toneladas em 893 mil hectares do total nacional). Os outros 92% de toda produção nacional é representada pela região Centro-Sul, estimada em 574,8 milhões de toneladas em 7.531 mil hectares para a safra 2021/2022, destacando-se os estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais, com estimativas de produção em torno de 326,7; 73,3 e 71,3 milhões de toneladas, respectivamente (Conab, 2021).

A produtividade média brasileira de cana-de-açúcar, para a atual safra, é estimada em 74.576 t ha⁻¹ (Conab, 2021), expressivamente menor comparado a outros países produtores, como Peru (121.830 t ha⁻¹), Guatemala (118.460 t ha⁻¹), Egito (111.330 t ha⁻¹), EUA (86.070 t ha⁻¹) (FaoStat, 2020).

A introdução da cana-de-açúcar em território brasileiro iniciou-se na região

Nordeste, no período de colonização dos portugueses, sendo posteriormente levada aos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Apenas no início do século XX houve o estabelecimento e estruturação de programas de melhoramento genético voltado a cana-de-açúcar, neste período com foco em hibridações, avaliação e seleção de genótipos promissores (Figueiredo et al., 2011). Atualmente, diferentes instituições no país como o Centro de Cana de Ribeirão Preto/SP pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, o Centro de Tecnologia Canavieira - CTC em Piracicaba/SP e a Ridesa Brasil permanecem atuantes em pesquisa envolvendo o melhoramento da cultura, com objetivos comuns na formação de populações heterogêneas cada vez mais produtivas, resistentes a patógenos, ao déficit hídrico, entre outras características de importância agrônoma. Para tal, em muitas ocasiões é necessária a importação de genótipos promissores e é importante a difusão de novas tecnologias para a cana-de-açúcar (Landell e Bressiani, 2010).

Atualmente, as cultivares plantadas no Brasil e no mundo são consideradas híbridos de *Saccharum officinarum* com outras espécies do gênero *Saccharum* (Araldi et al., 2010).

No momento atual, esforços para ampliação da base genética da cana-de-açúcar são dedicados em programas de melhoramento, como o processo de hibridações e trabalhos focando o pré melhoramento da cultura, pois a diminuição do ganho genético vem acontecendo ao longo dos anos (Natarajan et al., 2019). Até que seja validada e disponibilizada uma nova cultivar ao mercado final, todo o processo é lento e demanda muitos anos de dedicação e trabalho no melhoramento, podendo chegar em até 15 anos para se obter uma cultivar superior, advindo de alto número de genótipos envolvidos, demandando mão-de-obra especializada e alto investimento financeiro (Costa et al., 2020).

O aumento de produtividade é heterogêneo entre canaviais brasileiros, frente a diversos fatores climáticos, nutrição, solo, doenças e escolha de cultivares, porém, o potencial genético produtivo da cultura pode ser expresso fortemente. Segundo Yadav et al. (2020), nos últimos dez anos o ganho genético estagnou para as principais características-chave da cana-de-açúcar, assim como sua produção. Por outro lado, o avanço significativo é notável através de programas de melhoramento genético para resistência as suas principais doenças.

Torna-se indispensável a rápida incorporação de novas cultivares e tecnologias, buscando atender a demanda crescente do setor produtivo. O melhoramento genético de plantas é peça fundamental para o aumento de produtividade de canaviais brasileiros, mantendo a competitividade do mercado e a liderança mundial na produção dessa matéria-prima.

2.2 Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) e o afídeo vetor *Melanaphis sacchari*

Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) ou vírus do amarelinho da cana-de-açúcar, pertence ao gênero *Polerovirus* e à família *Luteoviridae*. Seu modo de transmissão pelo inseto vetor é classificado como persistente, circulativo e não propagativo (Lehrer et al., 2007). É transmitido pelas espécies de afídeos vetores *Ceratovacuna lanigera*, *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis* e *Rhopalosiphum rufiabdominalis* (Hemiptera, Aphididae) (Scagliusi e Lockhart, 2000; Zhou et al., 2006). O vetor mais importante é o *M. sacchari*, dada à sua alta eficiência na transmissão de ScYLV (Schenck e Lehrer, 2000; Chinnaraja e Viswanathan, 2015).

Segundo Singh et al. (2004), *M. sacchari* tem potencial de se alimentar e colonizar onze espécies de *Poaceae* e dois gêneros de plantas da família *Araceae*. Seus hospedeiros primários são a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e o sorgo (*Sorghum bicolor*) (Bowling et al., 2016), mas com relatos de colonização em trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), aveia (*Avena sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Schenck e Lehrer 2000; EISayed, 2013; Nibouche et al., 2021).

O ciclo médio de vida do *M. sacchari* pode chegar até trinta dias, as fêmeas adultas em formas ápteras ou aladas se reproduzem de forma rápida por meio de partenogênese. Podem produzir mais de oitenta ninfas ao longo de seu ciclo de vida e passam por 4 instares antes de chegar à fase adulta. Os adultos apresentam coloração verde-amarelada e tamanho entre 1,5-2,0 mm de comprimento (Blackman e Eastop, 2007).

A aquisição do ScYLV por *M. sacchari* acontece quando o inseto insere seus estiletos nos vasos do floema, adquirindo o vírus por meio da alimentação sustentada nesse tecido. O vírus ao adentrar pelo aparelho bucal do inseto passa pelo intestino

do mesmo, posteriormente as partículas virais se translocam para a hemocele, se acumulam nas glândulas salivares, e por fim, ocorre a inoculação, por meio da salivagem nos tecidos floemáticos durante a alimentação em novas plantas (Garret et al., 1996; Gray et al., 2014).

A partir do momento em que as partículas virais são inoculadas por vetores em plantas saudáveis, o vírus se replica e se move por todas as células através dos plasmodesmas, produzindo sintomas foliares devido ao acúmulo de partículas virais no interior dos vasos do floema que obstrui a passagem de fotoassimilados nas plantas (Holkar et al., 2020).

Historicamente, o amarelinho está entre as doenças da cana-de-açúcar mais importantes do mundo, causando epidemias em diversos países produtores e conseqüentemente grandes perdas. No ano de 1988 no estado do Hawaii (EUA) foi registrado a primeira identificação com sintomas do amarelinho em plantações de cana-de-açúcar (Schenck et al., 1997). O amarelecimento foliar é o sintoma característico da infecção pelo ScYLV, iniciando-se pela face abaxial da nervura central e, enquanto a face adaxial da nervura apresenta coloração avermelhada (Cronje et al., 1998), colmos com encurtamento dos internódios (Comstock et al., 1998) e acúmulo de sacarose no floema (Gonçalves et al., 2005). Por outro lado, uma enorme gama de cultivares comerciais não expressam nitidamente os sintomas visuais da infecção, dificultando o avanço de estudos sobre a doença e tomadas de decisão durante o cultivo de canaviais, sendo indispensável o uso de ferramentas moleculares ou serológicas para diagnóstico do ScYLV.

O ScYLV foi responsável por drásticas perdas econômicas nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil em meados da década de 1990, gerando grande preocupação para os produtores (Gonçalves et al., 2012) e hoje é uma doença endêmica nos principais países produtores em todo mundo (Gonçalves, 2008). As perdas podem atingir de 20 a 60% em cultivares suscetíveis (Zhu et al., 2010; Ramouthar et al., 2013; Boukari et al., 2019) e redução de até 14% na produção de açúcar (Grisham et al., 2009). Viswanathan et al. (2008, 2014) descreveu efeitos significativos em decorrência da infecção do amarelinho, afetando 10% o crescimento, 15% o diâmetro e 28% no peso de colmos da cana, ainda reduções de 10% no teor

de clorofila e 24% a taxa fotossintética, além de redução no acúmulo de sacarose e no brix.

Trabalhos de fenotipagem de plantas infectadas com vírus é de difícil realização, devido a demora na expressão de sintomas nas plantas. A maioria das variedades de cana-de-açúcar infectadas com o ScYLV não expressam sintomas fenotípicos em campo (Chinnaraja et al., 2014; Chinnaraja e Viswanathan, 2017). Frente as dificuldades para identificar plantas infectadas, e diagnósticos precisos da doença, testes serológicos e moleculares podem se constituir em ferramentas fundamentais, complementando as informações quanto a quantificação, incidência e severidade do vírus. Reações de RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR) ou RT-qPCR (Reverse transcriptase quantitative-PCR) foram padronizados para a detecção do ScYLV em plantas assintomáticas de cana-de-açúcar (Gonçalves et al., 2002, Korimbocus et al., 2002; Chinnaraja e Viswanathan, 2017; Sharma et al., 2017).

Durante avaliações de plantas de cana-de-açúcar, em estádios fenológicos iniciais não se encontraram manifestações de sintomas característicos da infecção pelo ScYLV, dificultando a sua identificação, sendo que a concentração viral é maior em folhas jovens quando comparadas com folhas velhas (Cronje et al., 1998).

Viswanathan et al. (2017) descrevem que um maior espaçamento entre linhas e o plantio precoce podem aliviar o impacto causado pelo amarelinho, evitando-se o uso de cultivares suscetíveis e a propagação vegetativa de uma única cultivar. Além de pesticidas utilizados para o controle de insetos vetores, a tecnologia de sensoriamento remoto tem sido aplicada no monitoramento e identificação de campos sintomáticos com a doença (Palaniswami et al., 2014; Viswanathan et al., 2017).

De acordo com Fartek et al. (2012), o avanço dos estudos na expressão fenotípica de interações entre ScYLV x *M. sacchari* x planta, incorporando aspectos epidemiológicos e fisiológicos haverá grande contribuição à seleção e identificação de genótipos de cana-de-açúcar com resistência durável ao vetor, consequentemente com menor porcentagem de plantas infectadas pelo vírus. Por consequência contribuindo com o manejo do ScYLV em regiões produtoras e reduzindo o impacto econômico na cultura.

Com o avanço das pesquisas sobre as relações existentes entre os vírus e seus vetores no processo de transmissão, muitas questões foram elucidadas sobre essas

relações. Nas inter-relações existentes entre *M. sacchari* – ScYLV – cana-de-açúcar, o processo de transmissão do fitopatógeno e os níveis de resistência existentes nas plantas, foi avaliado neste presente estudo. Buscou-se elucidar e correlacionar os resultados obtidos nos diferentes ensaios, que possibilitaram identificar mudanças no desempenho biológico e preferência do inseto vetor, quantificação viral e fenotipagem de plantas em campo, além do estudo de monitoramento do comportamento alimentar de *M. sacchari* por meio da técnica de EPG. Essas ferramentas de avaliação frente a esse patossistema, contribuem diretamente para os programas de melhoramento da cana-de-açúcar.

2.3 Mecanismos de resistência de plantas a insetos

Uma das principais barreiras encontradas para o aumento de produtividade em campo é a grande incidência de pragas e doenças, as quais são responsáveis por grandes prejuízos na produção agrícola e perdas econômicas expressivas. Insetos vetores da ordem Hemiptera são responsáveis por mais de 70% das transmissões de vírus em plantas (Feres et al., 2015). O vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar (ScYLV) é transmitido principalmente pelo afídeo vetor *M. sacchari*, e chega a causar perdas de até 60% da produção da cultura da cana-de-açúcar (Ramouthar et al., 2013).

Segundo Fartek et al. (2012), dentre as principais formas de contenção do amarelinho em lavouras de cana-de-açúcar é o uso de cultivares resistentes, com material propagativo sadio, monitoramento e controle de insetos vetores. Os autores ainda citam a importância de estudos sobre as relações planta-vetor, buscando melhor compreender suas inter-relações. Peña et al. (2018) também descrevem a importância de conhecer a biologia do inseto vetor, permitindo identificar sua preferência pelo hospedeiro, taxas de crescimento e desenvolvimento populacional.

Os danos diretos ocasionados pela alimentação prolongada dos afídeos, tanto na fase imatura (ninfas) como na fase adulta, refletem toda folhagem da planta (Senasica, 2014). Durante a alimentação, seu aparelho bucal é inserido nas células da planta até entrarem em contato com o floema, onde permanecem se alimentando

por longos períodos (Tjallingii, 2006). Para suplantar, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos de defesa e resistência (Tetreault et al., 2019). Contudo, os danos indiretos na cultura são mais graves e preocupantes, pois em altos níveis de infestação há grande liberação de excreção açucarada pelo inseto decorrente da alimentação, inviabilizando a respiração das plantas, reduzindo a fotossíntese e favorecendo o crescimento de fungos como *Capnodium* sp. responsável pela fumagina (Bowling et al., 2016). Além disso, muitos afídeos, como *M. sacchari*, são vetores de diversas espécies de vírus.

Os mecanismos utilizados pelas plantas para se defenderem da herbivoria dos insetos são classificados em três categorias: antixenose, antibiose e a tolerância (Tetreault et al., 2019), podendo ser em forma de substâncias atrativas ou repelentes (Webster et al., 2008; Sun et al., 2018). A antixenose, ou não preferência como também é conhecida, é descrita por Painter (1951) como uma alternativa do hospedeiro para se livrar da infestação dos insetos, impedindo o processo de alimentação da praga.

No que lhe concerne, a antibiose interfere na fisiologia e biologia dos insetos, afetando negativamente o crescimento, longevidade, fecundidade e sobrevivência de toda a população (Painter, 1951; Lara, 1991). A tolerância apresenta fatores importantes para minimizar os impactos gerados pelo comportamento alimentar e reprodução dos insetos, permitindo que a planta suporte a infestação com mais danos sem perder a produção em relação a outra mais suscetível (Panda e Khush, 1995; Koch et al., 2016). Os mecanismos de defesa das plantas são importantes de serem estudados, pois contribuem na redução da capacidade de multiplicação e sobrevivência da população de insetos, permitindo às plantas um bom desenvolvimento (Paudyal et al., 2019).

As reações de defesa das plantas contra a infestação e danos causados por afídeos são respostas por meio da biossíntese de glicosídeos, alcaloides, benzoxazinóides, flavonoides e fenóis, produtos do metabolismo secundário e identificados pelos insetos como substâncias tóxicas, impossibilitando a sua alimentação e conseqüentemente reduzindo a sua população (Betsiashvili et al., 2015).

A busca para compreender as diferentes maneiras que as plantas suscetíveis

e resistentes respondem ao ataque de afídeos, e como esses insetos respondem a essas plantas, podem contribuir na tomada de decisão e avanço às pesquisas para o controle da disseminação de fitopatógenos para as plantas.

2.4 Técnica de gráficos de penetração elétrica - *Electrical Penetration Graph* (EPG)

Os insetos, principalmente da ordem Hemiptera, são considerados excelentes vetores de fitopatógenos em diversas espécies de plantas, podendo causar grandes problemas econômicos em um curto período (Kindlmann et al., 2007). Isso inclui o sugarcane yellow leaf virus, transmitido com alta eficiência pelo afídeo vetor *M. sacchari* em plantas de cana-de-açúcar (Fartek et al., 2012), gerando desafios diários no controle populacional e disseminação do vírus.

O aparelho bucal dos afídeos é em forma de estilete, o que proporciona uma alimentação altamente especializada (picador-succionador), e é formado por dois estiletos e dois canais (alimentar e salivar), os quais se unem na porção distal do estilete, formando o canal único. Os estiletos penetram nos diferentes tecidos da planta até encontrarem o local ideal para sua alimentação, podendo ser os vasos do floema ou do xilema, para a ingestão de seiva bruta ou elaborada (Tjallingii, 2006). Esse comportamento alimentar específico dos afídeos, além de possibilitar a ativação dos mecanismos de defesa e resistência das plantas como antibiose, antixenose e tolerância (Tetreault et al., 2019), contribui ativamente na aquisição e inoculação de partículas virais, proporcionando uma alimentação mais sustentada realizada pelo inseto (Garzo et al., 2020; Jiménez et al., 2020).

As inter-relações existentes no patossistema planta-vírus-vetor, apontam diferentes fatores que influenciam a escolha da planta pelo afídeo (Tjallingii, 2006; Sun et al., 2018). Características morfológicas localizadas na superfície da folha ou semioquímicos atrativos, repelentes (Webster et al., 2008; Sun et al., 2018), permitem reduzir a alimentação no floema, devido ao baixo índice nutricional (Akbar et al., 2014). Para se estudar ao nível intracelular, e avaliar as interações que possam ocorrer no patossistema planta-vírus-vetor, o uso da técnica de gráficos de penetração elétrica

(EPG) é fundamental. Isso é alcançado avaliando o comportamento alimentar de pulgões por meio do monitoramento em tempo real através de dispositivos eletrônicos como o EPG (Ferreres e Moreno, 2009).

Inicialmente, a técnica de EPG foi desenvolvida por McLean e Kinsey (1964), que permitia estudar as atividades estiletares dos afídeos por meio dos registros em tempo real das ondas de origem elétrica, aplicando uma voltagem de corrente alternada (AC). Posteriormente, a técnica foi aprimorada e a corrente alternada aplicada anteriormente foi substituída pela corrente contínua (sistema DC), onde o inseto e a planta fazem parte de um circuito elétrico fechado (Tjallingii, 1985). Esse sistema, além de identificar as mudanças na resistência elétrica na planta e no inseto, consegue medir as mudanças que ocorrem nas forças eletromotrizes, originadas pelo comportamento estiletar dos insetos nos diferentes tecidos vegetais em que os estiletos se encontram. A eficiência e a capacidade do equipamento trazem informações mais precisas e relevantes sobre o monitoramento do inseto e as posições estiletares no interior das células da planta (Tjallingii, 1985, 1988).

A planta é conectada ao sistema por um eletrodo de cobre de baixa voltagem, e na outra extremidade do circuito outro eletrodo de cobre é ligado na região dorsal do protórax do inseto, mediante a um filamento de ouro e uma gota de cola de prata condutora de eletricidade. Dessa forma, quando o inseto insere seus estiletos no interior dos tecidos da planta, o circuito elétrico é fechado, e assim é possível monitorar em tempo real as diferentes formas de ondas. A posição dos estiletos do inseto então é monitorada, e é possível visualizar o momento da penetração intercelular e intracelular, identificando em qual tecido vegetal estão sendo perfuradas pelos estiletos (Tjallingii, 1985; Backus, 2009).

As formas de ondas monitoradas e descritas por meio do EPG, revelam diferentes atividades estiletares dos insetos, como salivação e ingestão de seiva elaborada ou bruta, trabalho mecânico dos estiletos durante a penetração celular, dificuldades estiletares que possam ocorrer durante a alimentação e picadas de prova realizadas pelos insetos (Tjallingii, 2006).

Ondas de EPG específicas de afídeos foram caracterizadas por Tjallingii (1978, 1985; 1988), van Helden e Tjallingii (2000), e correlacionadas com a posição real dos estiletos do inseto no interior do tecido vegetal da planta, assim descritas (Figura 1).

- **(Onda C):** caracterizada pelo trabalho mecânico dos estiletes intercelularmente, originada pela soma de um conjunto de atividades desenvolvidas pelos estiletes com potencial extracelular, buscando constantemente tecidos vasculares entre a epiderme e os vasos do floema e xilema da planta.
- **(Onda *pd*):** “*potential drop*”, estabelecida como as picadas de prova do inseto, e associada com a penetração dos estiletes no interior da célula (intracelular) causando queda de potencial. Onda relacionada com a transmissão de vírus não persistentes.
- **(Onda E1):** “fase floemática - salivação no floema”, os estiletes do inseto atingem os vasos floemáticos da planta e inicia-se o processo de salivação e está relacionado com a inoculação dos vírus persistentes.
- **(Onda E2):** “fase floemática - ingestão de seiva do floema”, após o inseto salivar nos vasos do floema, inicia-se o processo de ingestão floemática, estando relacionado com aquisição de vírus persistentes.
- **(Onda F):** “dificuldade estiletar”, descrita como dificuldade mecânica dos estiletes do inseto durante a penetração nos tecidos da planta.
- **(Onda G):** “xilema”, quando ocorre a penetração dos estiletes nos vasos do xilema e inicia-se a ingestão ativa do conteúdo xilemático.
- **(Onda *np*):** “*no probe*” ou não prova, ocorre quando o inseto mantém seus estiletes fora dos tecidos da planta, sem nenhuma atividade estiletar.

O tempo de um registro EPG realizado para avaliar o comportamento alimentar dos insetos, depende da interação entre a planta-inseto estudados e das observações a serem feitas. Os registros EPG podem ser feitos de diferentes formas e em diferentes partes da planta, sendo usados para avaliar a resistência de plantas à artrópodes por antixenose, transmissão de fitopatógenos, estudos com plantas transgênicas, efeito da ação de inseticidas, entre outros. van Helden e Tjallingii (1993) fizeram registros EPG de 16 horas com afídeos e concluíram que 8 horas de registro foram suficientes para avaliar de forma eficaz as atividades estiletas do inseto, desde que em condições adequadas e controladas de ambiente e calibração do equipamento.

Para executar os registros EPG, armazenar os dados e posterior análise das ondas EPG, foi desenvolvido o “software” Stylet+ (EPGsystems, Wageningen, Holanda) (Febvay et al., 1996) que permitiu avaliar de forma precisa as atividades estiletares de insetos sugadores.

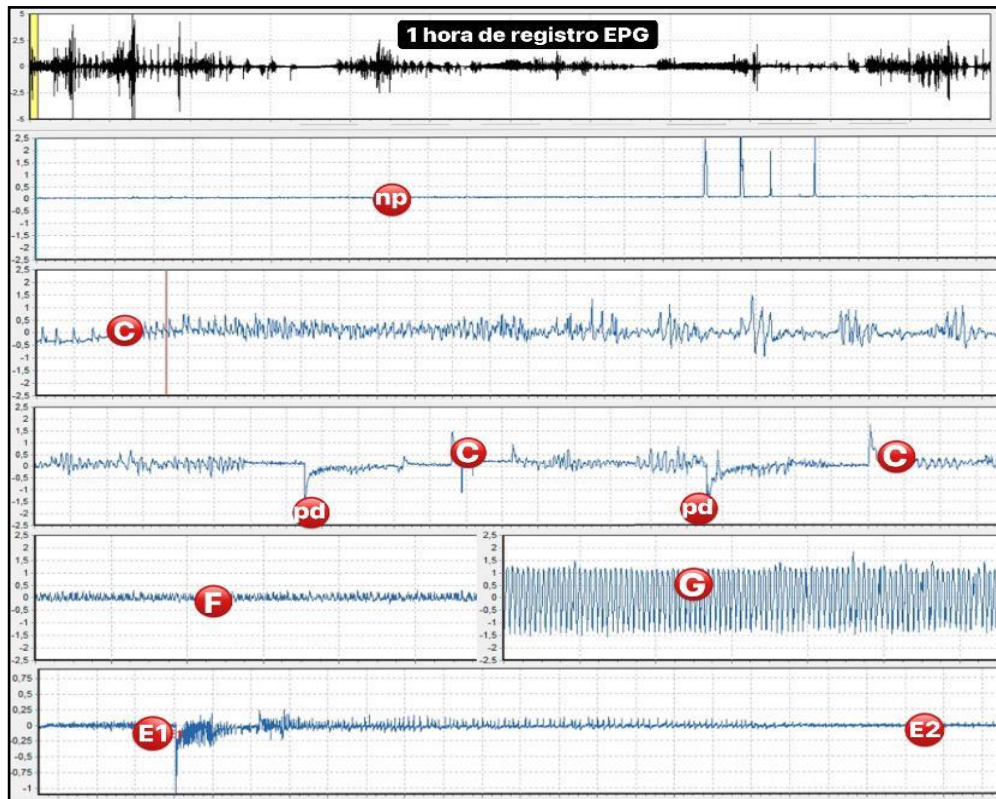


Figura 1. Gráficos de penetração Elétrica (EPG). Diferentes padrões de ondas de EPG de afídeos. Fonte: próprio autor.

Backus et al. (2007) descreveram parâmetros específicos para cálculo e interpretação dos registros EPG (ondas de EPG), os quais foram aplicados nessa pesquisa, dividindo-os em grupos caracterizados como NWEI: número total de uma determinada onda por inseto; WDI: duração total (min) de uma determinada onda por inseto; WDE: extensão de uma determinada onda por evento e PPW: proporção de indivíduos que fizeram uma determinada onda.

O EPG tem se destacado no avanço de pesquisas quanto ao comportamento alimentar de insetos vetores e sua associação com a transmissão viral, oferecendo uma análise mais detalhada das atividades estiletares (Salas et al., 2010). A técnica tem sido usada em diversas pesquisas, com excelente eficiência nos estudos de

interação planta-patógeno-vetor, investigações do modo de ação dos inseticidas, incorporando a caracterização da resistência de plantas hospedeiras ao inseto e dos mecanismos de transmissão de fitopatógenos por insetos vetores (Alvarez et al., 2006; Fereres et al., 2009; Sun et al., 2018; Carmo-Sousa et al., 2016, 2020; Jiménez et al., 2020; Maluta et al., 2021).

2.5 Mecanismos de resistência de plantas a vírus

Nas últimas décadas, tornou-se claro que as plantas possuem um sistema de defesa complexo, composto de múltiplos níveis que lhes permite evitar, inibir ou defender-se ativamente contra patógenos, como fungos, bactérias, nematoides e vírus. De modo geral, a gama de hospedeiros (naturais) da maioria dos vírus é limitada (McLeish et al., 2019). Nessas plantas que atuam como hospedeiros, os vírus encontram diferentes mecanismos de defesa. Alguns deles têm um efeito universal sobre todos os vírus e esta resposta é parte do sistema imunológico inato (Soosaar et al., 2005), enquanto outros são específicos para o vírus e envolvem genes de resistência (Martin et al., 2003). As substâncias virais que estimulam a imunidade inata, como por exemplo os RNAs dupla fita (dsRNAs), são denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP).

O silenciamento do “RNA” é um mecanismo primário, fundamental e evolutivamente conservado de resposta à infecção por patógenos virais (Li et al., 2019). O silenciamento de “RNA” é baseado na produção de pequenos “RNAs” que direcionam o mecanismo de silenciamento para ácidos nucleicos complementares para o silenciamento de genes transcricionais (TGS) ou de genes pós-transcricionais (PTGS) (de Alba et al., 2013). O TGS causa a metilação e inibição transcricional do “DNA” alvo, enquanto o PTGS trabalha cortando o “RNA” alvo em pequenos tamanhos ou inibindo a sua tradução. As proteínas vegetais do tipo Dicer (DCL) reconhecem estruturas de “dsRNA” e as processam em pequenos duplexs de “RNA” de 21-25 nucleotídeos (Borges et al., 2015). Uma das pequenas cadeias de “RNA”, a cadeia guia, é carregada no complexo silenciador induzido por “RNA” (RISC)

ou no complexo silenciador induzido por transcrição de “RNA” (RITS) contendo a proteína Argonauta (AGO), e orienta estes complexos para direcionar os métodos de sequência específica de ácidos nucleicos para PTGS ou TGS, respectivamente (Sheu-Gruttadauria et al., 2017).

Por sua vez, o ácido salicílico (SA) é uma molécula sinalizadora crucial nas plantas que controla as respostas defensivas relacionadas tanto à imunidade inata basal quanto à imunidade induzível mediada por genes R antivirais dominantes (Mandadi et al., 2013; Carr et al., 2019). A presença de dsRNAs (RNA de dupla cadeia) intracelulares para desencadear a resposta PTI (Imunidade ativada por PAMP) foi comprovada nas plantas no caso de infecção viral, independentemente do caminho de silenciamento do RNA (Niehl et al., 2016). O PTI provoca o acúmulo de SA e dispara uma cadeia de eventos que incluem um colapso oxidativo, ativação de kinases ativadas por mitógenos e aumento da expressão dos genes de defesa (Bigeard et al., 2015).

A defesa acionada por efetores (ETI) é a segunda linha de respostas defensivas mediadas pelo SA. Os receptores intracelulares vegetais, codificados pelos genes R dominantes, devem reconhecer proteínas patogênicas avirulentas, também conhecidas como efetores, para que o ETI ocorra (Jones e Dangl, 2006). A natureza da resposta defensiva ETI é semelhante à do PTI, mas é mais acentuada. ETI é comumente ligada a uma reação hipersensível local (HR) que resulta na morte rápida das células impedindo a infecção sistêmica e na produção de lesões necróticas aparentes nas folhas inoculadas, bem como o estabelecimento posterior de resistência sistêmica adquirida (Gouveia et al., 2017).

Alguns genes R dominantes conhecidos não codificam proteínas com sequências NB-LRR (proteínas com repetições ricas em leucina de ligação a nucleotídeos) e não produzem respostas defensivas do tipo ETI (Gouveia et al., 2017). Esses genes R previnem a infecção viral de várias maneiras. Uma proteína produzida pelo gene *Tm-1* do tomate, por exemplo, liga-se às proteínas de replicação do TMV (vírus do mosaico do tomate) e suprime a replicação viral do RNA (Ishibashi e Ishikawa, 2014).

Em programas de melhoramento de cana-de-açúcar, a classe de resistência ao ScYLV é avaliada pelo fenótipo das plantas de cada cultivar (Gonçalves et al., 2012).

Utilizando uma escala de notas de 0 a 5, quanto severidade de sintomas do vírus, Kumar et al. (2020) avaliaram em campo 189 genótipos de cana-de-açúcar, onde 95 deles foram classificados entre moderadamente suscetível e suscetível e 94 mostraram-se resistentes ao vírus. Esses e outros avanços nas pesquisas com o ScYLV e o vetor *M. sacchari* estabelecem bases para o aprimoramento, desenvolvimento e avanço de cultivares de cana-de-açúcar resistentes ao vírus e ao seu vetor.

3. REFERÊNCIAS

Alvarez AE, Tjallingii WF, Garzo E, Vleeshouwers V, Dicke M, Vosman B (2006) Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 121(2):145-157.

Akbar W, Showler AT, Reagan TE, Davis JA, Beuzelin JM (2014) Feeding by sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari*, on sugarcane cultivars with differential susceptibility and potential mechanism of resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 150:32-44.

Araldi R, Silva FML, Ono EO, Rodrigues JD (2010) Flowering in sugarcane. **Ciência Rural** 40(3):694-702.

Backus EA, Cline AR, Ellerseick MR, Serrano MS (2007) *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: new methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. **Annals of the Entomological Society of America** 100(2):296-310.

Backus EA, Bennett WH (2009) The AC-DC correlation monitor: new EPG design with flexible input resistors to detect both R and emf components for any piercing-sucking hemipteran. **Journal of Insect Physiology**, 55(10):869-884.

Bigeard J, Colcombet J, Hirt H (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, 8(4):521-539.

Betsiashvili M, Ahern KR, Jander G (2015) Additive effects of two quantitative trait loci that confer *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid) resistance in maize inbred line Mo17. **Journal of Experimental Botany** 66:571-578.

Boukari W, Kaye C, Wei C, Hincapie M, LaBorde C, Irely M, Rott P (2019) Field infection of virus-free sugarcane by sugarcane yellow leaf virus and effect of yellow leaf on

sugarcane grown on organic and on mineral soils in Florida. **Plant Disease** 103(9):2367-2373.

Borges F, Martienssen RA (2015). The expanding world of small RNAs in plants. **Nature Reviews Molecular cell biology**, 16(12):727-741.

Bowling RD, Brewer MJ et al. (2016) Sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae): a new pest on sorghum in North America. **Journal of Integrated Pest Management** 7:12.

Bowling RD, Brewer MJ, Kerns DL, Gordy J, Seiter N, Elliott NE, Buntin GD, Way MO, Royer TA, Biles S, Maxson E (2016) Sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae): a new pest on sorghum in North America. **Journal of Integrated Pest Management** 7:1-12.

Blackman RL, Eastop VF (2007) Taxonomic issues. **Aphids as crop pests** 1:1-29.

Carmo-Sousa M, Moreno A, Plaza M, Garzo E, Fereres A (2016) *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. **Annals of Applied Biology** 169:284-297.

Carr JP, Murphy AM, Tungadi T, Yoon JY (2019). Plant defense signals: Players and pawns in plant-virus-vector interactions. **Plant Science**, 279:87-95.

Carmo-Sousa M, García RB, Wulff NA, Fereres A, Pedreira Miranda M (2020) Drench application of systemic insecticides disrupts probing behaviour of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Insects** 1:314.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2021) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Safra 2021/22 - Primeiro levantamento. Brasília:Conab, 56 p.

Costa L, Nunes L, Ampatzidis Y (2020) A new visible band index (vNDVI) for estimating NDVI values on RGB images utilizing genetic algorithms. **Computers and Electronics in Agriculture** 172:105-334.

Comstock JC, Irey MS, Lockhart BEL, Wang ZK (1998) Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. **Sugar Cane** 4:21-24.

Cronje CPR, Bailey RA, McFarlane K (1998) Update on the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal agent. **Sasta - South African Sugar Technologists Association** 72:81-84.

Chinnaraja C, Viswanathan R, Sathyabhama M, Parameswari B, Bagyalakshmi K, Malathi P, Neelamathi D (2014) Quantification of sugarcane yellow leaf virus in Quantificativo vitro plantlets and asymptomatic plants of sugarcane by RT-qPCR. **Current Science** 106:729-734.

Chinnaraja C, Viswanathan R (2015) Quantification of sugarcane yellow leaf virus in sugarcane following transmission through aphid vector *Melanaphis sacchari*. **Virus Disease** 26(4):237-242.

Chinnaraja C, Viswanathan R (2017) **Sugarcane yellow leaf virus and its impact in sugarcane**. [Sl.]: Lambert Academic Publishing, 288 p.

Debibakas S, Rocher S, Garsmeur O, Toubi L, Roques D, D'Hont A, Hoarau JY, Daugrois JH (2014) Prospecting sugarcane resistance to sugarcane yellow leaf virus by genome-wide association. **Theoretical and Applied Genetics** 127(8):1719-1732.

de Alba AEM, Elvira-Matelot, E, Vaucheret H (2013). Gene silencing in plants: a diversity of pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, 1829(12):1300-1308.

Diola V, Santos F (2010). Fisiologia. In: Santos F, Borém A, Caldas C (Eds.) **Cana-de-açúcar: Bioenergia, açúcar e álcool - Tecnologias e perspectivas**. Viçosa: UFV, 577 p.

EISayed A (2013) Maize (*Zea mays* L.) constitutes a novel host to sugarcane yellow leaf virus. **Canadian Journal of Plant Pathology** 35:68-74.

Fartek B, Nibouche S, Turpin P, Costet, Reynaud B (2012) Resistance to *M. sacchari* in the sugarcane cultivar R 365. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 144(3):270-278.

FaoStat - Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (2020). Sugarcane area, production and yield. Rome: FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/# data/QC>. Acesso em: 01 set. 2021.

Febvay G, Rahbé Y, Van Helden, M (1996) MacStylet, a Macintosh software to analyse EPG (*Electrical Penetration Graph*). **Entomologia Experimentalis et Applicata** 80:105-108.

Fereres A, Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. **Virus Research** 141:158-168.

Fereres A, Raccah B (2015) Plant Virus Transmission by Insects. **eLS**, 1:12.

Figueiredo P, Landell MGA, Campana MP, Scarpari MS, Xavier MA, Anjos IA (2011) O Instituto Agrônomo (IAC) e fatos históricos relacionados ao desenvolvimento da cultura de cana-de-açúcar até o fim do século XX. Campinas: IAC, 47p.

Garret A, Kerlan C, Thomas D (1996) Ultrastructural study of acquisition and retention of *Potato leafroll luteovirus* in the alimentary canal of its aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. **Archives Virology** 141(7):1279-1292.

Garzo E, Moreno A, Plaza M, Fereres A (2020) Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides. **Plants** 9(7):895.

Gouveia BC, Calil IP, Machado JPB, Santos AA, Fontes EP (2017). Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. **Frontiers in microbiology**, 7:2139.

Gonçalves MC, Klerks MM, Verbeek M, Vega J., Van den Heuvel JFJM (2002) The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of sugarcane yellow leaf virus. **European Journal of Plant Pathology** 108(5):401-407.

Gonçalves MC, Vega J, Oliveira JG, Gomes MMA (2005) Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira** 30(1)10-16.

Gonçalves MC (2008) Doenças causadas por vírus. In: Dinardo-Miranda L.L, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.) **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 150-165.

Gonçalves MC, Pinto LR, Souza SC, Landell MGA (2012) Virus Diseases of Sugarcane: a Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. **Functional Plant Science & Biotechnology** 6(2):108-116.

Gray S, Cilia M, Ghanim M (2014) Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an orchestra of virus, insect, and plant-derived instruments. **Advances in Virus Research** 89:141-199.

Grisham MP, Eggleston G, Hoy JW, Viator RP (2009) The effect of sugarcane yellow leaf virus infection on yield of sugarcane in Louisiana. **International Sugar Journal** 27:3-91.

Holkar SK, Balasubramaniam P, Kumar A, Kadirvel N, Shingote PR, Chhabra ML, Kumar S, Kumar P, Viswanathan R, Jain RK, Pathak AD (2020). Present Status and Future Management Strategies for sugarcane yellow leaf virus: A Major Constraint to the Global Sugarcane Production. **The Plant Pathology Journal** 36(6):536-557.

Ishibashi K, Ishikawa M (2014). Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. **Current opinion in virology**, 9:8-13.

Jadoski CJ, Toppa EVB, Julianetti A, Hulshof T, Ono EO, Rodrigues JD (2010) Physiology development in the vegetative stage of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia** 3(2):169-175.

Jiménez J, Arias-Martin M, Moreno A, Garzo E, Fereres A (2020) *Barley yellow dwarf virus* can be inoculated during brief intracellular punctures in phloem cells before the sieve element continuous salivation phase. **Virology** 110:85-93.

- Jones JD, Dangl JL (2006). The plant immune system. **Nature**, 444(7117): 323-329.
- Kindlmann P, Jarošík V, Dixon AF (2007) Population Dynamics. **Aphids as Crop Pests** 311-324.
- Koch KG, Chapman K, Louis J, Heng-Moss T, Sarath G (2016) Plant Tolerance: a unique approach to control hemipteran pests. **Frontiers in Plant Science** 7:1363.
- Korimbocus J, Coates D, Barker I, Boonham N (2002). Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **Journal of virological methods**, 103:109-120.
- Kumar A, Holkar SK, Singh R (2020) Screening of sugarcane genotypes against yellow leaf disease in tropical and sub-tropical conditions in India. **ICAR-Indian Agricultural Research Institute**, 307.
- Lara, F (1991) **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 336 p.
- Landell MGA, Bressiani JA (2010) Melhoramento Genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.) **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 101-155 p.
- Lehrer AT, Schenck S, Yan SL, Komor E (2007) Movement of aphid-transmitted sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) within and between sugarcane plants. **Plant Pathology** 56:711-717.
- Li F, Wang A (2019). RNA-targeted antiviral immunity: more than just RNA silencing. **Trends in microbiology**, 27(9):792-805.
- Maluta NKP, Lopes JRS, Fiallo-Olivé E, Navas-Castillo J, Lourenção AL (2021) Foliar application of systemic insecticides disrupts feeding behavior of the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1 and the transmission of tomato chlorosis virus in potato plants. **Journal of Pest Science** 94:1265-1276.
- Matsuoka S, Garcia AAF, Arizono H (2005) **Melhoramento da cana-de-açúcar**. In.: Bórem A (Eds.) Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editorada UFV, p. 225-274.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual review of plant biology**, 54(1):23-61.
- Mandadi KK, Scholthof KBG (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? **The plant cell**, 25(5):1489-1505.
- McLean DL, Kinsey MG (1964) Technique for electronically recording aphid feeding salivation. **Nature** 202:1358-1359.

McLeish MJ, Fraile A, García-Arenal F (2019). Evolution of plant–virus interactions: host range and virus emergence. **Current opinion in virology**, 34: 50-55.

Natarajan S, Basnayake J, Wei X, Lakshmanan P (2019) High-throughput phenotyping of indirect traits for early-stage selection in sugarcane breeding. **Remote Sensing** 11(24):2952.

Niehl A, Wyrsh I, Boller T, Heinlein M (2016). Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. **New Phytologist**, 211(3): 1008-1019.

Nibouche S, Costet L, Medina RF, Holt JR, Sadeyen J, Zoogones AS, Brown P, Blackman RL (2021). Morphometric and molecular discrimination of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari*, (Zehntner, 1897) and the sorghum aphid *Melanaphis sorghi* (Theobald, 1904). **PloS one**, 16(3):e0241881.

Panda N, Khush GA (1995) **Host Plant Resistance to Insects**. Wallingford: CAB International, 431 p.

Painter RH (1951) **Insect Resistance in Crop Plants**. New York: The Macmillan Company, v.72, 481 p.

Paudyal S, Armstrong JS, Giles KL, Payton ME, Opit GP, Limaje A (2019) Categories of resistance to sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae) among sorghum genotypes. **Journal of Economic Entomology** 112:1932-1940.

Palaniswami C, Viswanathan R, Bhaskaran A, Rakkiyappan P, Gopalasundaram P (2014) Mapping *sugarcane yellow leaf* disease affected area using remote sensing technique. **Journal of Sugarcane Research** 4:55-61.

Peña MR, Lomeli JRF, Bujanos RM, Muñoz ALV, Vanegas JMR, Salas RM, Hernández OET, Martínez AJ, Ibarra JFR (2018) **Pulgón amarillo del sorgo, *Melanaphis sacchari* (Zehntner, 1897), interrogantes biológicas y tablas de vida**. Celaya Gto: Fundación Guanajuato Produce, 44 p.

Prado E, Tjallingii WF (1994) Aphid activities during sieve element punctures. **Entomol Experimentalis et Applicata** 72:157-165.

Ramouthar PV, Berry SD, Rutherford RS, MCFarlane, SA (2013) Yield loss due to sugarcane yellow leaf virus and its prevalence in the South African sugar industry. **South African Sugar Technologists' Association** 86:244-254.

Salas FJS, Lopes JRS, Fereres A (2010) Resistência de Cultivares de Batata a *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology** 39(6):1008-1015.

Singh BU, Padmaja PG, Seetharama N (2004) Biology and management of the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Homoptera: Aphididae), in

sorghum: a review. **Crop Protection** 23:739-755.

Senasica (2014) Pulgón amarillo *Melanaphis sacchari* (Zehntner). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. **Ficha Técnica** 43:15.

Sharma SK, Meena RP, Pramesh D, Kumar S, Singh TS, Baranwal VK (2017) Nucleic acid based techniques for the fine diagnosis of plant viruses in India. In: Mandal B, Rao GP, Baranwal VK, Jain RK (Eds.) **A century of plant virology in India**. Singapore: Springer Nature, 621-686 p.

Scaglioni SM, Lockhart BEL (2000). Transmission, characterization, and serology of a luteovirus associated with yellow leaf syndrome of sugarcane. **Phytopathology**, 90:120-124.

Schenck S (1997) Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. **Sugar Cane** 4:5-8.

Schenck S, Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of sugarcane yellow leaf virus. **Plant Disease Journal** 84:1085-1088.

Soosaar JL, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nature Reviews Microbiology**, 3(10):789-798.

Sun M, Voorrips RE, Steenhuis-Broers G, van't Westende W, Vosman B (2018) Reduced phloem uptake of *Myzus persicae* on an aphid resistant pepper accession. **BMC Plant Biology** 18:138.

Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ (2017). Structural foundations of RNA silencing by Argonaute. **Journal of molecular biology**, 429(17):2619-2639.

Tetreault HM, Grover S, Scully ED, Gries T, Palmer NA, Sarath G, Louis Jand Sattler SE (2019) Global Responses of Resistant and Susceptible Sorghum (*Sorghum bicolor*) to Sugarcane Aphid (*Melanaphis sacchari*). **Frontiers in Plant Science** 10:145.

Tjallingii WF (1988) Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK, Harrewijn P (Eds.). **Aphids, their biology, natural enemies and control**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 95-108 p.

Tjallingii WF (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. **Journal of Experimental Botany** 57:739-745.

Tjallingii WF (1985) Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 38:187-193.

Van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graph. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 68(3):269-278.

van Helden M, Tjallingii WF (2000) Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In: Walker GP, Backus EA (Eds.). **Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of homopteran feeding behavior**. Beijing, China: Thomas Say Publications in Entomology, Entomological Society of America, 144-172.

Viswanathan R, Balamuralikrishnan M, Karuppaiah R (2008) Identification of three genotypes of sugarcane yellow leaf virus causing yellow leaf disease from India and their molecular characterization. **Virus Genes** 37:368-379.

Viswanathan R, Chinnaraja C, Malathi P, Gomathi R, Rak-kiyappan P, Neelamathi D, Ravichandran V (2014) Impact of sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) infection on physiological efficiency and growth parameters of sugarcane under tropical climatic conditions in India. **Acta Physiologiae Plantarum** 36:1805-1822.

Viswanathan R, Jayanthi R, Sanakaranarayanan C (2017) Integrated disease and pest management in sugarcane. **Indian Farming** 67:28-32.

Xu DL, Park JW, Mirkov TE, Zhou GH (2008) Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. **Archives of Virology** 15(3):1031-1039.

Zhu YJ, Lim ST, Schenck S, Arcinas A, Komor E (2010) RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of ScYLV titre to yield. **European Journal of Plant Pathology** 127(2):263-273.

Zhou GH, Li JG, Xu DL, Shen WK, Deng HH (2006) Occurrence of sugarcane yellow leaf virus in South China and its transmission by the sugarcane colonizing aphid, *Ceratovacuna lanigera*. **Scientia Agricultura Sinica** 39(10):2023-2027.

Webster B, Bruce T, Dufour S, Birkemeyer C, Birkett M, Hardie J, Pickett J (2008) Identification of volatile compounds used in host location by the black bean aphid, *Aphis fabae*. **Journal of Chemical Ecology** 34:1153-1161.

Yadav S, Jackson P, Wei X, Ross EM, Aitken K, Deomano E, Atkin F, Hayes BJ, Voss-Fels KP (2020). Accelerating Genetic Gain in Sugarcane Breeding Using Genomic Selection. **Agronomy** 10(4):585. <https://doi.org/10.3390/agronomy1004058> 5

CAPÍTULO 2 - Classes de resistência de cultivares de cana-de-açúcar ao sugarcane yellow leaf virus por meio de fenotipagem a campo e quantificação viral via RT-qPCR

RESUMO - O amarelinho da cana, causado pelo sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) é uma das principais doenças da cana-de-açúcar, cuja infecção provoca danos no desenvolvimento das plantas, refletindo em grandes perdas econômicas. Uma alternativa para o controle do ScYLV é o uso de cultivares resistentes, tornando imprescindível investigações e por genótipos resistentes ao vírus. O objetivo do estudo foi caracterizar a resposta de oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a classe de resistência ao ScYLV por meio da fenotipagem em campo e a quantificação do título viral via RT-qPCR temporalmente. O experimento foi conduzido a campo nos anos 2019/2020, em delineamento de blocos casualizados com parcelas de quatro linhas de 2 m de comprimento, espaçadas em 1,5 entre linhas e com seis repetições, consideradas as duas linhas centrais como parcelas úteis para avaliação. A severidade dos sintomas foi avaliada do sexto ao décimo primeiro mês após o plantio, aplicando uma escala de notas e estabelecendo a classe de resistência entre as diferentes cultivares avaliadas. Para a quantificação viral do ScYLV via RT-qPCR foram realizados quatro pontos de coleta, sendo 0; 8; 10 e 12 meses após o plantio. Os resultados mostraram que 62,5% das cultivares constituíram um grupo específico, classificado como moderadamente resistente. A cultivar SP71-6163 confirmou sua suscetibilidade com a maior expressão dos sintomas de ScYLV. As cultivares SP71-6163 e IACSP01-3127 apresentaram o maior aumento do título viral (15,4 e 23,7 vezes respectivamente) com 12 meses após o plantio, em comparação com 0 mês após o plantio. Os resultados mostraram que a cultivar IACBIO-266 foi a única caracterizada como resistente, livre da expressão de sintomas em campo, e com a titulação viral em declínio ao longo do tempo, atingindo níveis não detectáveis aos 8 e 12 meses após o plantio. Durante o período avaliado, o ScYLV foi detectado em todas as cultivares de cana, contudo, a concentração viral variou em diferentes ordens, por toda extensão longitudinal. Os resultados possibilitaram a caracterização de cultivares em diferentes padrões de suscetibilidade e resistência ao ScYLV, contribuindo com o avanço no conhecimento sobre a herança de resistência da cana-de-açúcar à doença.

Palavras-chave: Amarelinho da cana, escala de notas, *RT-qPCR*, ScYLV, *Saccharum* sp.

1. INTRODUÇÃO

O *sugarcane yellow leaf virus*, gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*, possui genoma de “RNA” de fita simples (ssRNA) e diâmetro das partículas virais de 24 a 29 nm (Moonan et al., 2000), e atualmente há relatos da doença em todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar no mundo (Abu Ahmad et al., 2006). Historicamente os primeiros relatos da sua incidência ocorreram no Havai/EUA (Schenk, 1990; 2001), Brasil (Vega et al., 1997), África do Sul (Rutherford et al., 2004), Austrália (Borth et al., 1994) entre outros. O ScYLV é um vírus restrito aos vasos do floema das plantas infectadas (Lehrer et al., 2007) e sua transmissão é classificada como persistente, circulativo e não propagativo. O principal vetor é o afídeo *Melanaphis sacchari*, que devido ao seu hábito alimentar específico, adquire e inocula o ScYLV durante a sua alimentação no floema das plantas (Fartek et al., 2012; Garzo et al., 2020).

Em cultivares suscetíveis, o amarelecimento das folhas é o sintoma característico causado pelo vírus, iniciando pela face abaxial na nervura central, (Schenck et al., 1997), enquanto a face adaxial da nervura apresenta coloração avermelhada podendo atingir necrose do tecido vegetal (Cronje et al., 1998; Gonçalves et al., 2005), colmos com encurtamento dos internódios, acúmulo de sacarose no floema e redução de crescimento e vigor da planta (Comstock et al., 1998; Rassaby et al., 2003; Gonçalves et al., 2005; Lehrer et al., 2009). A manifestação fenotípica dos sintomas nas plantas em campo é maximizada quando são colocadas em condições de estresse, como seca ou baixas temperaturas (Rassaby et al., 2003), causando perdas de até 60% em cultivares suscetíveis (Ramouthar et al., 2013) e de até 14% na produção de açúcar (Grisham et al., 2009).

Por outro lado, uma enorme gama de cultivares não expressam sintomas visuais da infecção nos primeiros meses de desenvolvimento da planta (Cronje et al., 1998), refletindo em atraso na detecção das respostas fenotípicas das plantas. A aplicação de escalas de notas de sintomas, em conjunto com outras técnicas, tem demonstrado boa correlação para avaliação e caracterização fenotípica de sintomas de plantas (Viswanathan et al., 2016). Segundo Lehrer e Komor (2008), essas técnicas permitem identificar grupos específicos com a classe de resistência variável entre cultivares classificando-os como resistente, moderadamente resistente,

moderadamente suscetível e suscetível.

A agilização do diagnóstico correto da presença/ausência do ScYLV em cana-de-açúcar, em correlação com as demais técnicas aqui citadas, constituem-se em ferramentas essenciais no avanço das pesquisas. Impactando com informações precisas quanto a transmissão do vírus do amarelinho e suas inter-relações, auxiliando no cultivo e melhoramento genético da cana-de-açúcar. Sendo assim, o avanço nas pesquisas para determinar o real impacto e a incidência do vírus nos cultivos brasileiros, se faz necessário (Gonçalves et al., 2012).

Trabalhos que unem avaliação dos sintomas da infecção, somados a técnicas de diagnóstico quantitativo, têm apresentado avanços significativos, com maior precisão nos resultados (Chinnaraja e Viswanathan, 2015). A utilização de técnicas de biologia molecular, como o RT-PCR (*Reverse transcriptase-PCR*) e RT-qPCR (*Reverse transcriptase quantitative-PCR*), apresentam maior sensibilidade na detecção e quantificação do ScYLV (Gonçalves et al., 2002; Zhu et al., 2010; Chinnaraja e Viswanathan, 2015).

Zhu et al. (2010) observaram maior sensibilidade na detecção do vírus utilizando o RT-PCR, confirmando a infecção por ScYLV em cultivares de cana-de-açúcar aonde não se observava expressão de sintomas. Chinnaraja et al. (2014) quantificaram com êxito o título viral do ScYLV via RT-qPCR, aplicando a quantificação relativa e absoluta. Por outro lado, da Silva et al. (2015) obtiveram sucesso na identificação e seleção de resistência ao sugarcane mosaic virus (SCMV) em genótipos de cana-de-açúcar, por correlações entre testes sorológicos (PTA-ELISA) e escala de severidade de sintomas causados pelo vírus.

Burbano et al. (2021) descreveram a confiabilidade na detecção e quantificação do ScYLV por meio da técnica RT-qPCR em genótipos de cana-de-açúcar, mesmo em casos sem expressão de sintomas. Os autores ainda enfatizaram a importância da junção das distintas técnicas de avaliação para o avanço e celeridade na obtenção de resultados, contribuindo na seleção e identificação de genótipos superiores em programas de melhoramento.

Considerando que a principal alternativa para o controle do amarelinho da cana-de-açúcar seja o uso de cultivares resistentes, há a necessidade de investigar os níveis de resistência ao vírus em diferentes genótipos e mesmo em espécies

selvagens disponíveis (Komor, 2011), aumentando assim as chances de sucesso nos programas de melhoramento.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi caracterizar cultivares de cana-de-açúcar quanto a classe de resistência ao ScYLV, através da hipótese da existência de correlações entre a fenotipagem em campo e a quantificação do título viral usando RT-qPCR, ao longo do tempo de infecção no campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento, grupo de cultivares e produção de mudas

O experimento de campo foi conduzido durante os anos agrícolas 2019 e 2020, na estação de pesquisa do Centro de Cana do Instituto Agrônomo - IAC, localizada no município de Ribeirão Preto/SP, nas coordenadas geográficas latitudes 21° 10' 39" S e longitude 47° 48' 37" W. A temperatura média e a pluviometria acumulada foram aferidas e expostas na Figura 1. O relevo é caracterizado como suave ondulado e o solo é classificado como Latossolo Vermelho eutroférico (Embrapa, 2018).

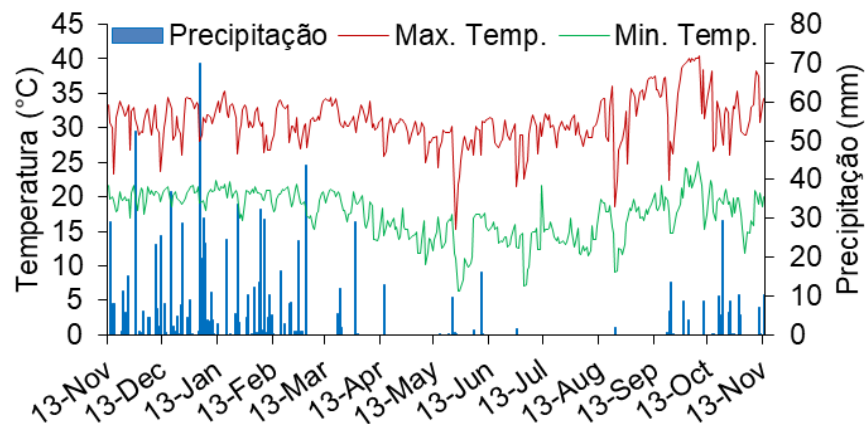


Figura 1. Dados de precipitação acumulada (mm) e temperaturas (°C) médias durante condução do experimento nos anos 2019 e 2020, no Centro de Cana - IAC em Ribeirão Preto/SP.

Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizados oito cultivares de cana-de-açúcar pertencentes aos programas de melhoramento genético do Instituto Agrônomo de Campinas - IACSP e do Centro de Tecnologia Canavieira - CTC, sendo elas IACSP95-5094; IACCTC05-2562; IACSP01-5503; IACSP96-7569; IACBIO-266; IACSP01-3127; IACSP95-5000 e SP71-6163, a última reconhecidamente suscetível ao ScYLV. As sete primeiras cultivares foram lançadas pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e são bem aceitas pelos produtores de cana no Brasil. IACSP95-5094, IACCTC05-2562, IACSP01-5503, IACSP96-7569, IACSP01-3127 e IACSP95-5000 são conhecidas por seu alto rendimento de sacarose e adaptação às diferentes condições edafoclimáticas brasileiras, enquanto a IACBio-266 é uma cultivar de cana energia, recente demanda do mercado de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Por falta de informações sobre a biologia e comportamento alimentar de *M. sacchari* nessas cultivares, elas foram selecionadas para este trabalho.



Figura 2. Produção das mudas pré-brotadas (MPB) para os ensaios a campo. A. Coleta dos colmos no campo. B. Corte e seleção das gemas com guilhotina. C. Organização e identificação das gemas em bandejas de plástico. D. Gemas em bandejas de plástico cobertas com substrato. E. Câmara de germinação controlada. F. Gemas germinadas em tubetes de plástico em

casa de vegetação.

Em campo, foram coletados diversos colmos das referidas cultivares para produção de mudas pré-brotadas (MPB) (Figura 2 A). Os colmos foram cortados com auxílio de uma guilhotina esterilizada com amônia quaternária (Figura 2 B), e posteriormente identificadas e selecionadas as melhores gemas, posicionando-as em bandejas de plástico cobertas com substrato comercial da marca “Carolina Soil” (turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduo orgânica agroindustrial classe A e calcário) (Figura 2 C e D). Todas as bandejas foram mantidas em câmara de germinação com fotoperíodo (12 h) e temperatura (28 °C) controladas, por 8 dias (Figura 2 E). Em seguida, todas as gemas brotadas foram transplantadas para tubetes plásticos e mantidas em casa de vegetação por 90 dias, recebendo irrigação e suplemento nutricional quando necessário (Figura 2) F.

A produção de MPB das cultivares supracitadas ocorreu com objetivo de utilização nos distintos experimentos da referida pesquisa (fenotipagem de campo, criação e multiplicação dos afídeos).

2.2 Criação de colônias de *M. sacchari* virulíferas e não-virulíferas

A partir de uma colônia de *M. sacchari* cedida pelo doutorando Ricardo José Pimenta, integrante do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, foi iniciada a criação e multiplicação dos afídeos.

Devido à necessidade de manter uma grande quantidade de insetos para todos os experimentos, os afídeos foram criados e mantidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana do Instituto Agrônomo - IAC localizado em Ribeirão Preto/SP (Figura 3). A criação de *M. sacchari* virulíferos foi feita em folhas destacadas de plantas da cultivar IACSP95-5000, infectadas com o ScYLV. Outra colônia foi mantida separadamente em plantas sadias da mesma cultivar, para a multiplicação de *M. sacchari* avirulíferos. Ambas as colônias de insetos foram testadas para a presença e ausência do vírus por análises de RT-PCR (Gonçalves et al., 2002) (Figura 4).

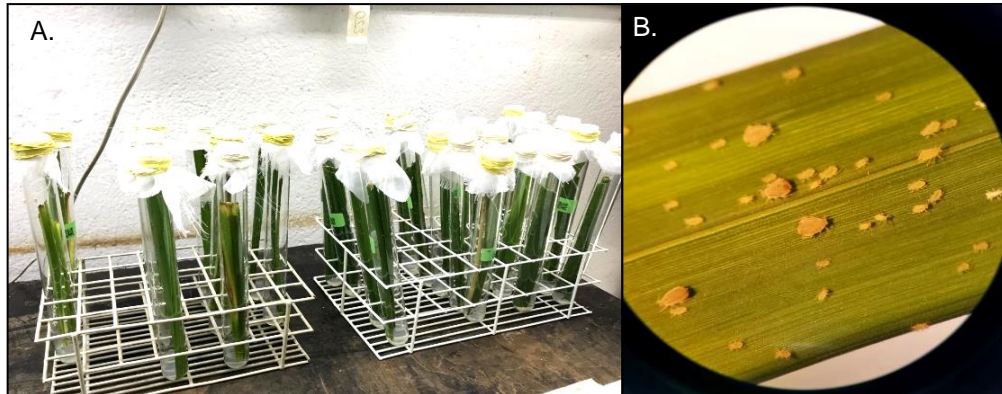


Figura 3. A. Criação de *M. sacchari* em folhas destacadas de cana-de-açúcar na cultivar IACSP95-5000 em tubos de ensaio com solução de ágar a 1%. B. Colônia de pulgões *M. sacchari*, mostrando adultos e ninfas vistos ao microscópio estereoscópico (aumento 10x).

As colônias foram isoladas e identificadas em tubos de ensaio em ágar a 1%, realizando a troca das folhas de cana a cada 6 dias (± 1) e mantidas em câmaras do tipo BOD (demanda bioquímica do oxigênio) sob condições controladas (fotoperíodo de 12L:12E, T 29 ± 1 °C).

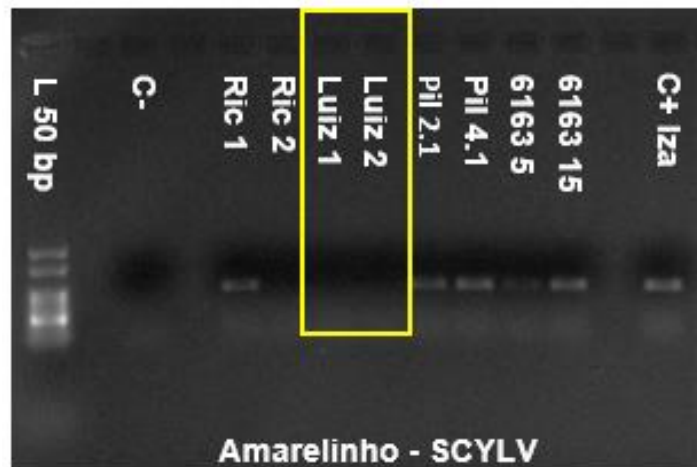


Figura 4. Amostragem de afídeos avirulíferos (Luiz 1 e Luiz 2) submetidos a análise de RT-PCR. C-: controle negativo para ScYLV, 6163: controle positivo para ScYLV.

2.3 Preparo, condução e delineamento experimental do ensaio de campo

Após três meses em casa de vegetação, as mudas MPB foram levadas a campo sendo o plantio realizado em 13 e 14 de novembro de 2019, sendo conduzido

em um delineamento de blocos casualizados (DBC) com 6 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por quatro linhas de 2 m de comprimento, espaçadas em 1,5 m entre linhas e 0,50 m entre plantas, totalizando cinco plantas por linha e vinte plantas por parcela (Figura 5). Durante as avaliações fenotípicas dos sintomas da infecção pelo ScYLV foram consideradas as duas linhas centrais como parcelas úteis, ficando as demais como efeito de bordadura. Como adubação de base, utilizou-se a formulação NPK 08-28-16 em todos os sulcos e 20-05-20 em cobertura, após 30 dias do plantio. Pouco antes do plantio, com auxílio de um pulverizador (20 litros) acoplado ao trator, foi aplicado Fipronil no solo (250 g/ha) para controle de formigas, cupins e insetos de solo indesejáveis. Para o controle de plantas daninhas foram utilizados, quando necessário, os herbicidas Tebuthiuron (1,2 kg/ha) e 2,4-D (2,5 Litros/ha), além de capina manual.

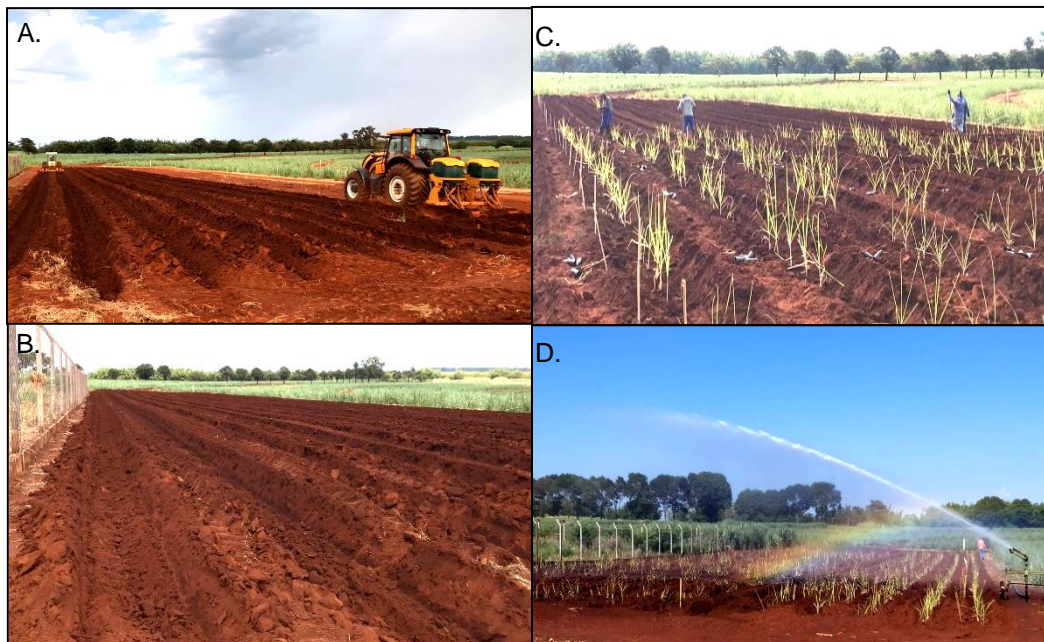


Figura 5. Instalação do experimento de campo. A. Preparo do solo, adubação de base e abertura dos sulcos. B. Área finalizada e pronta para o plantio. C. Plantio das oito cultivares de cana-de-açúcar em sistema de parcelas experimentais. D. Ensaio instalado recebendo irrigação via aspersão.

2.4 Avaliação fenotípica de sintomas causados pelo ScYLV em campo e a classe de resistência em cultivares de cana-de-açúcar

Visando aumentar a pressão de inóculo tanto em casa de vegetação como no

campo, foram liberadas colônias de *M. sacchari* virulíferas, quinzenalmente, por 90 dias, permitindo assim que a transmissão viral ocorresse de maneira uniforme. A liberação dos afídeos foi feita manualmente, utilizando folhas destacadas com colônias do inseto, mediante seu grampeamento na parte abaxial das folhas de cada cultivar/parcela.

A severidade dos sintomas foliares causado pelo vírus foi determinada no campo com notas individuais para folha 0, folha +1, folha +2 e folha +3 utilizando uma escala sintomática de notas variando de 1 a 4 para as plantas dentro das linhas úteis de cada parcela (Figura 6), 1= folha verde sem sintomas, 2= amarelecimento leve da nervura central na face abaxial e leve avermelhamento da face adaxial da nervura central, 3= amarelecimento da face abaxial da nervura central e avermelhamento parcial da face adaxial, com perda de pigmentação e 4= amarelecimento, avermelhamento e seca intensa da nervura central nas faces abaxial e adaxial (Figura 6). A partir das notas médias de severidade estabelecidas a campo, as cultivares foram classificadas em diferentes níveis de resistência (Tabela 1).



Figura 6. Escala de notas (1 a 4) para a infecção pelo ScYLV. Nota 1. folha verde sem sintomas, Nota 2. amarelecimento leve da nervura central na face abaxial e leve avermelhamento da face adaxial da nervura central, Nota 3. amarelecimento da face abaxial da nervura central e avermelhamento parcial da face adaxial, com perda de pigmentação e Nota 4. Amarelecimento e avermelhamento intenso da nervura central nas faces abaxial e adaxial.

Tabela 1. Classe de níveis de resistência ao ScYLV de acordo com a média das avaliações fenotípicas de campo.

Níveis de Resistência Avaliado	
NOTA	CLASSE DE RESISTÊNCIA
1,0	Resistente
1,1 - 2,0	Moderadamente resistente
2,1 - 3,0	Moderadamente suscetível
3,1 - 4,0	Suscetível

As leituras fenotípicas foram realizadas mensalmente, a partir do sexto mês após o plantio (MAP), compreendendo de maio de 2020 até outubro do mesmo ano, totalizando seis avaliações. Todas as avaliações foram feitas por quatro avaliadores independentes simultaneamente, no intuito de reduzir o erro experimental.

2.5 Extração de RNA, detecção por RT-PCR e quantificação por *real time* RT-qPCR de plantas previamente inoculadas com ScYLV

Para confirmar e quantificar a infecção pelo ScYLV, o acompanhamento da concentração viral nos tecidos das plantas foi feito por real time RT-qPCR, realizado em quatro tempos de coleta de amostras foliares (folha +1) das oito cultivares em campo, iniciando a coleta na véspera do plantio a campo, 0 MAP, seguidos por 8, 10 e 12 MAP. Em todas as coletas foram feitas três réplicas biológicas de cada genótipo, e armazenadas a -80 °C.

Após a extração individual do RNA total para cada genótipo e tempo de coleta, foi feito um “*pool*” com quantidades equitativas de “RNA” das três réplicas biológicas, o qual foi utilizado para a síntese de cDNA. Este procedimento foi feito para reduzir os custos da análise de RT-qPCR. Assim, a quantificação da carga viral de cada genótipo, em cada ponto de coleta foi representada pelo “*pool*” de três réplicas biológicas.

Todas as análises de RT-qPCR foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana do Instituto Agrônomo - IAC em Ribeirão Preto/SP (Figura 7).

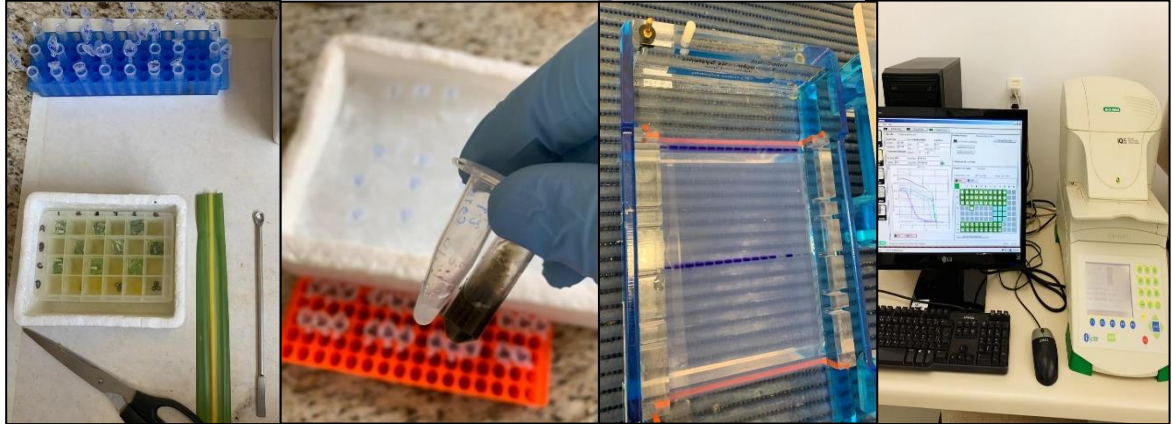


Figura 7. Coleta e extração de RNAs de amostras foliares provenientes do experimento de campo, para detecção e quantificação do ScYLV via RT-qPCR.

2.5.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O “RNA” total de cada amostra foi extraído utilizando 1000 μ L de Trizol (Invitrogen) a partir de 100 mg de tecido foliar das amostras maceradas com o equipamento *TissueLyser* II (Quiagen). Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (CHCl_3), o extrato incubado por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 4 °C à 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi pipetado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL.

O *pellet* foi ressuscitado em 200 μ L de tampão TE, 100 μ L de NaCl e 400 μ L de álcool isopropílico gelado, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C à 12.000 rpm para precipitar o ácido nucleico. O *pellet* foi lavado com 1000 μ L de álcool 70% e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi descartada e o excesso do álcool foi retirado com o auxílio de uma pipeta, após esse passo o *pellet* foi seco e ressuscitado em 25 μ L de água DEPC (Água tratada com Dietil Pirocarbonato).

A concentração de “RNA” foi avaliada com o auxílio de um *NanoDrop* (Termofisher Scientific), para normalizar a concentração de “RNA” a 100 ng/ μ L ou

acima. A integridade do “RNA” foi checada mediante eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE corado com brometo de etídio, para visualização sob luz ultravioleta.

O tratamento das amostras com a DNAase foi realizado a partir de 1 µg de “RNA” utilizando o kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega), conforme as instruções do fabricante. A reação foi mantida a 37 °C por 30 minutos, seguida da adição de 1 µL de *Stop solution* e submissão a 65 °C por 10 minutos em termociclador (96-well MyCycler™, BIO-RAD). O cDNA foi sintetizado com o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), em um volume final de 10 µL, adicionando-se 500 ng de RNA, 2 µL *GoScript Reaction Buffer + Random Primers*, 1 µL do *GoScript Enzyme Mix* e 2 µL de água DEPC. A síntese do cDNA foi realizada a temperatura de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos, em um termociclador MyCycler™ BIO-RAD.

2.5.2 Escolha do gene de referência e avaliação da eficiência dos pares de primers utilizados nas reações de RT-qPCR

Foram avaliados seis genes de referência, sendo triosephosphate isomerase (TPI), Uridylate kinase (UK), SAND protein family (SAND), Ubiquitin-conjugating enzyme 18 gene (UBC18), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e TUBULIN (TUB) descritos na literatura para cana-de-açúcar (Andrade et al., 2017; Silva et al., 2019; Zhu et al., 2010). A avaliação da estabilidade dos normalizadores foi feita via RT-qPCR em um “pool” contendo quantidades iguais de cDNA de cada um dos pontos de coleta de todos os genótipos.

Os resultados da RT-qPCR foram avaliados pelo “software” *NormFinder* (Andersen et al. 2004) e *LinReg* (Ruijter et al., 2009), os quais também foram utilizados para a avaliação da eficiência dos pares de *primers* dos normalizadores e do gene alvo, i.e. região de 181 nucleotídeos da sequência parcial da capa proteica do ScYLV (ORF3) (Chinnaraja e Viswanathan, 2015; Burbano et al., 2021). A especificidade de todos os pares de primers utilizados foi avaliada pelos perfis das curvas de *melting* (apêndice, Figura 1) e a ausência de amplificação nos controles negativos da reação RT-qPCR. O gene de referência UBC18 foi selecionado para ser utilizado como

normalizador.

2.5.3 Reação de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o SYBR Green® kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega) em um volume final de 10 µL, contendo 3 µL de cDNA (diluição 1:10), 5 µL de *Syber qPCR*, 1,6 µL de água DEPC e 0,2 µL dos *primers* YLS RT-*forward* e YLS RT-*reverse* (concentração dos *primers* em 10 µM e volume por reação de 0,2 µL), seguindo as instruções do fabricante. As reações de RT-qPCR foram conduzidas utilizando um termociclador *IQ™5 Real-Time PCR Detection Systems* BIO-RAD utilizando placas de 96 poços. A quantificação foi baseada nos valores de *Ct* (*Cycle threshold*), que permite mensurar quantos ciclos são necessários para a detecção do vírus. As condições da RT-qPCR foram: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min, 95 °C por 1 min e 55 °C por 1 min, e as curvas de *melting* analisadas durante 81 ciclos de 55 °C por 10 seg. Para as reações de RT-qPCR foram utilizadas três réplicas técnicas.

A cultivar IACSP95-5000, obtida por meio de cultura de meristemas e previamente indexada como livre de vírus, foi utilizada como controle negativo das reações (*Ct* 42,36). Por sua vez, a cultivar SP71-6163, foi utilizada como controle positivo por ser reconhecidamente suscetível ao vírus e apresentar alta concentração viral em seus tecidos floemáticos (*Ct* 25,80).

2.6 Análise de dados

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste Shapiro-Wilk e quando os dados não seguiam uma distribuição normal, foram transformados por $\sqrt{x + 5}$ e novamente verificados por Shapiro-Wilk. Foi realizada a análise de variância (teste F), considerando as notas de severidade de sintomas nas oito cultivares e seis repetições utilizadas no campo. As médias foram comparadas pelo teste LSD-Fischer ($p < 0,05$) utilizando o “software” SAS versão 9.3 (Sas Institute, 2013).

A quantificação relativa (QR) do ScYLV em todos as cultivares nos diferentes pontos de coleta foi estimada utilizando o método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak e Scmittgen, 2001; Kaweesi et al., 2014), onde o $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Alvo} - Ct_{Norm})_{tempo\ x} - (Ct_{Alvo} - Ct_{Norm})_0$ MAP, e x é o tempo de coleta (8, 10 e 12 MAP). Quando os resultados dos cálculos $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ se apresentaram de forma fracionada (n), $0 < n < 1$, foi aplicada a fórmula, $X = -1 / \log_2(n)$, na busca de identificar quantas vezes o título viral se expressou em comparação a coleta no tempo 0 (C0), representado em *fold change*. Os resultados foram transformados para log10 e plotados em gráfico para acompanhamento do título viral no decorrer do tempo das diferentes coletas em campo.

3. RESULTADOS

3.1 Fenotipagem de campo e classificação de resistência e suscetibilidade ao ScYLV

Considerando a escala de notas de sintomas entre 1 e 4 aplicada nas avaliações em campo, foi possível identificar diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão dos sintomas entre as cultivares de cana-de-açúcar ao longo do período avaliado. A resposta causada pela infecção do ScYLV em termos de suscetibilidade ou resistência das plantas em campo durante os onze meses de desenvolvimento, possibilitou formar grupos específicos de cultivares quanto as notas de severidade dos sintomas. A cultivar SP71-6163 destacou-se como suscetível ao vírus com fenótipo apresentando sintomas intensos da doença ao longo de todos os meses avaliados (Figura 8).

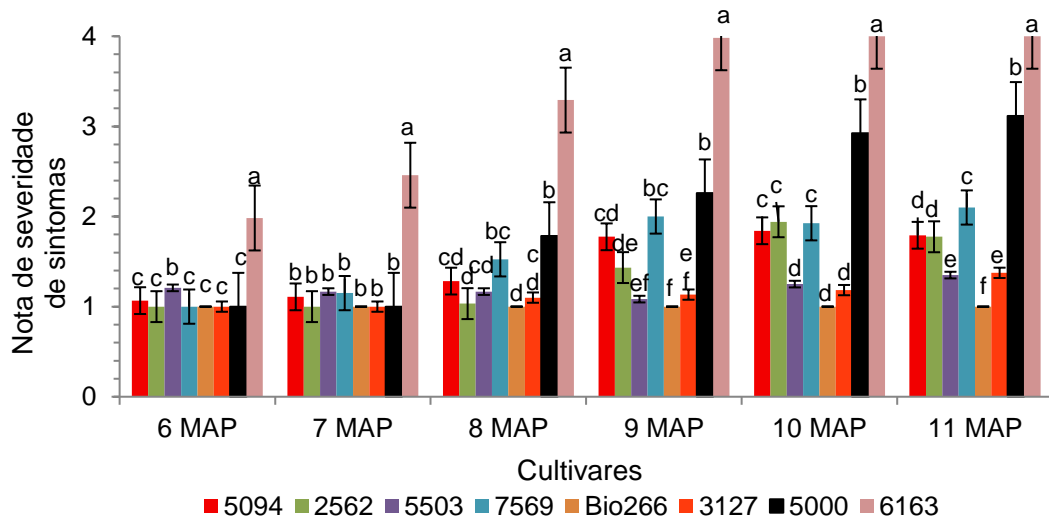


Figura 8. Avaliação visual das oito cultivares de cana-de-açúcar por escala de notas de severidade de sintomas do ScYLV durante avaliação fenotípica mensal, de 6 a 11 meses do plantio em campo. *Letras iguais não diferem dos demais tratamentos pelo teste LSD-Fisher ($p < 0,05$). MAP: meses após o plantio.

Após o desenvolvimento vegetativo das plantas e a liberação quinzenal de afídeos virulíferos entre as parcelas experimentais, aos 6 MAP (maio/2020) em campo iniciou-se o monitoramento dos sintomas, sendo possível identificar os sintomas do

ScYLV em sua fase inicial nas cultivares IACSP01-5503 e SP71-6163, notas 1,21 e 1,98 respectivamente com significância de $p < 0,05$. Nas avaliações subsequentes, aos 7, 8 e 9 MAP (junho, julho e agosto/2020), a cultivar SP71-6163 apresentou um avanço significativo na expressão de sintomas (notas 2,46, 3,29 e 3,98 respectivamente), o que não foi observado nas demais cultivares, com sintomas moderados ou até mesmo ausentes (nota próximo a 1,00) (Figura 8).

A partir do 10 MAP (setembro/2020), a cultivar SP71-6163 atingiu nota máxima (4,0) de severidade dos sintomas entre as parcelas, confirmando a sua suscetibilidade ao vírus. A cultivar IACSP95-5000 que já havia apresentado aumento análogo na intensidade dos sintomas entre os meses anteriores, destacou-se no décimo mês com média de notas próxima a 3,0, com amarelecimento intenso da nervura central das folhas e avermelhamento parcial da nervura central. As cultivares SP71-6163 e IACSP95-5000 apresentaram aumento dos sintomas virais aos 11 MAP (outubro/2020), com notas médias de 4,0 e 3,12 respectivamente. A cultivar IACSP96-7569 apresentou aos 11 MAP nota média geral de 2,10 com diferença expressiva nos sintomas, porém com menor severidade (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios das notas de sintomas e classe de resistência ao ScYLV nas oito cultivares de cana-de-açúcar mediante avaliação fenotípica em campo.

Cultivares	6 MAP	7 MAP	8 MAP	9 MAP	10 MAP	11 MAP	MÉDIA	CL
5094	1,07 c	1,11 b	1,28 cd	1,78 cd	1,84 c	1,79 d	1,48 d	MR
2562	1,00 c	1,00 b	1,03 d	1,43 de	1,94 c	1,78 d	1,36 d	MR
5503	1,21 b	1,17 b	1,17 cd	1,08 ef	1,25 d	1,35 e	1,20 e	MR
7569	1,00 c	1,15 b	1,53 bc	2,00 bc	1,93 c	2,10 c	1,62 c	MR
Bio266	1,00 c	1,00 b	1,00 d	1,00 f	1,00 d	1,00 f	1,00 f	R
3127	1,00 c	1,00 b	1,10 cd	1,13 ef	1,18 d	1,38 e	1,13 e	MR
5000	1,00 c	1,00 b	1,78 b	2,26 b	2,93 b	3,12 b	2,01 b	MS
6163	1,98 a	2,46 a	3,29 a	3,98 a	4,00 a	4,00 a	3,29 a	S

*Letras iguais não diferem dos demais tratamentos na coluna pelo teste LSD-Fisher ($p < 0,05$). MAP: meses após o plantio. CL: classe de resistência, S: suscetível, MS: moderadamente suscetível, MR: moderadamente resistente e R: resistente.

Com a aplicação da escala de notas de sintomas e o cálculo da média das avaliações fenotípicas ao longo dos seis meses, foi possível discriminar as classes de resistência e de suscetibilidade das cultivares ao ScYLV. Das oito cultivares utilizadas no ensaio de campo, apenas uma (12,5%), a IACBIO-266 foi classificada como resistente (nota 1,0), apresentando folhas sem vestígios de sintomas do ScYLV ao

longo dos seis meses de avaliação. As cultivares IACSP95-5000 e SP71-6163 foram classificadas como moderadamente suscetível (nota 2,01) e suscetível (nota 3,29), respectivamente, apresentando os sintomas mais evidentes através do fenótipo das plantas, correspondendo à 25% das cultivares avaliadas (Tabela 2).

Um grupo específico formou-se com 62,5% das cultivares, classificadas como moderadamente resistentes, com notas médias entre 1,13 e 1,62, sendo elas: IACSP01-5503, IACSP95-5094, IACSP96-7569, IACSP01-3127 e IACCTC05-2562. Mesmo com notas relativamente baixas, essas cinco cultivares apresentaram plantas com um leve e constante aumento em suas notas médias de sintomas ao longo do período de avaliação.

3.2 Quantificação do título viral ao longo do tempo via RT-qPCR

O uso da técnica de RT-qPCR para a estimativa do título viral via quantificação relativa (QR) DO ScYLV ao longo do tempo de avaliação, trouxe informações importantes em termos da multiplicação do vírus nas cultivares avaliadas. Conforme descrito por Chinnaraja et al. (2014), esta metodologia fornece maior acurácia da quantificação da concentração viral quando comparada a outras técnicas.

O ScYLV foi detectado em todas as cultivares de cana-de-açúcar em pelo menos uma das avaliações, revelando que nenhuma cultivar é imune ao vírus, diferindo apenas o perfil do seu título viral. Na maioria das cultivares, classificadas como moderadamente resistentes (IACSP95-5094, IACSP01-5503 e IACSP01-3127), foi detectado um predomínio na diminuição do título viral em relação a primeira coleta (0 MAP). As cultivares IACSP95-5094, IACSP01-5503 e IACSP01-3127 atingiram a maior diminuição do título viral na última coleta (12 MAP), respectivamente -3,6, -4,8 e -23,7 vezes em relação a 0 MAP. As cultivares IACSP01-5503 e IACSP01-3127 não foram analisadas na 8 MAP.

É importante notar que foram detectados aumentos expressivos do título viral em relação a primeira coleta (0 MAP) nas cultivares moderadamente resistentes IACSP96-7569 e IACCTC05-2562, em pelo menos um dos pontos de coletas (8, 10 e 12 MAP). Na IACSP96-7569, foi detectado um aumento do título viral gradativo em até 123,3 vezes (12 MAP) em comparação ao primeiro ponto de coleta (0 MAP).

Enquanto na cultivar IACCTC05-2562 foi detectado um aumento do título viral de 64,70 vezes na coleta 8 MAP e uma diminuição de -1,5 vezes na coleta 10 MAP em relação à 0 MAP (a coleta 12 MAP não foi avaliada). (Tabela 3, Figura 9).

Houve variação no título viral ao longo do tempo para a cultivar moderadamente susceptível IACSP95-5000, apresentando maior aumento na coleta 8 MAP (68,27 vezes em relação a 0 MAP) (Figura 9, Tabela 3). Nas coletas 10 e 12 MAP identificou-se que o título viral nessa cultivar permaneceu superior em relação ao tempo inicial 0 MAP (18,3 e 18,4 vezes, respectivamente) (Tabela 3). Nesse caso, foi constatado que o vírus aumentou seu título em relação ao tempo 0 MAP em todas as coletas avaliadas, porém com mudança temporal não progressiva (Figura 9, Tabela 3).

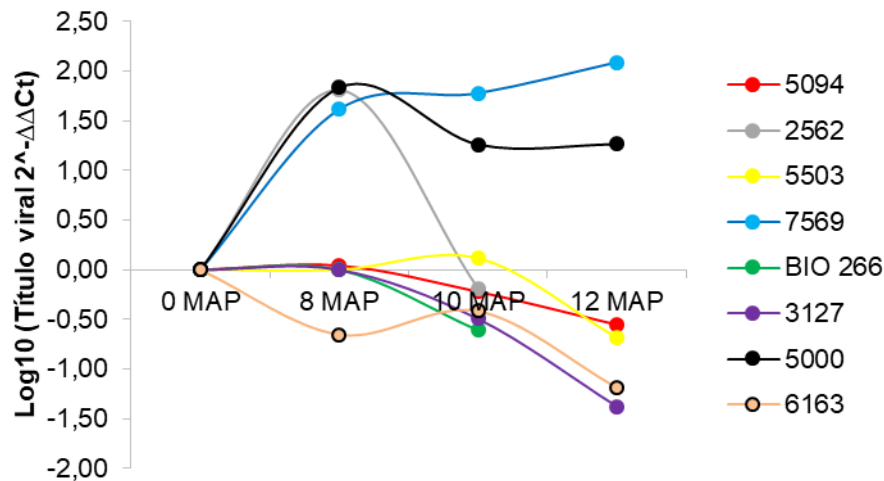


Figura 9. Evolução do título viral no decorrer do tempo em oito cultivares de cana-de-açúcar calculada via RT-qPCR. MAP: meses após o plantio.

Tabela 3. Valores de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ na quantificação do título do ScYLV, via RT-qPCR, nas oito cultivares de cana-de-açúcar ao longo do tempo.

Cultivares	0 MAP	8 MAP	10 MAP	12 MAP
		$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$		
5094	1,00	1,10	-1,7	-3,6
2562	1,00	64,70	-1,5	x
5503	1,00	x	1,31	-4,8
7569	1,00	41,36	60,13	123,32
Bio266	1,00	-	-3,7	-
3127	1,00	x	-3,13	-23,7
5000	1,00	68,27	18,26	18,38
6163	1,00	-4,5	-2,61	-15,42

MAP: meses após o plantio; 0 MAP: 1ª coleta; 8 MAP: 2ª coleta; 10 MAP: 3ª coleta; 12 MAP: 4ª coleta; x: amostras não analisadas; -: não detectado.

A suscetibilidade da cultivar SP71-6163 se confirmou por meio da fenotipagem

em campo com as maiores notas para severidade de sintomas (predominantemente 4,0), no entanto foi observado uma diminuição no título viral em mais de 15 vezes em relação à primeira coleta de folhas (0 MAP). Já a cultivar resistente IACBIO-266 foi a única que não apresentou sintomas fenotípicos durante o ensaio de campo, elucidando uma alta classe de resistência ao ScYLV. Perante a quantificação viral por meio da técnica RT-qPCR foi demonstrado que as plantas estavam infectadas com o vírus, porém seu título viral diminuiu no decurso do tempo, até atingir níveis não detectáveis (8 e 12 MAP) (Tabela 3 e 4, Figura 9).

4. DISCUSSÃO

O uso da técnica de RT-qPCR para a estimativa do título viral via quantificação relativa (QR) do ScYLV ao longo do tempo de avaliação, trouxe informações importantes em termos da multiplicação do vírus nas cultivares avaliadas. Conforme descrito por Chinnaraja et al. (2014), esta metodologia fornece maior acurácia da quantificação da concentração viral quando comparada a outras técnicas.

As avaliações fenotípicas de severidade dos sintomas do ScYLV em cultivares de cana-de-açúcar durante as avaliações de campo foram complementados pela quantificação do título viral, via RT-qPCR, uma ferramenta de diagnóstico molecular de alta precisão (Gonçalves et al., 2002). Ao mesmo tempo, o diagnóstico por RT-qPCR também confirmou a transmissão do ScYLV para todas as cultivares de cana-de-açúcar, por meio do seu principal vetor, o pulgão *M. sacchari*.

As variações existentes nos padrões de expressão dos sintomas da infecção pelo ScYLV com diferentes níveis de severidade da doença entre as plantas indicam diferentes níveis de resistência das cultivares. Essa doença é amplamente reconhecida visualmente pela expressão de seus sintomas característicos, que pode ser favorecida sob condições de estresse intenso, como seca ou frio (Bertani et al., 2014; Bagyalakshmi e Viswanathan, 2021). A partir do oitavo MAP (julho) os sintomas tornaram-se mais evidentes, com notas acima de 3,0, alcançando maior expressão entre 10 e 11 MAP (setembro e outubro), estando esses os períodos que precedem

esses meses caracterizados por estiagem e baixas temperaturas na região onde o experimento foi conduzido.

A escala de notas de severidade de sintomas (1,0 - 4,0) aplicada nesse estudo, também foi utilizada por Burbano et al. (2021) em avaliações fenotípicas a campo durante a avaliação de resistência do ScYLV em 98 genótipos de cana-de-açúcar. Os autores relatam ainda que a incidência do amarelinho foi confirmada em 95,55% dos genótipos através da técnica RT-qPCR, dos quais 83% eram plantas assintomáticas. O mesmo foi diagnosticado em nosso ensaio, onde durante as avaliações de campo, cultivares foram caracterizadas como resistentes ou moderadamente resistente (1,0 - 2,0), apresentando nenhum ou pouco sintomas visuais, porém confirmado via RT-qPCR. Observou-se que nenhuma cultivar avaliada foi imune ao vírus no decorrer do período de avaliação, com 100% das plantas infectadas. Viswanathan et al. (2009) descrevem que fatores envolvendo plantas assintomáticas em campo podem favorecer a disseminação do vírus para novas áreas e plantios através, por exemplo, do uso de gemas infectadas dessas plantas.

A técnica RT-qPCR apresenta alta especificidade na detecção de vírus de plantas (Peiman e Xie, 2006) e disponibilizou informações precisas quanto a quantificação relativa do título viral de ScYLV entre as diferentes cultivares de cana-de-açúcar, constituindo uma ferramenta eficiente de diagnóstico para melhoristas (Zhu et al., 2010). Corroborando com nosso estudo, os resultados apresentados por Zhu et al. (2010) indicaram também associações positivas entre o título viral das cultivares de cana-de-açúcar e os sintomas causados pelo ScYLV.

O uso de escalas de notas de sintomas para a caracterização de doenças em plantas e a identificação de níveis de resistência, são amplamente utilizados por pesquisadores em diversas culturas como, milho (da Silva et al., 2020), mandioca (de Oliveira et al., 2020), batata (Guedes et al., 2020), soja (Gabardo et al., 2020) entre outros. Na cana-de-açúcar o método foi aplicado recentemente com sucesso por Bagyalakshmi e Viswanathan (2021), os quais avaliaram por três anos a presença do Sugarcane mosaic vírus (SCMV) em 210 genótipos de cana-de-açúcar em campo, observando o mesmo vírus Pinto et al. (2013) também avaliaram outros 55 genótipos em casa de vegetação. A precisa identificação de fontes de resistência de vírus em plantas depende da expressão clara dos sintomas influenciada pela estirpe do vírus,

sua virulência, fatores ambientais, diferenças fisiológicas e morfológicas entre cultivares e a idade das plantas (Cronje et al., 1994; Gonçalves et al., 2012).

Em um estudo com 79 genótipos de cana-de-açúcar, da Silva et al. (2015) identificaram e caracterizaram níveis de suscetibilidade e resistência ao sugarcane mosaic virus, através da aplicação da técnica PTA-ELISA, em combinação com o uso de escala de notas de severidade dos sintomas foliares causado por este vírus. De maneira semelhante ao nosso estudo, a combinação de técnicas para avaliar e classificar a classe de resistência das plantas mostrou ser eficiente na correlação dos dados e na identificação de possíveis fontes de resistência ao ScYLV, sendo a avaliação periódica de sintomas fenotípicos feita pela escala de notas complementada pela quantificação do título viral ao longo do tempo (meses após a inoculação) aliada à capacidade de detecção do vírus em cultivares assintomáticos pela técnica de RT-qPCR.

Se tratando de parasitas obrigatórios intracelulares, o ScYLV é reconhecido a campo pela expressão fenotípica das plantas por meio de diferentes níveis de severidade dos sintomas foliares, diferenciando a gravidade da doença e as possíveis classes de resistência (Bagyalakshmi e Viswanathan, 2021). Politowski e Browning (1978) e Thresh et al. (2008) relatam que plantas consideradas resistentes a um determinado patógeno não são facilmente infectadas, mesmo quando expostas a uma pressão maior de inóculo, e quando infectadas, podem desenvolver sintomas fracos ou mesmo imperceptíveis. Os autores expõem ainda que o termo resistência compreende, portando, uma correlação entre dois fatores: a expressão fenotípica dos sintomas e a quantificação do título viral nas plantas, como realizado em nosso trabalho.

As variações na severidade dos sintomas foliares e no título viral no decorrer do tempo observadas entre as cultivares de cana-de-açúcar evidenciam que ao menos dois fatores estão atuando na resposta das plantas. Um parece restringir a expressão fenotípica dos sintomas mesmo com o aumento do título viral, como nas cultivares IACSP96-7569 e na IACCTC05-2562 e, o outro inibe o acúmulo de vírus na planta, como nas cultivares IACBIO-266, IACSP95-5094, IACSP01-5503 e IACSP01-3127.

As diferenças nas características morfológicas e fisiológicas existentes entre as

cultivares avaliadas, na forma de barreiras mecânicas como quantidade e tamanho de tricomas ou a dificuldade na quebra da parede celular ou repelentes olfativos presentes na superfície das folhas (Van Helden et al., 1993) constituem a primeira linha de autodefesa superficial contra o ataque de insetos vetores. Esses fatores podem estar envolvidos nos resultados observados nos grupos de cultivares caracterizados como resistente (12,5%) e moderadamente resistente (62,5%).

Ressalta-se a importância da realização de novas avaliações entre as cultivares para o avanço no âmbito do melhoramento genético de cana-de-açúcar, como a condução de experimentos até a primeira cana soca, verificando assim a possível permanência de plantas assintomáticas em campo. Izaguirre-Mayoral et al. (2002) enfatizam que os sintomas do ScYLV não identificados na primeira cana soca, de genótipos inicialmente caracterizados como imunes, tornaram-se evidentes após a condução da segunda cana soca. Rassaby et al. (2003) confirmaram ainda que em cultivares assintomáticos, a infecção pelo vírus pode causar redução próxima a 30% na produção final de cana-de-açúcar, indicando que as plantas podem apresentar alto título viral a despeito da ausência de sintomas.

Ainda, segundo Fartek et al. (2012), o estudo das interações existentes entre planta-vírus-vetor baseando-se na expressão fenotípica dessas interações, assim como no comportamento alimentar, desempenho biológico e preferência dos afídeos, aliado ao mapeamento genético, são formas de avaliar e selecionar genótipos com resistência durável ao ScYLV. Legg et al. (2014) descrevem a importância de se desenvolver estratégias para restringir a disseminação de vírus de plantas, buscando o controle de doenças por meio da seleção e introdução de novas variedades com elevado potencial de resistência, que podem inibir a replicação do vírus e assim reduzir a fonte de inóculo.

Com êxito, investigamos os índices de expressão fenotípica dos sintomas causados pelo vírus diretamente no campo, e monitoramos a carga relativa do ScYLV no decorrer do tempo, através de amostragens periódicas de folhas do ensaio de campo. Dessa forma, foi possível correlacionar os resultados das duas técnicas de avaliação nas oito cultivares de cana-de-açúcar, confirmando a variabilidade genotípica existente entre elas e formando grupos com características específicas quanto a classes de resistência ao ScYLV.

A infecção pelo ScYLV foi constatada em todos as cultivares de cana-de-açúcar avaliados, porém, seus índices variaram tanto na expressão dos sintomas como no título viral ao longo das avaliações, indicando resposta diferencial das cultivares à infecção pelo vírus. Prevê-se que os resultados aqui apresentados possam ser incorporados no avanço das pesquisas sobre o tema em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

5. CONCLUSÕES

Pelo critério de fenotipagem de campo através de escala sintomática de notas as cultivares IACSP95-5094, IACCTC05-2562, IACSP01-5503, IACSP96-7569 e IACSP01-3127 foram classificadas como moderadamente resistente, IACSP95-5000 como moderadamente suscetível, IACBIO-266 como resistente e a SP71-6163 como suscetível ao ScYLV.

Pelo critério de quantificação do título viral via RT-qPCR expressos por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, as cultivares avaliadas apresentaram uma tendência de diminuição no título viral ao longo do tempo, exceto as cultivares IACSP96-7569 e IACS95-5000, sendo a primeira moderadamente resistente e a segunda moderadamente susceptível. A cultivar resistente IACBIO-266 foi a única que apresentou níveis não detectáveis do vírus com o passar do tempo.

Os resultados obtidos, de avaliação de sintomas e titulação viral ao longo do tempo, sugerem a atuação de dois fatores na resposta das plantas: *i.* restrição da expressão fenotípica dos sintomas mesmo com o aumento do título viral; *ii.* inibição do acúmulo de vírus na planta.

O título do vírus e a expressão dos sintomas em campo foram variáveis entre as cultivares de cana-de-açúcar avaliadas. O ScYLV foi detectado em todas as cultivares de cana-de-açúcar avaliadas, em pelo menos um dos períodos avaliados, portanto, nenhuma apresentou imunidade ao vírus.

6. REFERÊNCIAS

Abu Ahmad Y, Royer M, Daugrois JH, Costet L, Lett JM, Victoria JI, Girard JC, Rott P (2006) Geographical distribution of four sugarcane yellow leaf virus genotypes. **Plant Disease** 90:1156-1160.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research** 64(15):5245-5250.

Bagyalakshmi K, Viswanathan R (2021) Development of a scoring system for sugarcane mosaic disease and genotyping of sugarcane germplasm for mosaic viruses. **Sugar Tech** 1-13.

Bertani RP, Perera MF, Arias ME, Luque C, Funes C, González V, Cuenya MI, Ploper LD, Welin B, Castagnaro AP (2014) A study of the sugarcane yellow leaf disease in Argentina. **Plant Disease Journal** 98:1036-1042.

Borth W, Hu JS, Schenck S (1994) Double-stranded RNA associated with sugarcane yellow leaf syndrome. **Sugar Cane** 3:5-8.

Burbano RC, Gonçalves MC, Nobile PM, dos Anjos IA, da Silva MF, Perecin D, Anjos LOS, Fernandes VBVR, Pinto, LR (2021) Screening of *Saccharum* spp. genotypes for sugarcane yellow leaf virus resistance by combining symptom phenotyping and highly precise virus titration. **Crop Protection** 144:105577.

Cronje CPR, Bechet GR, Bailey RA (1994) Symptom expression of sugarcane mosaic virus (SCMV) and associated effects on sugarcane yield. **Proceedings of South African Sugar Technologists** 68:8-11.

Cronje CPR, Bailey RA, McFarlane K (1998) Update on the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal agent. **Proceedings of South African Sugar Technologists** 72:81-84.

Comstock JC, Irey MS, Lockhart BEL, Wang ZK (1998) Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. **Sugar Cane** 4:21-24.

Chinnaraja C, Viswanathan R, Sathyabhama M, Parameswari B, Bagyalakshmi K, Malathi P, Neelamathi D (2014) Quantification of sugarcane yellow leaf virus in Quantificativo vitro plantlets and asymptomatic plants of sugarcane by RT-qPCR. **Current Science** 106:729-734.

Chinnaraja C, Viswanathan R (2015) Quantification of sugarcane yellow leaf virus in sugarcane following transmission through aphid vector *Melanaphis sacchari*. **Virus**

Disease 26:237-242.

Da Silva MF, Gonçalves MC, Pinto LR, Perecin D, Xavier MA, Landell MG (2015) Evaluation of Brazilian sugarcane genotypes for resistance to sugarcane mosaic virus under greenhouse and field conditions. **Crop Protection** 70:15-20.

da Silva DD, Cota LV, da Costa RV (2020). Como manejar doenças foliares em milho. Embrapa Milho e Sorgo. **Revista Plantio Direto** 34-44.

de Oliveira SAS, Diamantino MSAS, Diniz RP, de Oliveira EJ (2020). Escala de notas inespecíficas para seleção de plantas de mandioca resistentes a doenças foliares. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 112 14 p. ISSN: 1809-5003

EMBRAPA (2018) **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. Ed., rev. e ampl. Brasília-DF: Embrapa Solos, 356 p.

Fartek B, Nibouche S, Turpin P, Costet, Reynaud B (2012) Resistance to *M. sacchari* in the sugarcane cultivar R 365. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 144:270-278.

Gabardo G, Dalla Pria M, da Silva HL, Harms MG (2020). Método da folha destacada para avaliação da indução de resistência de produtos alternativos a *Phakopsora pachyrhizi*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* em soja. **Brazilian Journal of Development**, 6(7):43847-43862.

Grisham MP, Eggleston G, Hoy JW, Viator RP (2009) The effect of sugarcane yellow leaf virus infection on yield of sugarcane in Louisiana. **International Sugar Journal** 27:3-91.

Gonçalves MC, Klerks MM, Verbeek M, Vega J., Van den Heuvel JFJM (2002) The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of sugarcane yellow leaf virus. **European Journal of Plant Pathology** 108:401-407.

Gonçalves MC, Vega J, Oliveira JG, Gomes MMA (2005) Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. **Fitopatologia Brasileira** 30:10-16.

Gonçalves MC, Pinto LR, Souza SC, Landell MGA (2012) Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. **Functional Plant Science & Biotechnology** 6:108-116.

Garzo E, Moreno A, Plaza M, Fereres A (2020) Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides. **Plants** 9(7):895.

Guedes ML, Andrade MHML, Chagas RR, Carvalho RP, Fernandes Filho CC, Pinto CABP (2020). Escalas diagramáticas para avaliação do fenótipo de tubérculos de

batata. **Revista Cultura Agronômica** 29:274-288.

Izaguirre-Mayoral ML, Carballo O, Alceste C, Romano M, Nass HA (2002) Physiological performance of asymptomatic and yellow leaf syndrome-affected sugarcane in Venezuela. **Journal of Phytopathology** 150:13-19.

Kaiser HF (1958) The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika** 23:187-200.

Kaweesi T, Kawuki R, Kyaligonza V, Baguma Y, Tusiime G, Ferguson ME (2014). Field evaluation of selected cassava genotypes for cassava brown streak disease based on symptom expression and virus load. **Virology journal**, 11:1-15.

Komor E (2011) Susceptibility of sugarcane, plantation weeds and grain cereals to infection by sugarcane yellow leaf virus and selection by sugarcane breeding in Hawaii. **European Journal of Plant Pathology** 129:379-388.

Legg J, Somado EA et al. (2014). A global alliance declaring war on cassava viruses in Africa. **Food Security** 6:231-248.

Lehrer AT, Schenck S, Yan SL, Komor E (2007) Movement of aphid-transmitted sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) within and between sugarcane plants. **Plant Pathology** 56:711-717.

Lehrer AT, Komor E (2008) Symptom expression of yellow leaf disease in sugarcane cultivars with different degrees of infection by sugarcane yellow leaf virus. **Plant Pathology** 57:178-189.

Lehrer AT, Wu KK, Komor E (2009). Impact of sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) on growth and sugar yield of sugarcane. **Journal of General Plant Pathology**, 75:288-296.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ method. **Methods** 25:402-408.

Moonan F, Molina J, Mirkov TE (2000) Sugarcane yellow leaf virus: an emerging virus that has evolved by recombination between luteoviral and poleroviral ancestors. **Virology** 269:156-171.

Peiman M, Xie C (2006). Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. **Australas Plant Disease Notes**, 1:41-6.

Pinto LR, Gonçalves MC, Galdeano DM, Perecin D, Medeiros CNF, Gonçalves BS, Mancini MC, Landell MGA (2013) Preliminary investigation of sugarcane mosaic virus resistance and marker association in a sugarcane family sample derived from a bi-parental cross. **International Society of Sugar Cane Technologists**, 28:1-3.

Politowski K, Browning JA (1978) Tolerance and resistance to plant disease: an

epidemiological study. **Phytopathology** 68:1177-1185.

Rassaby L, Girard JC, Letourmy P, Chaume J, Irely MS, Lockhart BE, Kodja H, Rott P (2003) Impact of sugarcane yellow leaf virus on sugarcane yield and juice quality in Reunion Island. **European Journal of Plant Pathology** 109:459-466.

Ramouthar PV, Berry SD, Rutherford RS, MCFarlane SA (2013) Yield loss due to sugarcane yellow leaf virus and its prevalence in the South African sugar industry. **South African Sugar Technologists' Association** 86:244-254.

Rutherford RS, Brune AE, Nuss KJ (2004) Current status of research on sugarcane yellow leaf syndrome in Southern Africa. **Proceedings of South African Sugar Technologists** 78:173-180.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research** 37:6, 45.

STATSOFT (2007) **Statistica**: data analysis software system, version 7. Tulsa.

SAS INSTITUTE (2013) SAS/STAT user's guide, version 9.3. Cary: SAS.

Schenck S (1990) Yellow leaf syndrome a new sugarcane disease. In: **Experiment Station Hawaiian Sugar Planters**. Association Annual Report, 38 p.

Schenck S, Hu JS, Lockhart BE (1997) Use of a tissue blot immunoassay to determine the distribution of sugarcane yellow leaf virus in Hawaii. **Sugar Cane** 4:5-8.

Schenck S (2001). Sugarcane yellow leaf syndrome: history and current concepts. In: Rao GP, Ford RE, Tomic M, Teakle DS, (Eds). **Sugarcane Pathology**, Vol. II: Virus and Phytoplasma Diseases. Editora: Science Publishers Inc, p. 25-35.

Thresh JM, Otim-Nape GW, Fargette D (2008) The components and deployment of resistance to cassava mosaic virus disease 3:209-224.

Van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graph. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 68:269-278.

Vega J, Scagliusi SM, Ulian EC (1997) Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence for association with a Luteovirus. **Plant Disease** 81:21-26.

Viswanathan R, Karuppaiah R, Malathi P, Ganesh Kumar V, Chinnaraja C (2009) Diagnosis of sugarcane yellow leaf virus in asymptomatic sugarcane by RT-PCR. **Sugar Tech** 11:368-372.

Viswanathan R, Chinnaraja C, Parameswari B, Chhabra ML (2016) Status of yellow leaf resistance in sugarcane germplasm and parental clones at Sugarcane Breeding

Institute, India. **International Sugar Journal** 118:60-71.

Zhu YJ, Lim ST, Schenck S, Arcinas A, Komor E (2010) RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of ScYLV titre to yield. **European Journal of Plant Pathology** 127:263-273.

CAPÍTULO 3 - Effect of Sugarcane Cultivars Infected with Sugarcane Yellow Leaf Virus (ScYLV) on Feeding Behavior and Biological Performance of *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae)¹

Luiz Eduardo Tilhaqui Bertasello ¹, Michele Carmo-Sousa ², Nathalie K. Prado Maluta ², Luciana Rossini Pinto ^{1,3}, João R. Spotti Lopes ^{2*} and Marcos Cesar Gonçalves ^{1,4*}

¹ School of Agricultural and Veterinarian Sciences – FCAV, São Paulo State University - UNESP., Jaboticabal, São Paulo, 17884-900 Brazil; luiz.bertasello@unesp.br (L.E.T.B.); luciana.rossini@sp.gov.br (L.R.P.)

² Dep. of Entomology and Acarology, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), University of São Paulo -, Piracicaba, São Paulo, 13418-900, Brazil; m.sousatimossi@gmail.com, nathaliepradomaluta@gmail.com

³ Sugarcane Research Centre, Instituto Agronômico de Campinas - IAC, Ribeirão Preto, São Paulo, 14001-970, Brazil

⁴ Crop Protection Research Centre - Instituto Biológico - IB, São Paulo, 04014-002, Brazil

* Correspondence: jrslopes@usp.br (J.R.S.L.); marcos.goncalves@sp.gov.br (M.C.G.); Tel.: +55-11-50871767

Abstract - *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV), *Polerovirus*, *Luteoviridae*, is one of the main viruses that infect sugarcane worldwide. The virus is transmitted by the aphid *Melanaphis sacchari* in a persistent, circulative manner. To better understand the interactions between ScYLV, sugarcane genotypes and *M. sacchari*, we explored the effect of sugarcane cultivars on the feeding behavior and biological performance of the vector. The number of nymphs, adults, winged, total number of aphids and dead aphids was assayed, and an electrical penetration graph (EPG) was used to monitor the stylet activities. Multivariate analysis showed changes in the vector's behavior and biology on cultivars, identifying specific groups of resistance. In the cultivar 7569, only 5.5% of the insects were able to stay longer on sustained phloem ingestion, while in the other seven cultivars these values varied from 20% to 60%. *M. sacchari* showed low phloem activities in cultivars 7569 and Bio266. Overall, cultivar 7569 showed the worst biological performance of aphids, with the insects presenting mechanical difficulties for feeding and a shorter duration of the phloem period, and thus being considered the most resistant. We conclude that ScYLV virus infection in different sugarcane cultivars induced specific changes in the host plant, modifying the behavior of its main vector, which may favor or impair virus transmission.

Keywords: aphid performance; electrical penetration graph; probing behavior; plant virus resistance; *Saccharum* spp.

1. Introduction

Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV), genus *Polerovirus*, family *Luteoviridae*, responsible for the yellow leaf disease (YLD) of sugarcane, is restricted to the plant phloem [1] and efficiently transmitted by the aphid *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae) in a persistent, circulative and non-propagative manner [2]. Leaf yellowing is the characteristic symptom of ScYLV infection, starting from the midrib of the abaxial leaf surface and, in advanced stages, spreading through the leaf blade, while the midrib of the adaxial surface presents a reddish color [3], shortening of the stalks' internodes [4] and accumulation of sucrose in the phloem [5]. The virus has become endemic in the main producing

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico publicado na revista *Plants* MDPI (JCR: 3.935).

Recebido: 08 setembro 2021, Aceito: 27 setembro 2021, Publicado: 06/10/2021.

* O capítulo (artigo) se encontra nas normas de publicação da referida revista.

countries [6] and remains a major concern for sugarcane producers [7], causing field losses of 20 to 60% in susceptible cultivars [8–10], and of up to 14% in sugar net yield [11].

Viruses can modify directly or indirectly the behavior of their vectors to increase the chances of transmission to new hosts [12]. These behavioral changes can occur in different ways, depending on whether they result from the presence of the virus in the vector body (direct effect), or mediated by physiological changes in the host plant (e.g., sugar content and leaf color) as a result of infection by the pathogen, which can modulate the behavior and performance of the vector in the host (indirect effect) [13]. These changes allow the virus to influence the vector's landing, performance, feeding behavior and stylet activities in the host plant [14]. Thus, the transmission of plant viruses by their arthropod vectors is mediated by specific interactions between the plant, the virus and the vector [15].

One of the determining factors in viral epidemiology is the interactions between viruses and their vectors [16], and the advance in knowledge between these interrelationships is essential in the development of new disease management strategies and in the selection of resistant cultivars. In this context, hemipterans are responsible for more than 70% of all plant viruses transmitted by insects, featuring the high number of vector species and their economic importance [17,18].

Several physicochemical changes can occur in host plants due to viral infection, causing changes in the volatile composition, color, hormonal, nutritional and water status of the plants [19,20], which can modulate the behavior of host choice by insect vectors and may favor the spread of the virus to new plant hosts [14,21–23]. Persistent, circulative-transmitted viruses can induce changes in infected plants [21], which can alter the feeding behavior of these insects [21,24] and may directly interfere with the acquisition and inoculation processes of the pathogen [14,25]. Additionally, any physiological or morphological modification in plants can interfere in the feeding behavior of insects and, consequently, in their biological performance and virus transmission.

The feeding behavior activities of sap-sucking insects can be monitored in real time by the electrical penetration graph (EPG) technique, an important tool enabling the study of an aphid's stylet activities [26]. Hence, EPG is considered a fundamental tool for development of the research encompassing insect vectors and the transmission of plant pathogens [17], with excellent efficiency in plant–virus–vector interaction studies, incorporating the characterization of host plant resistance to the insect vector [27].

The different EPG waveforms have been characterized after numerous observations on the feeding behavior of aphids [26,28–30], and the different stylet activities of these insects in host plants are associated with biological activities. EPG waveforms have been characterized based on the amplitude, frequency and origin of the electrical signal (resistance or electromotive force) [31,32].

The research hypothesis of this work is that ScYLV-infected sugarcane cultivars possibly possess specific features modified by the virus and intrinsic degrees of resistance, which can affect the biology and feeding behavior of *M. sacchari* in a distinct way, allowing the identification of sources of resistance to the vector. Hence, the objective of this work was to determine the effect of eight ScYLV-infected sugarcane cultivars on the feeding behavior and biological performance of *M. sacchari*, and to identify cultivars that present some type of resistance to the vector and consequently are expected to reduce the virus transmission rate in the field.

2. Results

2.1. Effects of ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars on the Life History of *M. sacchari*

Differences were identified in all biological parameters evaluated ($p < 0.05$) between cultivars (Figure 1). From a Fisher's test comparison, it was observed that the number of nymphs was significantly higher in cultivars Bio266 and 5000 than in the other treatments; lower in cultivars 5094, 5503 and 7569; and intermediate in cultivars 2562, 3127 and 6163 ($p = 0.04$) (Figure 1A).

The number of adults was significantly higher in cultivar Bio266, followed by cultivar 5000; lower in cultivars 5094, 5503, 7569 and 6163; and intermediate in cultivars 2562 and 3127 (Figure 1B). A similar trend was observed for the total number of aphids (Figure 1D). The highest average mortality rate of *M. sacchari* was observed in cultivar 3127, showing significant differences in relation to the other cultivars ($p = 0.01$), (Figure 1C).

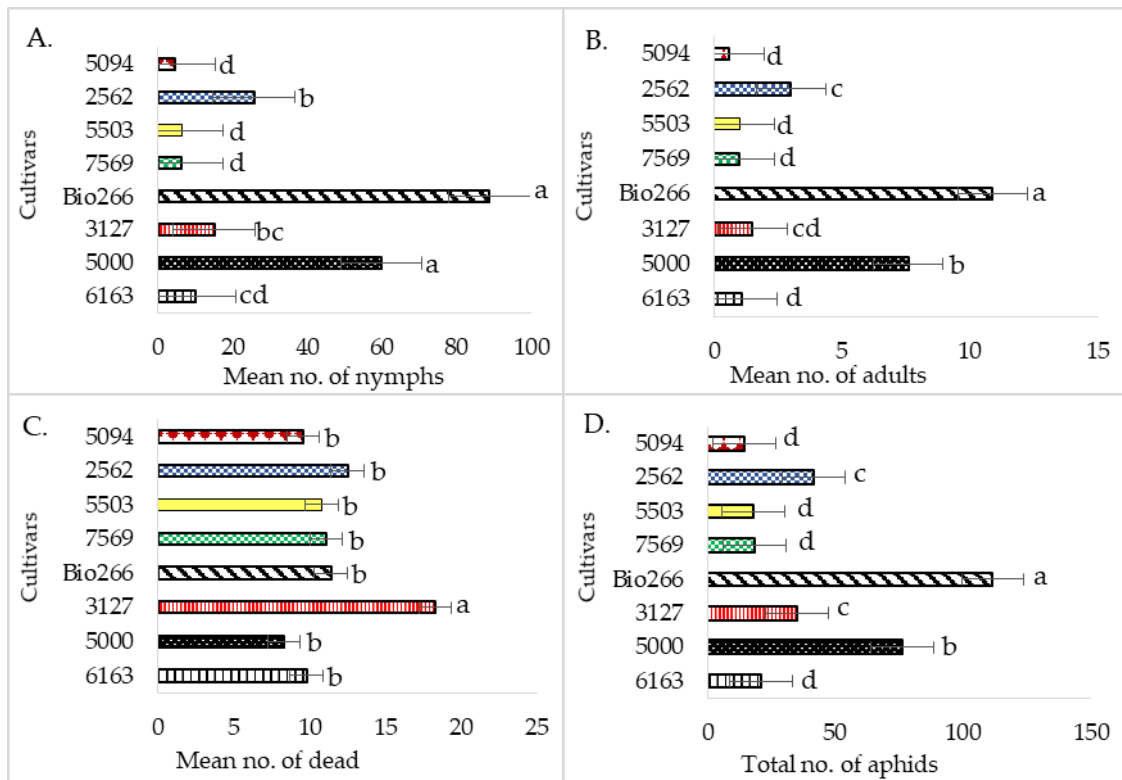


Figure 1. Effect of sugarcane cultivars infected with ScYL on the biological performance of *M. sacchari*. Mean \pm SE that share the same letter for each parameter are not significantly different ($p > 0.05$). Statistical comparisons between treatments for each parameter were done using the non-parametric Kruskal–Wallis test or parametric ANOVA/Fisher test (A, B, C and D).

Kruskal–Wallis non-parametric analysis ($p > 0.05$) were applied to the mean index of winged insect's data, which showed differences with superior performance in cultivars 5000 and 2562, with means of 0.52 and 0.50, respectively, in comparison with the cultivars 5503, 5094 and 7569 (data not shown). The other cultivars did not differ from each other.

Through the multivariate exploratory analysis by principal components (PCA) regarding the dispersion pattern of sugarcane cultivars, the original variance contained in the data was 95.07% in the first two PCAs, fitting in the criterion proposed by Kaiser [33] (Table 1 and Figure 2). With the application of the two components, it was possible to correlate their factors and the variables, as the values were higher than 0.7. On PCA1, the variables that stood out with the greatest potential for discrimination explained 73.86% of the contained variance, whereas on PCA2 the representation was 21.21% of the original contained variance (Table 1).

Table 1. Factor-variable correlations in the first two main components for eight sugarcane cultivars regarding the biological performance of *M. sacchari* under no-choice conditions. Data submitted to multivariate exploratory analysis by principal components (PCA).

Variables	PC1	PC2
Mean no. of nymphs	0.98	0.04
Mean no. of adults	0.98	0.08
No. Winged	0.86	-0.29
No. Dead	-0.12	-0.98
Total	0.99	0.01
Eigenvalues	3.69	1.06
Variance (%)	73.85	21.21
Accumulated variance (%)	73.85	95.06

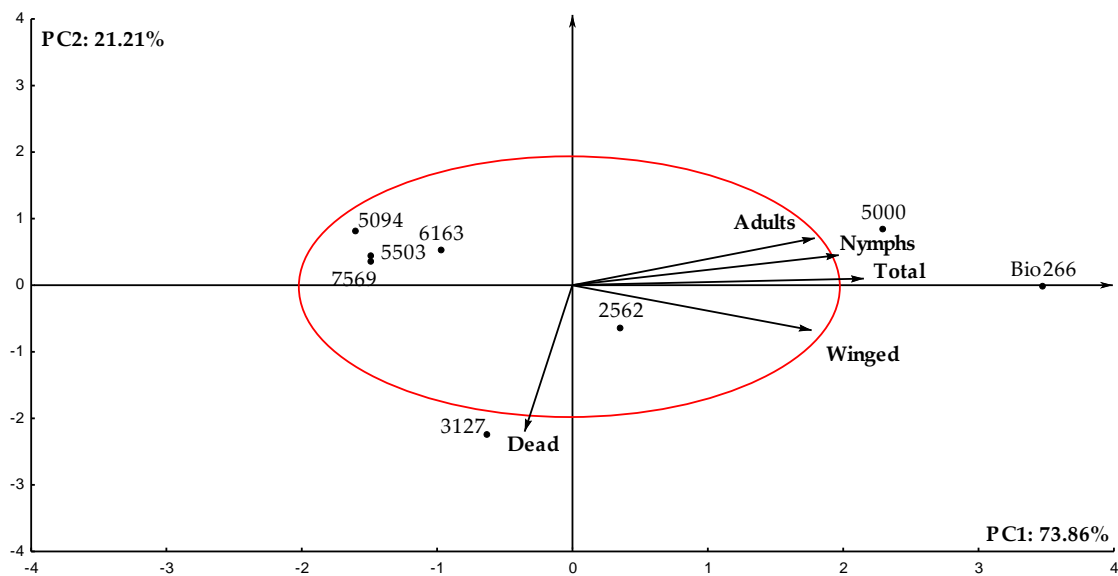


Figure 2. Biplot with dispersion of eight sugarcane cultivars regarding biological performance in the reproduction of wingless insects under no-choice conditions, analyzed seven days after release. Data submitted to exploratory multivariate principal component analysis (PCA).

By the dispersion presented in the two components formed for the eight sugarcane cultivars (PCA1 and PCA2), showed in the biplot graph, three cultivars are located outside the ellipse formed from -2 to 2 , indicating cultivars with specific biological performance features: Bio266, 5000 and 3127. The other five cultivars, located inside the ellipse, are considered without any specific performance feature; i.e., without major differences regarding the biological performance of wingless *M. sacchari* (Figure 2). Cultivars Bio266 and 5000 were discriminated with the best aphid performance, presenting the highest averages for number of nymphs, adults, winged and total aphids. However, considering the number of deaths, cultivar 5000 presented the lowest mortality rate, suggesting a greater acceptance of the cultivar by the insects (Figure 1C). On the other hand, cultivar 3127 showed the highest aphid mortality rate (18.3) by the end of the seventh day of recordings. Thus, it was possible to identify specific groups of interest regarding the biological performance of the vector, based on the lower or higher reproductive capacity of *M. sacchari* in cultivars infected with ScYLV.

Based on the Euclidean distance between the different parameters assayed, the cutoff point 2.18 was adopted and Ward's hierarchical clustering method was applied, with the results illustrated in the dendrogram showed in Figure 3. The cultivars were divided into three specific groups, namely, Group

1, Group 2 and Group 3. The formation of the three distinct groups, based on the similarity between the resulting parameters of the cultivars, corroborates the results found in the biplot distribution by the principal components method (Figure 2).

Group 1, formed by cultivars Bio266 and 5000, showed the highest biological performance index. This result corroborates the other analyzes, where the highest means were observed for the variables number of nymphs, adults, winged and total insects. The similarity formed within Group 2, encompassing cultivars 6163, 5094, 5503 and 7569 (Figure 3), all of them within the ellipse ranging from -2 to 2, with the lowest reproduction rates, number of nymphs, adults, winged and total insects, which confirms the results in the biplot (Figure 2). Group 3 (3127 and 2562) was strongly characterized by the highest mortality rate of *M. sacchari*, 18.3 and 12.5, respectively.

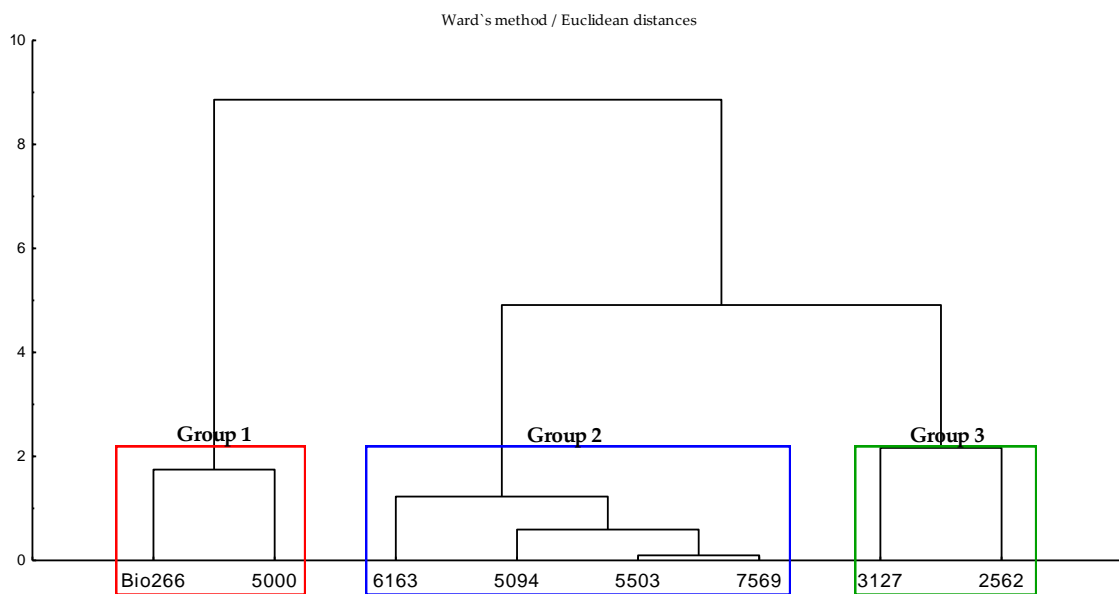


Figure 3. Dendrogram based on the Euclidean distance between eight sugarcane cultivars regarding the biological performance of wingless *M. sacchari* under no-choice conditions, analyzed seven days after release. Data submitted to multivariate exploratory cluster analysis using Ward's method.

2.2. Stylet Activities and Probing Behavior of *M. sacchari* in ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars

In the EPG experiment, differences were observed among cultivars in the feeding behavior and stylet activities of *M. sacchari* during the 8 hours of recording. Regarding the proportion of individuals that produced a specific type of waveform (PPW), no differences were observed on phloem waveforms E1 ($\chi^2 = 12.25$; $df = 7$; $p = 0.09$) and E2 ($\chi^2 = 12.37$; $df = 7$; $p = 0.09$), and the percentages of individuals that were able to perform activities in these vessels ranged from 16 to 66%.

Significant differences were observed in the proportion of individuals that performed the waveform (PPW) F ($\chi^2 = 31.01$; $df = 7$; $p < 0.01$), which indicates mechanical difficulty for penetration of the stylets during the probing behavior. This was observed in cultivars 5000 (22.2%), Bio266 (23.5%) and 6163 (27.8%), in which a smaller proportion of individuals performed a waveform F when, compared to cultivars 5094 (80%), 2563 (64.7%), 5503 (60%), 7569 (73.7%) and 3127 (76.5%). Moreover, differences were observed on the PPW corresponding to sustained phloem ingestion ($E2 > 10$ min) ($\chi^2 = 16.35$; $df = 7$; $p = 0.01$). E2s was markedly lower in cultivar 7569, in which only 5.5% of the aphids were able to ingest phloem sap for more than 10 minutes, whereas in the other treatments the percentage ranged from 20 to 61% (Supplementary Material Table S3). Regarding the non-sequential variables, differences were detected in the number (NWEI) of G, F, pd and E2s, and in the total duration of probing, non-probing, G, F, pd and E2. (Figure 4).

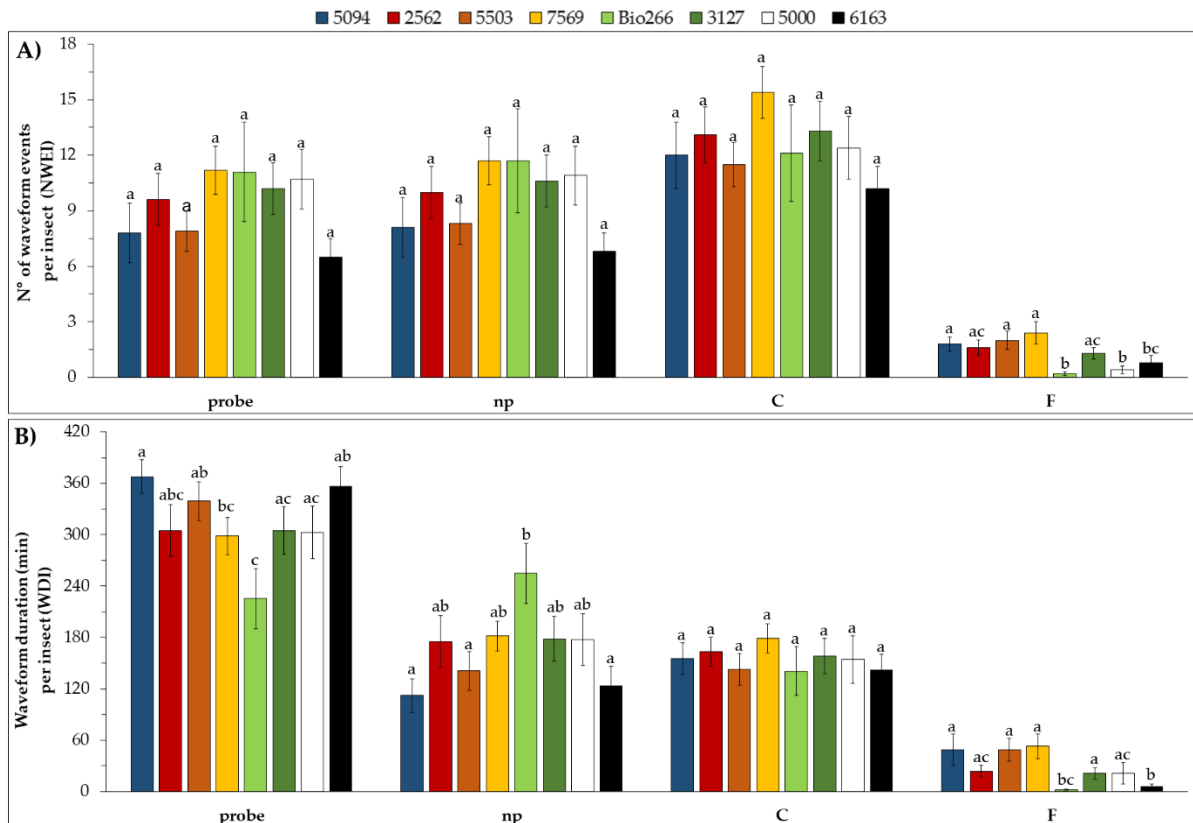


Figure 4. Mean \pm SE of the number of waveform event per insect (NWEI) (A) and the total waveform duration per insect (WDI) (B) of the non-phloematic parameters of non-viruliferous *M. sacchari* on ScYLV-infected sugarcane cultivars during 8 h of recording. The columns and bars represent the means and the standard error of the mean for each variable, respectively. Statistical comparisons between treatments (in the same EPG parameter) were conducted by a Tukey test (for Gaussian variables) or Kruskal–Wallis test (for non-Gaussian variables). Means that share the same letter for each variable are not significantly different ($p > 0.05$). Waveform C: stylet pathway; np: non-probing and probe; F: mechanical disturbance during feeding.

On the other hand, in the xylem phase (waveform G), the aphids performed activities in the xylem (NWEI, waveform G) less often in cultivar Bio266 ($H = 17.09$; $df = 7$; $p = 0.02$), and the total duration (WDI) of this phase was also shorter in this cultivar ($H = 24.10$; $df = 7$; $p < 0.01$). The number of brief intracellular punctures (waveform pd) was higher in cultivar 7569 compared to cultivars 5503, Bio266, 3127, 5000 and 6163, and lower in cultivar Bio266 compared to cultivars 5094, 2562, 5503 and 7569 ($H = 24.37$; $df = 7$; $p < 0.01$). The total duration (WDI, waveform pd) basically followed the same trend, being higher in cultivar 7569 compared to 5503, Bio266, 3127 and 5000, and shorter in cultivar Bio266 than in cultivars 5094, 2562, 7569 and 6163 ($H = 21.29$; $df = 7$; $p < 0.01$) (Supplementary Material Table S1).

The number (NWEI) of F was significantly higher in cultivars 7569, 5503, 5094, 2562 and 3127, and lower in cultivars Bio266, 5000 and 6163 ($H = 29.34$; $df = 7$; $p < 0.01$). In cultivars Bio266 and 6163, the insects spent less time performing activities associated with waveform F; that is, they had less mechanical difficulty with the stylets than in the other treatments ($H = 29.56$; $df = 7$; $p < 0.01$) (Figure 4).

The total duration of the probes (WDI) was shorter in cultivar Bio266 ($H = 14.88$; $df = 7$; $p = 0.04$) compared to cultivars 5094, 5503 and 6163, and the total duration of non-probing was lower in cultivars 5094, 6163 and 5503 compared to cultivar Bio266 ($H = 15.15$; $df = 7$; $p = 0.03$) (Figure 4).

Regarding the parameters associated to the phloem, differences were observed in the number (NWEI) of E1 ($H = 14.79$; $df = 7$; $p = 0.04$), E2 ($H = 13.83$; $df = 7$; $p = 0.04$) and E2s ($H = 14.35$; $df = 7$; $p = 0.04$), and insects performed salivation and ingestion activity less often in cultivars 7569 and Bio266. The duration of the phloem sap ingestion period (WDI waveform E2) in cultivar 7569 was significantly

shorter than in the other cultivars ($H = 14.70$; $df = 7$; $p = 0.04$). In addition, the total duration of E (E1 + E2) was also significantly shorter in this cultivar ($H = 19.92$; $df = 7$; $p = 0.04$), (Figure 5).

No significant differences were observed for any sequential variable (Supplementary Material Table S2).

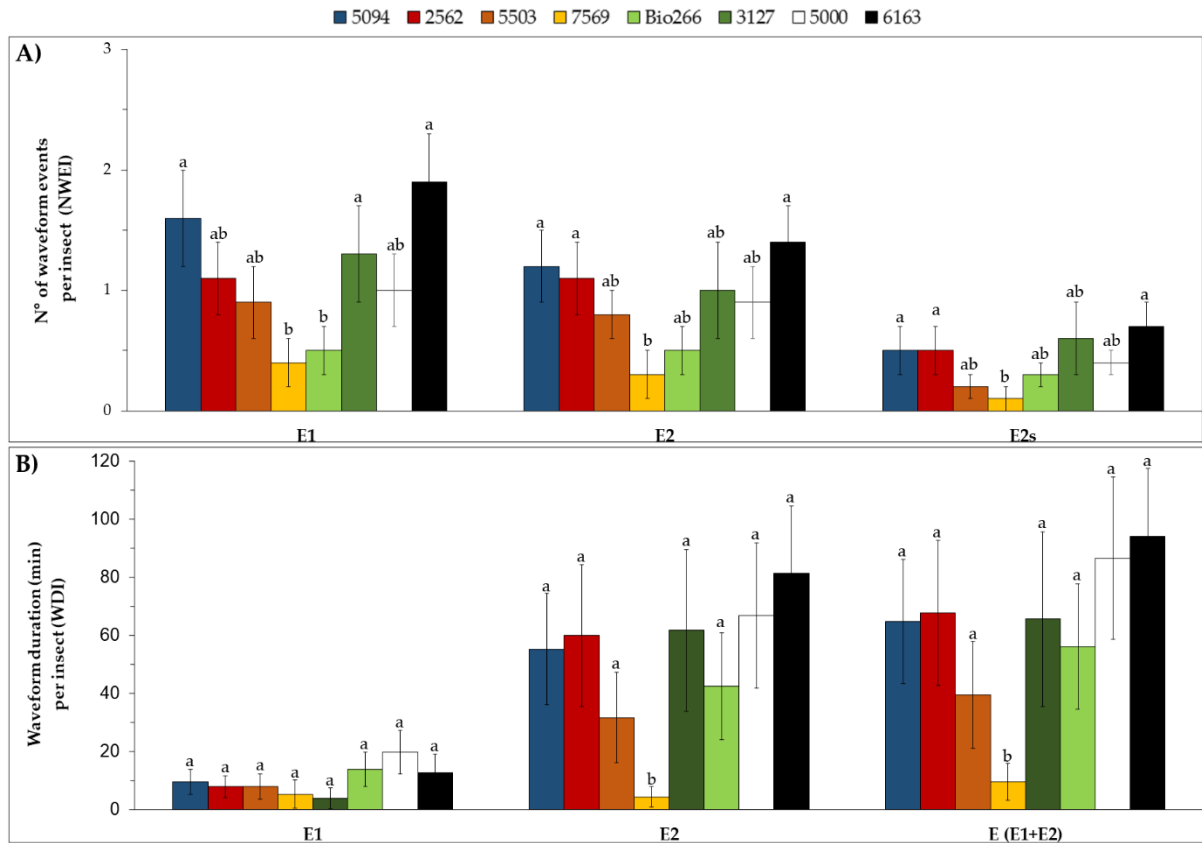


Figure 5. Mean \pm SE of the number of waveform event per insect (NWEI) (A) and the total waveform duration per insect (WDI) (B) of the phloematic parameters of non-viruliferous *M. sacchari* on ScYLV-infected sugarcane cultivars during 8 h of recording. The columns and bars represent the means and the standard error of the mean for each variable, respectively. Statistical comparisons between treatments (in the same EPG parameter) were conducted with a non-parametric Kruskal–Wallis test. Means that share the same letter for each variable are not significantly different ($p > 0.05$). Waveform E1: phloem salivation; E2: phloem ingestion; and E2s: sustained phloem ingestion >10 min.

3. Discussion

The development of sugarcane cultivars resistant to ScYLV and to its main vector, the aphid *M. sacchari*, are essential for sugarcane breeding programs, representing an important step to ensure productivity for the sugar and alcohol production chain. One of the determining factors in viral epidemiology is the interaction between the pathogen and its vector [34]; consequently, the advance in the knowledge of the relationships between them is essential for the development of effective management strategies.

This research evaluated the effect of genotypic variation of sugarcane cultivars infected with ScYLV on the behavior and biology of *M. sacchari*, aiming to verify whether the viral infection, combined with the phenotypic features of each cultivar, influence the insect reproduction and feeding behavior, and consequently on the spread of the virus to other plants.

In general, plants infected with persistent, circulative-transmitted viruses tend to be more attractive and nutritionally richer than non-infected plants, in order to attract the vector and induce it to feed for a longer time, and consequently acquire the virus more efficiently [14,35]. Virus infection may also produce changes in canopy color and plant volatile compounds emission that favors vector attraction

and landing on the crop [36,37]. For instance, the analysis of the volatile compounds of Citrus tristeza virus-infected tolerant citrus varieties indicated a higher presence of monoterpenes, known to be the main components showing deterrent properties toward viruses and insect vectors [38]. Mauck et al. [37] showed that plants induce elevated emissions of a plant volatile blend that increases their attractiveness to alate aphids. These aspects are correlated with the co-evolution between the vector and the virus [39,40] and infers an important role in the transmission mode, influencing virus-mediated changes in the vector's behavior [39] and biological performance, optimizing virus dissemination [40,41].

Our study, through controlled biological assays and feeding behavior evaluated by EPG, allowed the identification and characterization of specific heterogeneous groups of sugarcane cultivars regarding resistance to *M. sacchari*. Cultivars Bio266 and 5000 showed the best biological performance of *M. sacchari*, showing the highest rates of vector reproduction, and consequently, a significant colony increase in their leaves.

On the other hand, cultivars 5094, 5503 and 7569, and to an intermediate degree, cultivars 3127 and 2562, showed signs of resistance in the *M. sacchari* reproductive parameters. In addition, higher mortality was observed in cultivar 3127, which can reduce the number of vectors and, consequently, the transmission rate of ScYLV over the generations (Figure 1). These results show that these varieties have specific features capable of modifying the colonization behavior of the vectors; thus, it can be recommended for planting where secondary transmission of ScYLV by aphids in the field is a problem, or even be used as sources of resistance genes in sugarcane breeding programs.

The reproductive potential rate is an indicator used to assess aphid resistance mechanisms, and low values can be an indicative of plant resistance [20,23,42]. In recent studies of the interaction between *M. sacchari* and sorghum genotypes, this rate has been reported with variable effect, confirming the resistance mechanism by antibiosis [43,44]. According to Fartek et al. [45], the knowledge in the plant-virus-vector interactions combined with genomic mapping and other techniques based on feeding behavior, aphid biology and phenotypic expression of this interaction, are effective ways to evaluate and select genotypes with durable resistance to ScYLV. In addition, Smith [42] states that the search for and use of cultivars resistant to virus vector insects is an important tool for environmental management and is economically advantageous when combined with other control techniques.

In our work, the factor-variable correlations obtained through multivariate analysis, as well as the plotting of the respective indexes and the identification of specific groups of interest, according to insect colonization and their respective survival and reproduction rates (Figure 2 and Figure 3), confirmed varying degrees of resistance to the vector of each sugarcane cultivar.

The application of multivariate analyses has also been widely used in other studies with *M. sacchari*, such as the one reported by Nibouche et al. [46], who studied the genetic variability of *M. sacchari* in different locations, with more than 540 plant species, including sugarcane, sorghum, and corn, identifying the similarity and the formation of genetically superior populations. Using the same multivariate technique, Park et al. [47] analyzed the herbivory and discriminated sorghum genotypes not infested from those colonized by the aphid *M. sacchari*. Additionally, Rodríguez-Vélez et al. [48] also succeeded in studying the behavior of *M. sacchari* under different environmental conditions, through principal component analysis and factor-variable correlation.

Due to viral infections, physicochemical changes occur in plants, influencing the spread of the virus between different host species, making the plant more attractive [14,22,23] or repelling insect vectors, interfering with its biological performance [21,24,49]. Combined with biological performance assays, the EPG technique allows the identification of possible changes in the feeding behavior and stylet activity of insects, giving indications of putative characteristics inherent to the cultivars associated with ScYLV infection, which may indicate resistance to *M. sacchari*. The activities associated with phloem vessels are remarkably important in this study, because ScYLV is a virus limited to phloem vessels and transmitted in a persistent, circulative manner, thus requiring long periods of vector feeding (salivation and ingestion) for its effective transmission [17]. In this case, the aphids must reach the phloem to release the viral particles and inoculate a healthy plant, along with the watery saliva excreted during the salivation phase (E1 waveform) [50], and, on the other hand, remain for long periods ingesting phloem sap (E2 waveform) for the acquisition of ScYLV.

The results obtained from the aphid's feeding behavior assays revealed that cultivar 7569 most effectively affected the behavior of *M. sacchari*, since the insects performed a greater number and duration of waveforms F, which is related to the mechanical difficulty during the probing behavior, indicating possible resistance factors in the cultivar. Furthermore, in this cultivar, the aphids showed a greater number and duration of pds, fewer E1, E2 and E2s, and a shorter duration of the phloem phase (E2 and E (E1 + E2)). This behavior indicates that the insects performed a greater number of brief intracellular punctures (pds), but due to the mechanical difficulty (waveform F), possibly linked to the morphological characteristics of this cultivar, they did not succeed in feeding from the phloem vessels, which, associated with the biological data, indicates a higher degree of resistance of this cultivar. In this case, similarly to what was observed by Ma et al. [51] and Tetreault et al. [52], the host negatively influences the feeding behavior of the vector and consequently reduces its fecundity.

In cultivars 5503, 5094, 2562 and 3127, the insects found mechanical difficulty in feeding, as evidenced by the greater number and duration of the waveform F; however, they were able to reach and normally feed on the phloem. On the other hand, cultivar Bio266 showed the best biological performance, evidenced by the higher number of aphids in the plants (nymphs and adults), as well as by the smaller mechanical difficulty of the stylets (waveform F). However, it was also the cultivar in which aphids performed a small number of activities associated with the phloem (E1 and E2), but without affecting the duration of these phases, in addition to spending more time in np and to a shorter total duration of probes. However, the contrasting data between biology and feeding behavior do not allow to conclude whether cultivar Bio266 is in fact susceptible or not.

Taking into account the results of the biological performance and feeding behavior together, cultivar 7569 showed the highest resistance to *M. sacchari*, as the biological performance (number of nymphs, adults, and total insects) was worse and the insects presented mechanical difficulty to feed and a shorter duration of the phloem period, mainly in the ingestion phase. Cultivar 6163, known to be susceptible to ScYLV infection, despite not showing good biological performance of aphids, proved to be attractive in terms of feeding, as evidenced by less mechanical difficulty to reach the phloem and a longer feeding period in the phloem vessels.

The poorer feeding performance, along with the decrease in the number of *M. sacchari* offspring, provides evidence of sugarcane cultivars resistant to the vector, which can affect the transmission of ScYLV. However, other studies involving free-choice trials using healthy and infected plants of each cultivar are needed to estimate more attractiveness and repellency factors in the existing interactions among sugarcane cultivars, ScYLV and *M. sacchari*. Overall, our results effectively contribute on the identification and characterization of sugarcane genotypes that offer sources of resistance to the main ScYLV vector, the aphid *M. sacchari*.

4. Materials and Methods

4.1. Aphid Colony and Test Plants

Pre-sprouted seedlings (PSS) of eight sugarcane cultivars were used: IACSP95-5094, IACCTC05-2562, IACSP01-5503, IACSP96-7569, IACBio-266, IACSP01-3127, IACSP95-5000 and SP71-6163; the last one is markedly susceptible to ScYLV, and therefore used as the reference. The first seven cultivars were released by the Agronomic Institute of Campinas (IAC) Sugarcane Breeding Program and are well accepted by the cane growers in Brazil. IACSP95-5094, IACCTC05-2562, IACSP01-5503, IACSP96-7569, IACSP01-3127 and IACSP95-5000 are known for their high sucrose yield and adaptation to different Brazilian soil and climate conditions, whilst IACBio-266 is an energycane cultivar, recently in demand from the sugarcane market for ethanol production. As there was a lack of information regarding *M. sacchari* biology and feeding behavior on these cultivars, they were selected for this work. After germination and development of PSS, all plants were grown in a greenhouse for three months, where viruliferous populations of *M. sacchari* were released every 15 days, allowing the viral infection to occur uniformly.

The viruliferous colony of *M. sacchari* was reared on detached leaves of sugarcane cultivar IACSP95-5000 infected with ScYLV and kept in test tubes with 1% agar solution, in a growth chamber

(12 L:12 D, $29 \pm 1^\circ \text{C}$). The sugarcane leaves were changed every 6 ± 1 day. A non-viruliferous population of *M. sacchari* was reared separately on healthy plants (non-infected sugarcane plants) and the absence of the virus was confirmed by RT-PCR analysis [53].

To facilitate the presentation and interpretation of the data, the name of the cultivars used in this research will be referred to only by their respective numbers.

4.2. Effects of ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars on the Life History of *M. sacchari*

The biological performance assays were carried out at the Agronomic Institute (IAC) Sugarcane Research Centre in Ribeirão Preto, SP, Brazil, following the experimental model described by Fartek et al. [45]. Ten replicates were individually done for each of the eight cultivars, with leaves kept in properly identified test tubes, containing 1% agar solution, and covered with sheer fabric (voile), preventing the insect's escape and allowing internal ventilation. In each replicate, five apterous adults of non-viruliferous *M. sacchari* were released and plants were kept in a growth chamber (12 L:12 D, $29 \pm 1^\circ \text{C}$). Seven days after the aphids' release, the total number of aphids, the number of nymphs and adults, the number of alates as well as the total number of dead aphids (adults and nymphs) were counted.

4.3. Stylet Activities and Probing Behavior of *M. sacchari* in ScYLV-Infected Sugarcane Cultivars

The stylet activities and feeding behavior of *M. sacchari* was evaluated using the EPG technique, as described by Tjallingii [29] and Carmo-Sousa et al. [54], with adaptations for the sugarcane plant architecture.

To prepare the insects for the EPG assay, apterous adults of *M. sacchari* were immobilized individually using a vacuum chamber under a dissecting microscope. Then, a gold wire (3 cm length, $18 \mu\text{m}$ in diameter; EPG Systems, Wageningen, The Netherlands) was attached to the aphid's pronotum with a small droplet of conductive silver paint glue (Pelco Colloidal Silver Liquid; Ted Pella Inc., Redding CA, USA). The opposite end of the gold wire was glued to a thin copper wire (2 cm length), which was connected to the EPG probe. The output electrode was a copper post (10 cm long, 2 mm diameter) inserted into the soil of the plant container to close the circuit. After a 1 h starvation period, each aphid was placed individually on the abaxial surface of a sugarcane leaf and then connected to a DC-EPG device.

The EPG waveforms were recorded for 8 h inside a Faraday cage (for isolation from electrical noise) in a climate-controlled room ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) using a Direct Current (DC) eight-channel EPG device, model Giga-8 d, with Stylet+ for Windows software (EPG Systems, The Netherlands) [29]. A total of 17–20 replicates were performed on eight sugarcane cultivars.

The EPG data were analyzed according to the waveforms described for aphids by Tjallingii [29] and van Helden and Tjallingii [30]: non-probing (np); intercellular stylet pathway activities (C); intracellular punctures during stylet pathway phase (pd); phloematic phase-salivation into phloem sieve elements (E1); passive phloem-sap ingestion (E2); active intake of xylem sap (G); and derailed stylet mechanics (F).

The output of 8 h EPG recordings given by the EPG-Excel Data Workbook 5.0 of Sarria et al. [55] for each aphid were used to calculate the treatment mean for each EPG's sequential and non-sequential variables. The selected EPG variables (mean \pm SE) were calculated and compared between treatments as previously described by Backus et al. [56]: PPW—proportion of individuals that generated a particular waveform type; NWEI—number of waveform events per insect; WDI—total waveform duration (min) per insect; and sequential variables—Time to 1st probe from start of EPG; Time from start of EPG to 1st E; Time from 1st probe to 1st E; Time to from start of EPG 1st sustained E2 (10 minutes).

4.4. Statistical Analysis

Prior to statistical analysis, normality, according to the Shapiro–Wilk test [57], and homogeneity of variance were checked out. The EPG data were compared by a parametric Tukey's test ($p < 0.05$) (for Gaussian distribution), and data which did not show a normal distribution were transformed by $\sqrt{x +$

1) or $\ln(x + 1)$. For the data that even after transformation did not follow a normal distribution, the nonparametric Kruskal–Wallis H-test ($p < 0.05$) (for non-Gaussian distribution) was performed, followed by pairwise comparison. A chi-square test was used to analyze the proportion of individuals that produced a specific waveform type (PPW). Statistical analysis was conducted using the IBM SPSS Statistics software package, version 22.0 [58].

Biological parameters of *M. Sacchari* were analyzed by ANOVA and Fischer's test ($p < 0.05$) (for Gaussian distribution), and a nonparametric Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$) (for non-Gaussian distribution) for data that after transformation did not follow a normal distribution. The same data were collected in an exploratory multivariate analysis by clusters and principal components (PC). The results of the cluster analysis were plotted on dendrogram-type graphs, exploring existing hierarchical levels of similarity, and defining specific groups according to Ward's criterion. A PC analysis was based on the selection of components that separate eigenvalues above 1.0, according to the Kaiser criterion [59], with the results plotted on biplot graphs.

Statistical analysis was conducted using the software SAS version 9.3 (Sas Institute) [60] and Statistica version 7.0 (Statsoft) [61].

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Mean (\pm SEM) of non-sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of *Melanaphis sacchari* on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV), Table S2: Mean (\pm SEM) of sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of *Melanaphis sacchari* on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV), Table S3: Proportion of *Melanaphis sacchari* that produced a specific waveform type (PPW) on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) during 8-h recording.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments, Bertasello, L.E.T., Carmo-Sousa, M., Pinto, L.R., Lopes, J.R.S., Maluta, N.K.P and Gonçalves, M.C.; performed the experiments, Bertasello, L.E.T., Carmo-Sousa, M.; analyzed the data, Bertasello, L.E.T., Carmo-Sousa, M., Maluta, N.K.P., Gonçalves, M.C.; wrote and edited the paper Bertasello, L.E.T., Carmo-Sousa, M., Pinto, L.R., Lopes, J.R.S., Maluta, N.K.P and Gonçalves, M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Financial support was received from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* - under financing code 001. The first author was a recipient of a PhD scholarship from CAPES Brazil, and the fifth author received a research fellowship from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)/Brazil* (Proc. 314181/2020-2).

Acknowledgments: São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp-Fcav, Jaboticabal-SP. Instituto Agrônômico de Campinas - IAC - Sugarcane Research Centre, Ribeirão Preto-SP, Biotechnology Laboratory and its collaborators: Maicon Volpin, Juliana Borges and Thais Monteiro. Department of Entomology and Acarology - Laboratory of Insect Vectors of Phytopathogens, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, Esalq-Usp, Piracicaba-SP. PhD Ricardo José Pimenta, Campinas State University - Unicamp.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Chinnaraja, C.; Viswanathan, R. Quantification of sugarcane yellow leaf virus in sugarcane following transmission through aphid vector *Melanaphis sacchari*. *Virus Dis.* **2015**, *26*, 237–242, doi:10.1007/s13337-015-0267-7.
2. Garzo, E.; Moreno, A.; Plaza, M.; Fereres, A. Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides. *Plants* **2020**, *9*, 895, doi:10.3390/plants9070895.
3. Cronje, C.P.R.; Bailey, R.A.; McFarlane, K. Update on the occurrence of yellow leaf syndrome in the South African sugar industry and evidence for the causal agent. *Proc. South Afr. Sugar Technol. Ass.* **1998**, *72*, 81–84.
4. Comstock, J.C.; Irely, M.S.; Lockhart, B.E.L.; Wang, Z.K. Incidence of yellow leaf syndrome in CP cultivars based on polymerase chain reaction and serological techniques. *Sugar Cane* **1998**, *4*, 21–24.

5. Gonçalves, M.C.; Vega, J.; Oliveira, J.G.; Gomes, M.M.A. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves. *Fitop. Brasil.* **2005**, *30*, 10–16, doi:10.1590/S0100-4158200500010000.
6. Gonçalves, M.C. Doenças causadas por vírus. In *Cana-de-Açúcar*; Dinardo-Miranda L.L., Vasconcelos A.C.M., Landell M.G.A., Eds.; Instituto Agronômico de Campinas: São Paulo, Brasil, 2008; Volume 1, pp. 150–165.
7. Gonçalves, M.C.; Pinto, L.R.; Souza, S.C.; Landell, M.G.A. Virus Diseases of Sugarcane. A Constant Challenge to Sugarcane Breeding in Brazil. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* **2012**, *6*, 108–116.
8. Zhu, Y.J.; Lim, S.T.; Schenck, S.; Arcinas, A.; Komor, E. RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. *Eur. J. Plant Pathol.* **2010**, *127*, 263–273, doi:10.1007/s10658-010-9591-3.
9. Ramouthar, P.V.; Berry, S.D.; Rutherford, R.S.; MCFarlane, S.A. Yield loss due to sugarcane yellow leaf virus and its prevalence in the South African sugar industry. *Proc. South Afr. Sugar Technol. Ass.* **2013**, *86*, 244–254, ISSN: 1028-3781.
10. Boukari, W.; Kaye, C.; Wei, C.; Hincapie, M.; LaBorde, C.; Irey, M.; Rott, P. Field infection of virus-free sugarcane by *Sugarcane yellow leaf virus* and effect of yellow leaf on sugarcane grown on organic and on mineral soils in Florida. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 2367–2373, doi:10.1094/PDIS01-19-0199-RE.
11. Grisham, M.P.; Eggleston, G.; Hoy, J.W.; Viator, R.P. The effect of Sugarcane yellow leaf virus infection on yield of sugarcane in Louisiana. *Sugar Cane Int.* **2009**, *27*, 3–91, ISSN: 0265-7406.
12. Nault, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1997**, *90*:5, 521–541, doi:10.1093/aesa/90.5.521.
13. Ingwell, L.L.; Eigenbrode, S.D.; Bosque-Pérez, N.A. Plant viruses alter insect behaviour to enhance their spread. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 578, doi:10.1038/srep00578.
14. Carmo-Sousa, M.; Moreno, A.; Plaz, M.; Garzo, E.; Fereres, A. Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Ann. Appl. Biol.* **2016**, *169*, 284–297, doi:10.1111/aab.12300.
15. Whitfield, A.E.; Falk, B.W.; Rotenberg, D. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* **2015**, *479*, 278–289, doi:10.1016/j.virol.2015.03.026.
16. Fereres, A.; Raccach, B. Plant Virus Transmission by Insects. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2015; pp. 1–12, doi:10.1002/9780470 015902.a0000760.pub3.
17. Fereres, A. Aphid behavior and the transmission of noncirculative viruses. In *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*; Brown, J.K., Ed.; APS Press: St. Paul, MN, USA, 2016; pp. 31–45, doi:10.1094/9780890545355.003.
18. Hull, R. *Plant Virology*, 5th ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; p. 1120, ISBN: 978-0-12-384871-0.
19. Su, Q.; Preisser, E.L.; Zhou, X.M.; Xie, W.; Liu, B.M.; Wang, S.L.; Wu, Q.J.; Zhang, Y.J. Manipulation of host quality and defence by a plant virus improves performance of whitefly vectors. *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108*, 1–9, doi:10.1093/jee/tou012
20. Fereres, A.; Peñaflor, M.F.G.; Favaro, C.F.; Azevedo, K.E.X.; Landi, C.H.; Maluta, N.K.P.; Bento, J.M.S.; Lopes, J.R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. *Viruses* **2016**, *8*, 225, doi:10.3390/v8080225.
21. Bosque-Pérez, N.A.; Eigenbrode, S.D. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res.* **2011**, *159*, 201–205, doi:10.1016/j.virusres.2011.04.020.
22. Fang, Y.; Jiao, X.; Xie, W.; Wang, S.; Wu, Q.; Shi, X.; Chen, G.; Su, Q.; Yang, H.; Pan, H.; Zhang, Y. Tomato yellow leaf curl virus alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1–5, doi:10.1038/srep02876.
23. Mas, F.; Vereijssen, J.; Suckling, D.M. Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40*, 1197–1202, doi:10.1007/s10886-014-0518-x.
24. Dáder, B.; Gwynn-Jones, D.; Moreno, A.; Winters, A.; Fereres, A. Impact of UV-A radiation on the performance of aphids and whiteflies and on the leaf chemistry of their host plants. *J. Photoch. Photobiol. B Biol.* **2014**, *138*, 307–316, doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.06.009.
25. Wu, Y.; Davis, T.S.; Eigenbrode, S.D. Aphid behavioral responses to virus-infected plants are similar despite divergent fitness effects. *Entomol. Exp. Appl.* **2014**, *153*, 246–255, doi:10.1111/eea.12246.
26. Tjallingii, W.F. Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* **1978**, *24*, 521–530, doi:10.1111/j.1570-7458.1978.tb02836.x.

27. Sun, M.; Voorrps, R.E.; Steenhuis-Broers, G.; van't Westende, W.; Vosman, B. Reduced phloem uptake of *Myzus persicae* on an aphid resistant pepper accession. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 138, doi:10.1186/s12870-018-1340-3
28. Tjallingii, W.F. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomol. Exp. Appl.* **1985**, *38*, 177–186, doi:10.1111/j.1570-7458.1985.tb03516.x.
29. Tjallingii, W.F. Electrical recording of stylet penetration activities. In *Aphis, their Biology, Natural Enemies and Control*; Minks, A.K., Harrewijn, P., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1988; Volume 2, pp. 95–108.
30. Van Helden, M.; Tjallingii, W.F. Experimental design and analysis in EPG experiments with emphasis on plant resistance research. In *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Homopteran Feeding Behavior*; Walker, G.P., Backus, E.A., Eds.; Thomas Say Publications in Entomology; The American Entomological Society: Annapolis, MD, USA, 2000; pp. 144–172.
31. Jiménez, J.; Tjallingii, W.F.; Moreno, A.; Fereres, A. Newly distinguished cell punctures associated with transmission of the semipersistent phloem-limited Beet yellows virus. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01076-18, doi:10.1128/JVI.01076-18
32. Jiménez, J.; Garzo, E.; Alba-Tercedor, J.; Moreno, A.; Fereres, A.; Walker, G.P. The phloem-pd: A distinctive brief sieve element stylet puncture prior to sieve element phase of aphid feeding behavior. *Arth. Plant Inter.* **2019**, *14*, 67–78, doi:10.1007/s11829-019-09708-w.
33. Kaiser, H.F. A note on Guttman's lower bound for the number of common factors. *British J. Stat. Psychol.* **1961**, *14*, 1–12, doi:10.1111/j.2044-8317.1961.tb00061.x.
34. Roosien, B.K.; Gomulkiewicz, R.; Ingwell, L.L.; Bosque-Pérez, N.A.; Rajabaskar, D.; Eigenbrode, S.D. Conditional vector preference aids the spread of plant pathogens: Results from a model. *Environ. Entomol.* **2013**, *42*, 1299–1308, doi:10.1603/EN13062
35. Mauck, K.; Bosque-Pérez, N.A.; Eigenbrode, S.D.; De Moraes, C.M.; Mescher, M.C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host–vector interactions: Evidence from plant viruses. *Funct. Ecol.* **2012**, *26*, 1162–1175, doi:10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x.
36. Eigenbrode, S.D.; Ding, H.; Shiel, P.; Berger, P.H. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc. Royal Soc. London. B Biol. Sci.* **2002**, *269*, 455–460, doi:10.1098/rspb.2001.1909.
37. Mauck, K.E.; De Moraes, C.M.; Mescher, M.C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3600–3605, doi:10.1073/pnas.0907191107.
38. Guarino, S.; Abbate, L.; Mercati, F.; Fatta Del Bosco, S.; Motisi, A.; Arif, M.A.; Cencetti, G.; Palagano, E.; Michelozzi, M. Citrus Varieties with Different Tolerance Grades to Tristeza Virus Show Dissimilar Volatile Terpene Profiles. *Agronomy* **2021**, *11*, 1120, doi:10.3390/agronomy11061120.
39. Chesnais, Q.; Couty, A.; Uzest, M.; Brault, V.; Ameline, A. Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Sci.* **2017**, *26*, 86–96, doi:10.1111/1744-7917.12508.
40. Maluta, N.K.P.; Garzo, E.; Moreno, A.; Lopes, J.R.S.; Fereres, A. Tomato yellow leaf curl virus benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop. Entomol.* **2014**, *43*, 385–392, doi:10.1007/s13744-014-0223-z.
41. Maluta, N.K.P.; Fereres, A.; Lopes, J.R.S. Settling preferences of the whitefly vector *Bemisia tabaci* on infected plants varies with virus family and transmission mode. *Entomol. Exp. Appl.* **2017**, *165*, 138–147, doi:10.1111/eea.12631
42. Smith, C.M. *Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2005; p. 423, ISBN: 978-1-4020-3702-3.
43. Limaje, A.; Hayes, C.; Armstrong, J.S.; Hoback, W.; Zarrabi, A.; Paudyal, S.; Burke, J. Antibiosis and tolerance discovered in USDA-ARS sorghums resistant to the sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). *J. Entomol. Sci.* **2018**, *53*, 230–241, doi:10.18474/JES17-70.1.
44. Paudyal, S.; Armstrong, J.S.; Giles, K.L.; Payton, M.E.; Opit, G.P.; Limaje, A. Categories of resistance to sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae) among sorghum genotypes. *J. Econ. Entomol.* **2019**, *112*, 1932–1940, doi:10.1093/jee/toz077
45. Fartek, B.; Nibouche, S.; Turpin, P.; Costet, R.e.y.n.a.u.d.B. Resistance to *M. sacchari* in the sugarcane cultivar R 365. *Entomol. Exp. Appl.* **2012**, *144*, 270–278, doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01286.x.
46. Nibouche, S.; Costet, L.; Holt, J.R.; Jacobson, A.; Pekarcik, A.; Sadeyen, J.; Armstrong, J.S.; Peterson, G.C.; McLaren, N.; Medina, R.F. Invasion of sorghum in the Americas by a new sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*) superclone. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0196124, doi:10.1371/journal.pone.0196124.
47. Park, J.; Thomasson, J.A.; Gorman, Z.; Brewer, M.J.; Rooney, W.L.; Kolomiets, M.V. Multivariate analysis of sorghum volatiles for the fast screening of sugarcane aphid infestation. *J. A-P. Entomol.* **2020**, *23*, 901–908, doi:10.16/j.apen.2020.07.014.

48. Rodríguez-Vélez, J.M.; Uribe-Mu, C.A.; Sarmiento-Cordero, M.A.; Rodríguez-Vélez, B.; Cruz-Rodríguez, J.A.; Contreras-Ramos, A.; Huerta-Martínez, F.M.; Arredondo-Bernal, H.C. Relationships among *Melanaphis sacchari*, Its Predator Insect Communities, and Weather Conditions in Sorghum Crops at Colima, Mexico. *Southwest. Entomol.* **2021**, *46*, 47–58, doi:10.39 58/059. 046.0104.
49. He, W.B.; Li, J.; Liu, S.S. Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–8, doi:10.1038/srep07682.
50. Limburg, D.D.; Mauck, P.A.; Godfrey, L.D. Characteristics of beet yellows closterovirus transmission to sugar beets by aphid fabae. *Phytopathology* **1997**, *87*, 766–771, doi:1094/PHYTO.1997.87.7.766.
51. Ma, K.; Li, F.; Liang, P.; Chen, X.; Liu, Y.; Tang, Q.; Gao, X. RNA interference of Dicer-1 and Argonaute-1 increasing the sensitivity of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) to plant allelochemical. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2017**, *138*, 71–75, doi:1016/j.pestbp.2017.03.003.
52. Tetreault, H.M.; Grover, S.; Scully, E.D.; Gries, T.; Palmer, N.A.; Sarath, G.; Louis, J.; Sattler, S.E. Global responses of resistant and susceptible sorghum (*Sorghum bicolor*) to sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*). *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 145, doi:10.3389/fpls.2019.00145.
53. Gonçalves, M.C.; Klerks, M.M.; Verbeek, M.; Vega, J.; Van den Heuvel, J.F.J.M. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of Sugarcane yellow leaf virus. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 401–407, doi:10.102 3/A:1016040314260.
54. Carmo-Sousa, M.; Moreno, A.; Garzo, E.; Fereres, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Res.* **2014**, *186*, 38–46, doi:10.1016/j.virusres.2013.12.012
55. Sarria, E.; Cid, M.; Garzo, E.; Fereres, A. Excel workbook for automatic parameter calculation of EPG data. Computers and Electronics in Agriculture. *Comp. Elect. Agric.* **2009**, *67*, 34–42, doi:10.1016/j.compag.2009.02.006.
56. Backus, E.A.; Cline, A.R.; Ellerseick, M.R.; Serrano, M.S. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding on cotton: New methods and parameters for analysis of nonsequential electrical penetration graph data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2007**, *100*, 296–310, doi:10.1603/0013-8746(2007)100[296:LHHMFO]2.0.CO;2.
57. González-Estrada, E.; Cosmes, W. Shapiro-Wilk test for skew normal distributions based on data transformations. *J. Stat. Comput. Simul.* **2019**, *89*, 3258–3272, doi:10.1080/00949655.2019.1658763.
58. IBM Corp. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0*; IBM Corp: Armonk, NY, USA, 2013.
59. Kaiser, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika* **1958**, *23*, 187–200, doi:10.1007/bf02289233.
60. SAS Institute. *SAS/STAT User's Guide, Version 9.3*; SAS: Cary, NC, USA, 2013.
61. Statsoft. *Statistica: Data Analysis Software System, Version 7*; Tulsa, OK, USA, 2007.

CAPÍTULO 4 - Efeito de cultivares de cana-de-açúcar infectados com o vírus do amarelinho (ScYLV) sobre a preferência do vetor *Melanaphis sacchari* (Hemiptera: Aphididae)

RESUMO - Sugarcane yellow leaf virus - ScYLV é um vírus limitado aos vasos do floema e transmitido pelo pulgão *Melanaphis sacchari* de forma persistente, circulativa e não propagativa. Por ser um fitopatógeno restrito ao floema e por ter uma relação íntima com o inseto, esses fatos influenciam diretamente a preferência do vetor, ocorrendo mudanças comportamentais do inseto nas diferentes plantas hospedeiras, podendo influenciar no processo da transmissão viral. Objetivou-se avaliar e caracterizar o efeito de oito cultivares de cana-de-açúcar infectadas com o ScYLV sobre a preferência do vetor *M. sacchari*. Foi avaliado o número de insetos sobre as folhas por meio de medidas repetidas no tempo aos 30 min, 1, 3, 6 e 24 horas, totalizando 16 repetições de cada tratamento. Não foi detectado diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, entretanto, no decorrer das avaliações notou-se uma tendência na preferência e comportamento dos insetos para a cultivar IACSP95-5000 após 3ª e 6 h da liberação, quando um grupo preponderante de pulgões migraram de uma cultivar para outra. Observou-se a mesma tendência no comportamento e movimentação dos pulgões a tempos mais longos (24 h), demonstrando uma preferência do vetor pelas cultivares IACSP01-3127 e IACBIO-266. Além das possíveis alterações morfológicas e fisiológicas que podem ocorrer nas plantas ScYLV-infectadas, o vírus também pode modificar o comportamento do inseto vetor, e quando esses dados são correlacionados por meio de análises exploratórias multivariadas, ajuda a identificar a similaridade existente entre grupos específicos de cultivares. Com esses resultados observados, podemos inferir que o vírus ScYLV pode induzir mudanças nas plantas infectadas e conseqüentemente modificar a preferência e comportamento do vetor, beneficiando sua disseminação.

Palavras-chave: Antixenose, análise multivariada, pulgão, *Saccharum* sp.

1. INTRODUÇÃO

A transmissão de fitopatógenos para espécies vegetais por meio de insetos vetores pode se dar recorrentemente, contribuindo à dispersão do fitopatógeno de uma planta a outra (Hull, 2014). Os insetos da ordem hemíptera, são responsáveis por mais de 70% das transmissões ocorridas entre vetores e vírus de plantas conhecidos, afetando cultivos agrícolas em todo o mundo (Bragard et al., 2013). A complexa interação planta-vírus-vetor envolvendo afídeos vetores, caracteriza uma ampla diversidade de organismos e espécies vegetais envolvidos sob diferentes ambientes climáticos (Hull, 2014). O avanço no conhecimento entre essas inter-relações é indispensável para o desenvolvimento de novas estratégias no controle da dispersão viral e seleção de cultivares mais resistentes.

Durante o processo de escolha dos insetos vetores até a concretização da transmissão do fitopatógeno, alterações físicas e químicas ocorrem nas plantas hospedeiras, causando modificações na composição dos voláteis, coloração e aspectos hormonais, nutricionais e hídricos. Essas mudanças nas plantas infectadas pelo fitopatógeno, influenciam indiretamente no comportamento de preferência e aspectos biológicos dos vetores (Su et al., 2015; Fereres et al., 2016). Essas modificações podem agir positivamente na disseminação dos vírus, favorecendo a transmissão entre espécies hospedeiras, visto que plantas infectadas podem ser mais atrativas aos insetos e conseqüentemente melhoram seu desempenho biológico, agindo diretamente na aquisição e inoculação viral em novas plantas (Ingwell et al., 2012; Carmo-Sousa et al., 2016).

É importante destacar que as respostas observadas entre os vetores e os fitopatógenos podem se diferir, estando relacionadas com o modo de transmissão desses fitopatógenos e o vetor (Mauck et al., 2014). No caso do sugarcane yellow leaf virus - ScYLV, a transmissão é classificada como persistente circulativo não propagativo, caracterizando uma interação mais específica e íntima com o seu inseto vetor. O *Melanaphis sacchari* se alimenta exclusivamente de floema e para que ocorra a aquisição do ScYLV, o vetor tem que se alimentar em plantas infectadas durante um período, assim as partículas virais ao serem ingeridas percorrem todo o sistema digestivo do inseto, rompem as barreiras do intestino, chegam a hemolinfa e se

acumulam nas glândulas salivares, e durante a salivação nos vasos do floema, a inoculação do vírus ocorre (Hogenhout et al., 2008; Mauck et al., 2012).

Diversos estudos observaram que os vírus persistentes influenciam alterações físico-químicas em plantas infectadas, conseqüentemente sendo mais atrativas aos insetos vetores (Medina-Ortega et al., 2009; Bosque-Pérez e Eigenbrode, 2011; Fang et al., 2013; Mas et al., 2014). Melhoram o desempenho biológico do vetor (Ferrer et al., 1989; Wu et al., 2014), como período de desenvolvimento, maior taxa de reprodução e sobrevivência, além de mudanças no comportamento alimentar do inseto (Bosque-Pérez e Eigenbrode, 2011; Dáder et al., 2014). Portanto, essas modificações contribuem para o sucesso da transmissão do vírus a novas plantas.

Dessa forma, estudos mais aprofundados que avaliem o comportamento de preferência na seleção da planta hospedeira pelo inseto vetor, são ferramentas extremamente importantes para uma melhor compreensão das inter-relações entre planta-vírus-vetor, que auxiliam no manejo eficiente da praga e conseqüentemente menor disseminação do ScYLV na cultura da cana-de-açúcar.

Com os ensaios apresentados nesse capítulo, objetivou-se avaliar e caracterizar o efeito de oito cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre a preferência do vetor *M. sacchari*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio de preferência do vetor *M. sacchari* em diferentes cultivares de cana-de-açúcar

Nesse estudo, mudas pré-brotadas (MPB) de oito cultivares de cana-de-açúcar foram plantadas e conduzidas em tubetes plásticos conforme já descrito no item 2.1, (Cap. 2). Os ensaios de preferência (com oportunidade de livre escolha) foram conduzidos nas dependências do Departamento de Entomologia e Acarologia - Laboratório de Insetos Vetores de Fitopatógenos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba/SP, em casa de vegetação protegida com tela de anti-afídeo, (Figura 1), seguindo o protocolo desenvolvido por Carmo-Sousa et al. (2014) com adaptações para a cultura da cana-

de-açúcar.



Figura 1. Casa de vegetação do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP em Piracicaba/SP, utilizada para os ensaios de preferência.

2.2 Efeito de cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre o comportamento de preferência de *M. sacchari*

Para avaliar a preferência de *M. sacchari*, foi utilizado gaiolas de acrílico medindo 30 x 30 x 30 cm com pequenas aberturas revestidas com tela anti-afídeo no teto e laterais (Figura 2). Uma arena circular de acrílico revestida com fita adesiva na cor preta foi utilizada para liberar os insetos ápteros, e uma plataforma de cor preta foi fixada no teto da gaiola para apoiar uma folha de cada cultivar de cana-de-açúcar (sem destacar da planta), intercaladas ao acaso e sem se tocarem. A arena e a plataforma foram fixas no centro da arena, mantendo cada folha distribuída equidistante do centro (Figura 2). Foram liberados 50 adultos ápteros de *M. sacchari* avirulíferos, deixados em jejum por 1 hora antes da liberação (retirados da criação de afídeos ver Cap. 2, item 2.2), no centro da plataforma em cada uma das repetições. As avaliações do número de pulgões sobre as folhas foram realizadas em diferentes tempos, aos 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação dos insetos. Para este ensaio foram realizadas 16 repetições, sendo cada arena uma repetição, em cada repetição as plantas e os insetos eram substituídos.

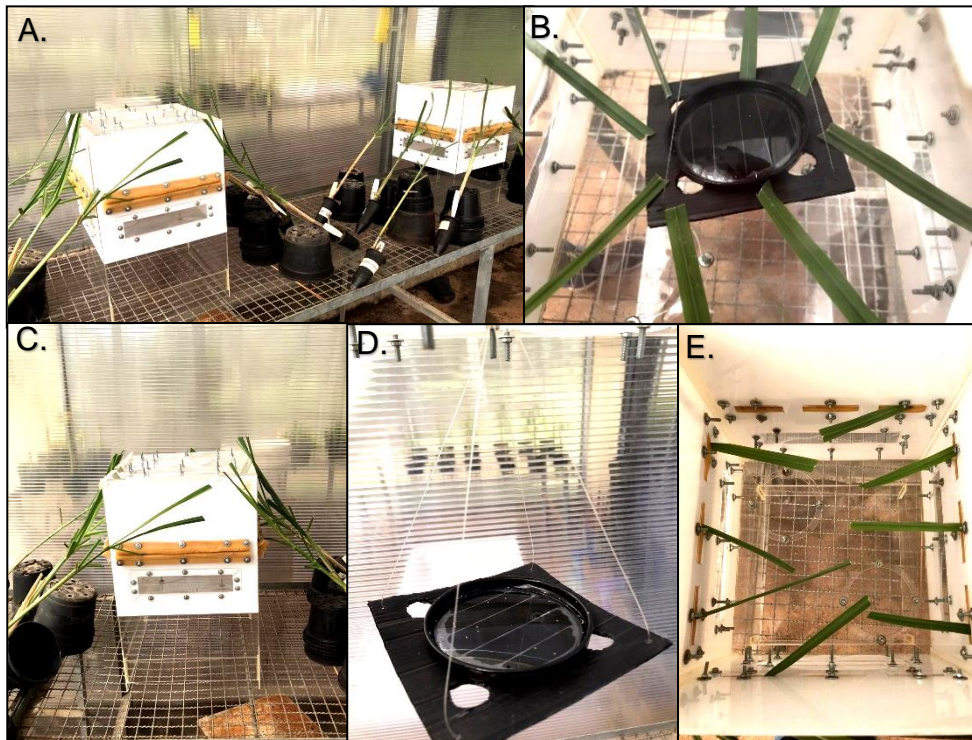


Figura 2. Ensaio de preferência do pulgão *M. sacchari*. A e C. Gaiolas de acrílico 30 x 30 x 30 cm posicionadas com a distribuição das plantas. B. Arena circular com as folhas de cada variedade dispostas sobre a plataforma. D. Plataforma de liberação dos insetos ápteros. E. Distribuição das folhas no interior da gaiola.

2.3 Análise de dados

Os dados relativos à preferência dos afídeos foram transformadas antes da análise estatística por $\sqrt{x + 1}$, e verificados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Para comparar os dados observados no ensaio de preferência, aplicou-se o teste estatístico ANOVA -Medidas Repetidas ao Tempo ($p < 0,05$).

Foi submetido análise exploratória multivariada por agrupamentos e componentes principais (CP). Os resultados da análise de agrupamento foram representados por gráficos dendrogramas, explorando as combinações através de níveis hierárquicos de similaridade existentes e definindo-os em grupos específicos, conforme o critério de *Ward's*. Para a análise de CP, foi realizada seleção dos componentes que apresentaram autovalores acima de 1,00, de acordo com critério proposto por Kaiser (1958), e os resultados representados pelos gráficos *biplots*.

As análises estatísticas foram interpretadas com auxílio dos “softwares” SAS

versão 9.3 (Sas Institute, 2013), Studio R (R Core Team, 2016) e Statistica versão 7.0 (Statsoft, 2007).

3. RESULTADOS

3.1 Efeito de cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre a preferência de *M. sacchari*

Quando foi avaliado a preferência de *M. sacchari* sobre as diferentes cultivares, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Entretanto, foi possível observar mudanças na preferência dos pulgões após a terceira hora da liberação dos insetos. Observou-se um maior número de pulgões que percorreram a plataforma de liberação e migraram de uma cultivar para outra nas primeiras horas de avaliação, evidenciando uma tendência de escolha dos insetos para a cultivar IACSP95-5000 após 3 e 6 horas da liberação. O mesmo comportamento foi observado ao final da avaliação (24 horas após liberação), demonstrando uma tendência de preferência dos insetos pela cultivar IACSP01-3127 e IACBIO-266 (Figura 3). Perante as médias observadas de cada cultivar no decorrer dos tempos de avaliação (30 min, 1, 3, 6 e 24 h), foi possível acompanhar as mudanças no comportamento de escolha e preferência dos pulgões (Figura 3). Nos primeiros 30 minutos após a liberação dos insetos, a preferência foi observada para as cultivares IACSP95-5094, IACCTC05-2562 e SP71-6163, ambos com 18%.

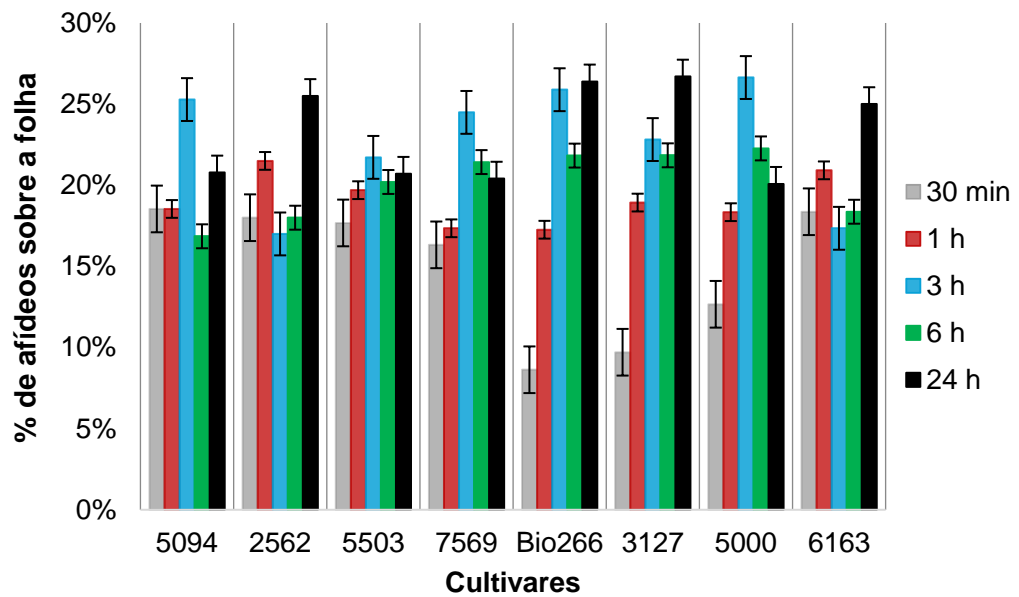


Figura 3. Efeito das cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas sobre a preferência de *M. sacchari* ápteros em condições de livre escolha, avaliados aos 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação dos insetos. *Não apresentou diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Medidas Repetidas ao Tempo/Anova, ($p < 0,05$).

Esse comportamento de preferência se manteve para as cultivares IACCTC05-2562 e SP71-6163 após 1 h da liberação, apresentando respectivamente 21 e 20%. Contudo, já na 3 h de avaliação, a cultivar IACSP95-5000 demonstrou maior preferência dos insetos (26%), seguido pelas cultivares IACSP95-5094 e IACBIO-266, ambas com 25%, porém sem diferenças estatísticas.

O mesmo foi observado após 6 h da liberação dos insetos, onde a cultivar IACSP95-5000 mostrou-se mais atrativa para os pulgões (22%). No entanto, na última avaliação (após 24 h da liberação dos insetos), a cultivar IACSP01-3127 apresentou 27% na preferência dos pulgões, seguido pelas cultivares IACCTC05-2562 e IACBIO-266, ambas com 26% de preferência de escolha (Figura 3).

Com os resultados observados nesse estudo, pode-se entender um pouco mais sobre as mudanças que ocorrem no comportamento do inseto vetor, que podem contribuir na disseminação dos vírus persistentes. Esses dados promovem uma melhor compreensão das interações existentes entre planta-vetor-vírus.

Com base nas condições do efeito da infecção causada pelo ScYLV, e as diferenças fisiológicas e morfológicas que possam existir entre o grupo de cultivares

de cana-de-açúcar avaliados, e as mudanças observadas na biologia e preferência do vetor, podem refletir positivamente ou não no processo de transmissão do vírus entre as cultivares. Onde uma colônia de insetos em contato com plantas ScYLV-infectadas, adquirem o vírus durante sua alimentação no floema, e posteriormente, esses insetos virulíferos se deslocam a outras plantas suscetíveis ao vírus, onde ocorre a transmissão.

Através da análise exploratória multivariada por componentes principais (CPs), quanto ao padrão de dispersão das cultivares de cana-de-açúcar, os dois primeiros CPs explicam 89,73% da variância original contida nos dados e estão dentro do critério de Kaiser (1961), que considera autovalores maiores que 1,0 (Tabela 1 e Figura 5). Com a aplicação dos dois componentes foi possível correlacionar seus fatores com todas as variáveis analisadas devido aos valores serem superiores a 0,7 (Tobar-Tosse et al., 2015). Em CP1, as medidas repetidas ao tempo que apresentaram maior potencial de discriminação explicaram 65,12% da variância contida, já em CP2 a representatividade foi de 24,61% da variância original.

Tabela 1. Correlações fator-variáveis nos dois primeiros componentes principais para oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de *M. sacchari* ápteros em condições de livre escolha aos 30 min, 1, 3, 6 e 24 h após liberação dos insetos. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por componentes principais (CP).

Medidas ao Tempo	CP1	CP2
30 min	-0,38	0,88
1 h	-0,93	0,34
3 h	-0,76	-0,47
6 h	-0,92	-0,31
24 h	-0,88	-0,01
Autovalores	3,25	1,23
Variância (%)	65,11	24,61
Variância Acumulada (%)	65,11	89,72

Analisando a dispersão do gráfico *biplot* em CP1 e CP2 para as oito cultivares de cana-de-açúcar (Figura 5), observa-se que as cultivares IACSP95-5000 e IACSP96-7569 foram as únicas fora da elipse de -2 a 2, indicando assim cultivares com características específicas quanto a preferência de *M. sacchari*, e devem,

portando, merecer atenção especial em programas de melhoramento. A cultivar IACSP95-5000 foi discriminada com maior preferência pelos afídeos, observado nos tempos de 3 e 6 horas após a liberação dos insetos. No sentido oposto, a cultivar IACSP96-7569 ficou mais distante do eixo central da elipse, indicando menor preferência dos insetos após as 24 horas da liberação, corroborando com as médias apresentadas.

As cultivares localizadas dentro da elipse podem ser consideradas neutras quanto ao comportamento de preferência dos insetos. Com os resultados obtidos neste estudo, podemos diferenciar os grupos específicos de interesse quanto ao comportamento de preferência dos insetos vetores nas diferentes cultivares ScYLV-infectadas.

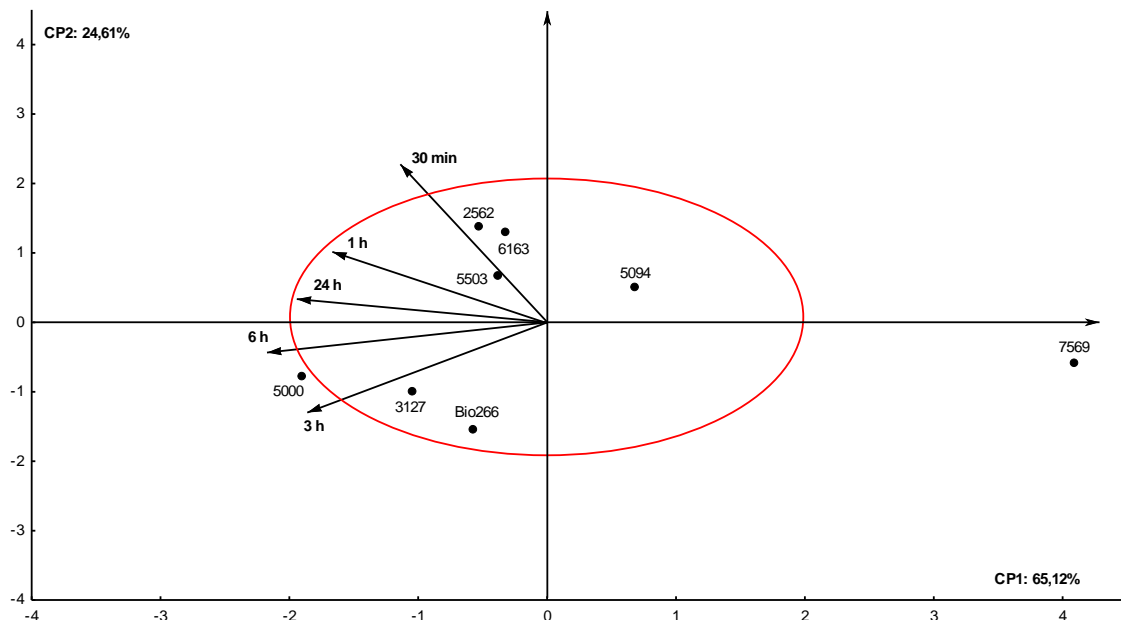


Figura 4. Gráfico *biplot* com a dispersão de oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de *M. sacchari* ápteros em condições de livre escolha, analisadas aos 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação dos insetos. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por componentes principais (CPs).

A partir da matriz de dissimilaridade, baseada na distância euclidiana entre as medidas avaliadas ao tempo, o ponto de corte foi adotado (2,84) e o método de agrupamento hierárquico de *Ward's* foi aplicado, demonstrado através do dendrograma da Figura 6. As cultivares foram divididas em três grupos específicos

denominados como Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3. Os três grupos distintos entre si, assim como a similaridade entre as cultivares de cana-de-açúcar dentro de cada grupo (Figura 6), corroboram mais uma vez com os resultados plotados no gráfico *biplot* pelo método de componentes principais (Figura 5).

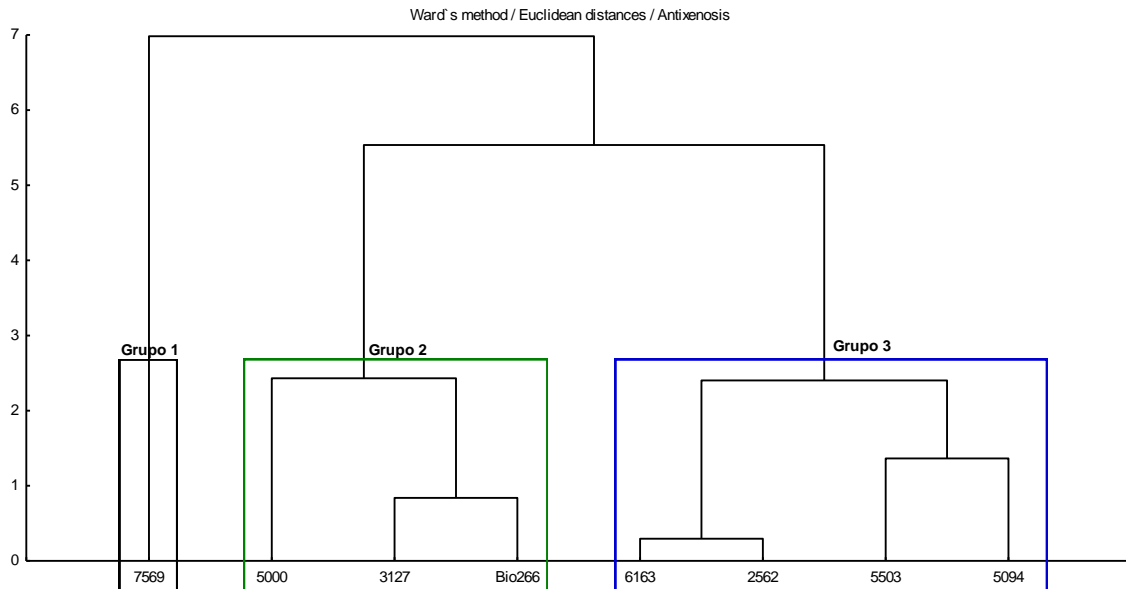


Figura 5. Dendrograma baseado na distância euclidiana entre oito cultivares de cana-de-açúcar quanto a preferência de *M. sacchari* ápteros em condições de livre escolha, analisada aos 30 minutos, 1, 3, 6 e 24 horas após a liberação dos insetos. Dados submetidos à análise exploratória multivariada por agrupamentos pelo método de *Ward's*.

O grupo 2, formado pelas cultivares IACSP95-5000, IACSP01-3127 e IACBIO-266 representaram os maiores índices de preferência dos pulgões sob condições de livre escolha (Figura 6). O grupo 1, composto exclusivamente pela cultivar IACSP96-7569, evidenciou uma menor preferência dos insetos nos tempos avaliados, corroborando com o resultado plotado no *biplot* (Figura 5). O grupo 3 (SP71-6163, IACCTC05-2562, IACSP01-5503 e IACSP95-5094), foram caracterizados como medianos quanto a preferência dos pulgões durante os tempos avaliados, indo de encontro com as cultivares identificadas na elipse construída de -2 a 2 na distribuição do *biplot* (Figura 5), consideradas sem propriedades específicas.

Isso demonstra a homogeneidade entre as cultivares dentro de cada grupo e a heterogeneidade entre os grupos formados, permitindo melhor identificação, assim caracterizando e selecionando cultivares com âmbito a resistência por antixenose no

comportamento e preferência de *M. sacchari*.

4. DISCUSSÃO

O efeito de diferentes cultivares de cana-de-açúcar ScYLV-infectadas no comportamento de preferência do vetor, no intuito de verificar se alterações fisiológicas e/ou morfológicas que possam existir nas plantas, alteram os parâmetros de preferência do vetor *M. sacchari*. Esses parâmetros comportamentais podem indicar algum tipo de resistência das cultivares de cana-de-açúcar ao inseto vetor, como a antixenose, que podem interferir na biologia e comportamento do vetor e conseqüentemente na dispersão do vírus.

Um dos fatores determinantes na epidemiologia viral, é a interação que existe entre o fitopatógeno e seu vetor (Roosien et al., 2013), e por meio dos avanços no conhecimento dessas relações entre vírus-vetor é que se consegue desenvolver planos estratégicos de manejo mais efetivos.

Neste estudo permitiu-se identificar e caracterizar grupos heterogêneos específicos quanto à resistência ao vetor *M. sacchari*, por meio de ensaios de preferência frente a essas diferentes cultivares. As cultivares IACBIO-266 e IACSP95-5000 mostraram maior preferência de *M. sacchari*, onde observou-se maiores índices de escolha pelo vetor.

Um dos aspectos mais importantes na epidemiologia viral, é a movimentação dos insetos vetores, que fazem um grande papel na dispersão dos vírus, devido aos novos focos de infecção dentro do cultivo e a colonização de novas áreas pelas formas aladas, ocasionadas pela grande movimentação desses insetos. Depois de aterrizar sobre as plantas, os pulgões alados iniciam sua sondagem (provas intracelulares) nas plantas hospedes, assim os sinais gustativos e nutricionais dessas plantas infectadas podem alterar a biologia desses insetos, ou seja, sua colonização e reprodução. A taxa de potencial reprodutivo (onde a praga se estabelece sobre a cultura) é um indicador utilizado para avaliar os mecanismos de resistência a pulgões, onde os baixos índices são igualados a plantas resistentes (Fererres et al., 2016; Mas et al., 2014; Smith, 2005). Esse indicador foi observado em estudos recentes, durante o

aumento populacional de insetos, mensurado por meio da taxa de potencial reprodutivo, com efeito variável entre genótipos de sorgo (Limaje et al., 2018; Paudyal et al., 2019).

Devido às infecções virais, modificações físico-químicas ocorrem nas plantas, que influenciam na disseminação do vírus entre hospedeiros vegetais, tornando a planta mais atrativa para os vetores (Carmo-Sousa et al., 2016; Fang et al., 2013; Mas et al., 2014) ou causando efeito repelente, interferindo em sua performance de sobrevivência e mortalidade (Bosque-Pérez e Eigenbrode, 2011; Dáder et al., 2014; He et al., 2015).

De modo geral, plantas infectadas com vírus persistentes-circulativos, tendem ser mais atrativas e nutricionalmente melhores que plantas saudáveis, com intuito de atrair o vetor e induzi-lo a uma alimentação prolongada, e conseqüentemente adquirir com eficiência o vírus (Carmo-Sousa et al., 2016; Mauck et al., 2012). Essas mudanças aferem um papel importante entre os diferentes modos de transmissão e as alterações mediadas pelo vírus no comportamento e preferência do vetor e suas interações (Chesnais et al., 2017), podendo potencializar a dispersão para novas plantas hospedeiras (Maluta et al., 2014, 2017), estando correlacionado com a evolução entre o vírus e seu vetor (Mauck et al., 2016, 2018).

Observou-se uma menor preferência do vetor nas cultivares IACSP95-5094, IACSP01-5503 e IACSP96-7569, o que reforça a hipótese de resistência por antixenose, apresentando baixa preferência dos afídeos. Esses resultados observados podem ajudar a evidenciar possíveis caracteres nas cultivares e que poderiam ser indicadas para o cultivo onde o ScYLV é um problema, devido à propagação secundária por vetores no campo ou mesmo como fontes de genes de resistência ao vetor, em programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Ainda, segundo Fartek et al. (2012), a interação existente entre planta-vírus-vetor e o mapeamento genético em conjunto com outras técnicas, são formas de avaliar e selecionar genótipos com resistência durável ao ScYLV, baseando-se na expressão fenotípica dessa interação, assim como no comportamento e biologia dos afídeos.

Smith (2005) afirma que a busca e uso de cultivares resistentes aos insetos vetores é uma ferramenta importante no manejo ambiental e economicamente

vantajosa, quando associada a outras técnicas de controle e ao uso racional de agroquímicos.

As correlações fator-variáveis obtidas através da análise multivariada, assim como a plotagem dos respectivos índices e a separação de grupos específicos de interesse no dendrograma, confirmam maior ou menor eficiência de cada cultivar na resistência ao *M. sacchari*, no quesito preferência e comportamento desse vetor. Essa análise evidenciou a homogeneidade entre as cultivares dentro de cada grupo e a heterogeneidade entre os grupos formados, permitindo a identificação e seleção das cultivares.

O uso de análises multivariadas também tem sido bastante utilizado para outros estudos com *M. sacchari* como, por exemplo relatado por Nibouche et al. (2018) que avaliou a variabilidade genética de *M. sacchari* em diferentes locais e em mais de 540 espécies de plantas, entre elas: cana-de-açúcar, sorgo e milho, identificando similaridade e formação de populações superiores geneticamente. Utilizando também a técnica multivariada, Park et al. (2020) analisou a herbivoria e discriminou os genótipos de sorgo não infestados e os colonizados por *M. sacchari*. Rodríguez-Vélez et al. (2021) obtiveram sucesso quando avaliaram o comportamento do *M. sacchari* frente a diferentes condições ambientais por meio da análise de componentes principais e correlação fator-variáveis.

Neste estudo, a formação do dendrograma e a plotagem das variáveis através dos *biplots* na preferência do vetor, conseguiu-se caracterizar e identificar claramente os índices de interesse para cada cultivar ao longo das medidas repetidas ao tempo. Com isso, no ponto de vista dos programas de melhoramento genético, o melhorista selecionaria com êxito os materiais vegetais com um melhor resultado no quesito resistência ao vetor, incorporando esse avanço nas pesquisas, e aprimorando o cultivo da cana-de-açúcar.

As diferenças existentes nas características morfológicas e fisiológicas entre as cultivares, em conjunto com os efeitos das barreiras mecânicas e/ou repelentes olfativos presentes na superfície das folhas, como quantidade e tamanho de tricomas, ou dificuldade na quebra da cutícula foliar (Van Helden e Tajallingii, 1993), são as primeiras linhas de autodefesa superficial da planta ao ataque de insetos.

As mudanças observadas no comportamento e preferência de *M. sacchari* ao longo do tempo, em conjunto com a diminuição do número da prole do inseto (desempenho biológico, Cap. 3), nos fornecem evidências de um grupo de cultivares de cana-de-açúcar possivelmente resistentes ao vetor, o que reflete negativamente na transmissão do ScYLV. No entanto, outros estudos são necessários para estimar mais fatores de atratividade e repelência nas interações existentes entre cultivares de cana-de-açúcar-ScYLV-*M. sacchari*. De maneira geral, nossos resultados contribuem efetivamente para o avanço na identificação e caracterização de genótipos de cana-de-açúcar que oferecem fontes de resistência ao principal vetor do ScYLV, o afídeo *M. sacchari*.

5. CONCLUSÕES

Foram observadas mudanças no comportamento de preferência de *M. sacchari* nas diferentes cultivares de cana-de-açúcar no decorrer dos tempos avaliados.

Pode-se observar que as cultivares IACSP95-5000, IACSP01-3127 e IACBIO-266 tiveram uma maior tendência na preferência pelo inseto vetor.

Os resultados reportados neste estudo, contribuem efetivamente para o avanço na identificação e caracterização de cultivares de cana-de-açúcar que podem oferecer resistência ao principal vetor do ScYLV, o afídeo *M. sacchari*.

6. REFERÊNCIAS

Bragard C, Caciagli P, Lemaire O, Lopez-Moya JJ, MacFarlane S, Peters D, Susi P, Torrance L (2013) Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission. **Annual Review of Phytopathology** 51:177-201.

Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD (2011) The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. **Virus Research** 159:201-205.

Carmo-Sousa M, Moreno A, Garzo E, Fereres A (2014) A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. **Virus Research** 186:38-46.

Carmo-Sousa M, Moreno A, Plaz M, Garzo E, Fereres A (2016) *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. **Annals of Applied Biology** 169:284-297.

Chesnais Q, Couty A, Uzest M, Brault V, Ameline A (2017) Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. **Insect Science** 26:86-96. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12508>

Dáder B, Gwynn-Jones D, Moreno A, Winters A, Fereres A (2014) Impacto f UV-A radiation on the performance of aphids and whiteflies and on the leaf chemistry of their host plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 307:316-138.

Fartek B, Nibouche S, Turpin P, Costet, Reynaud B (2012) Resistance to *M. sacchari* in the sugarcane cultivar R 365. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 144(3):270-278. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01286.x>

Fang Y, Jiao X, Xie W, Wang S, Wu Q, Shi X, Chen G, Su Q, Yang H, Pan H, Zhang Y (2013) *Tomato yellow leaf curl virus* alters the host preferences of its vector *Bemisia tabaci*. **Scientific Reports** 3:1-5. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02876>

Fereres A, Peñaflor MFG, Favaro CF, Azevedo KEX, Landi CH, Maluta NKP, Bento JMS, Lopes JRS (2016) Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. **Viruses** 8:225.

Fereres A, Lister RM, Araya JE, Foster JE (1989) Development and reproduction of the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) on wheat cultivars infected with barley yellow dwarf virus. **Environmental Entomology** 18:388-393.

He WB, Li J, Liu SS (2015) Differential profiles of direct and indirect modification of vector feeding behavior by a plant virus. **Scientific Reports** 5:1-8. <https://doi.org/10.1038/srep02876>

38/srep07682

Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. **Annual Review of Phytopathology** 46:327-359.

Hull R (2014) **Plant Virology**. California: Elsevier Academic Press, 1120 p.

Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA (2012) Plant viruses alter insect behaviour to enhance their spread. **Scientific Reports** 2:1-6.

Kaiser HF (1958) The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika** 23(3):187-200.

Kaiser HF (1961) A note on Guttman's lower bound for the number of common factors. **British Journal of Statistical Psychology** 14:1-12.

Limaje A, Hayes C, Armstrong JS, Hoback W, Zarrabi A, Paudyal S, Burke J (2018) Antibiosis and tolerance discovered in USDA-ARS sorghums resistant to the sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Entom Science** 53:230-241. <https://doi.org/10.18474/JES17-70.1>

Mauck KE, Bosque-Pérez, NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology** 26:1162-1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>

Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2014) Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions. **Integrative & Comparative Biology** 54:193-209.

Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2016) Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. **Current Opinion in Plant Biology**, 32:53-61. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.012>

Mauck KE, Chesnais Q, Shapiro LR (2018) Evolutionary determinants of host and vector manipulation by plant viruses. **Advances in Virus Research**, 101:189-250. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>

Maluta NKP, Garzo E, Moreno A, Lopes JRS, Fereres A (2014) Tomato yellow leaf curl virus benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**, 43:385-392. <https://doi.org/10.1007/s13744-014-0223-z>

Maluta NKP, Fereres A, Lopes JRS (2017) Settling preferences of the whitefly vector *Bemisia tabaci* on infected plants varies with virus family and transmission mode. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 165:138-147. <https://doi.org/10.1111/eea.12631>

Mas F, Vereijssen J, Suckling DM (2014) Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. **Journal of Chemical Ecology** 1197-1202. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-014-0518-x>

Medina-Ortega KJ, Bosque-Pérez NA, Ngumbi E, Jiménez-Martínez ES, Eigenbrode SD (2009) *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from *barley yellow dwarf virus*-infected wheat. **Environmental Entomology** 38:836-845.

Nibouche S, Costet L, Holt JR, Jacobson A, Pekarcik A, Sadeyen J, Armstrong JS, Peterson GC, McLaren N, Medina RF (2018) Invasion of sorghum in the Americas by a new sugarcane aphid (*Melanaphis sacchari*) superclone. **PLoS One** 13:e0196124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196124>

Paudyal S, Armstrong JS, Giles KL, Payton ME, Opit GP, Limaje A (2019) Categories of resistance to sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae) among sorghum genotypes. **Journal of Entomological Science** 112:1932-1940. <https://doi.org/10.1093/jee/toz077>

Park J, Thomasson JA, Gorman Z, Brewer MJ, Rooney WL, Kolomiets MV (2020) Multivariate analysis of sorghum volatiles for the fast screening of sugarcane aphid infestation. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 23:901-908. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.07.014>

R CORE TEAM (2016) **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for statistical computing.

Rodríguez-Vélez JM, Uribe-Mu CA, Sarmiento-Cordero MA, Rodríguez-Vélez B, Cruz-Rodríguez JA, Contreras-Ramos A, Huerta-Martínez FM, Arredondo-Bernal HC (2021) Relationships among *Melanaphis sacchari*, Its Predator Insect Communities, and Weather Conditions in Sorghum Crops at Colima, Mexico. **Southwestern Entomologist** 46:47-58. <https://doi.org/10.3958/059.046.0104>

Roosien BK, Gomulkiewicz R, Ingwell LL, Bosque-Pérez NA, Rajabaskar D, Eigenbrode SD (2013) Conditional vector preference aids the spread of plant pathogens: results from a model. **Environmental Entomology**, 42:1299-1308. <http://dx.doi.org/10.1603/EN13062>

Su Q, Preisser EL, Zhou XM, Xie W, Liu BM, Wang SL, Wu QJ, Zhang YJ (2015) Manipulation of host quality and defence by a plant virus improves performance of whitefly vectors. **Journal of Economic Entomology** 108:1-9.

Smith CM (2005) **Plant resistance to arthropods: molecular and conventional approaches**. The Netherlands: Springer Science & Business Media, 423.

STATSOFT (2007) Statistica: data analysis software system, version 7. Tulsa.

SAS INSTITUTE (2013) SAS/STAT user's guide, version 9.3 SAS, Cary.

Tobar-Tosse DE, Castoldi R, Candido WDS, Ferraudo AS, Charlo HCDO, Braz LT (2015) Caracterização de genótipos de soja-hortaliça por análise de componentes principais. **Ciência Rural** 45(7):1214-1219.

Van Helden M, Tjallingii WF (1993) Tissue localisation of lettuce resistance to the aphid *Nasonovia ribisnigri* using electrical penetration graph. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 68:269-278. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01713.x>

Wu Y, Davis TS, Eigenbrode SD (2014) Aphid behavioral responses to vírus-infected plants are similar despite divergente fitness effects. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 153:246-255.

7. CONCLUSÕES FINAIS

Levando em consideração os resultados obtidos nessa Tese de Doutorado, a cultivar IACSP96-7569 apresentou a maior resistência ao vetor *M. sacchari* quando comparada com as demais cultivares de cana-de-açúcar. Essa cultivar foi mais efetiva perante os mecanismos de defesa (antibiose e antixenose), com o menor índice de prole e menor preferência do vetor ao longo do tempo. Ela também apresentou maior dificuldade mecânica dos estiletes durante a alimentação do afídeos, além de menor duração das ondas relacionadas com o floema, o que pode reduzir a transmissão do ScYLV. Ressalta-se ainda que a cultivar IACSP96-7569 foi classificada como moderadamente resistente ao ScYLV, apresentando baixa ou nenhuma expressão fenotípica de sintomas a campo, além de apresentar a maior redução do título viral ao longo do tempo.

Esses resultados contribuem efetivamente no avanço da identificação e caracterização de fontes de resistência ao vetor do ScYLV. Nesse sentido, a cultivar IACSP96-7569 pode ser indicada a produtores e a programas de melhoramento genético na busca de conter ou minimizar os danos causados pela suscetibilidade ao vetor e ao ScYLV.

No entanto, outros estudos envolvendo ensaios com chance de escolha utilizando plantas sadias e infectadas de cada cultivar são necessários para estimar

outros fatores de atratividade e repelência nas interações existentes entre as cultivares de cana-de-açúcar e *M. Sacchari* e conseqüentemente na transmissão do ScYLV.

APÊNDICE

Table S1. Mean (\pm SEM) of non-sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of *Melanaphis sacchari* on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV).

EPG Variable	5094 n = 20	2562 n = 17	5503 n = 20	7569 n = 18	Bio266 n = 17	3127 n = 17	5000 n=18	6163 n=18	P-value ^b	H or Z* value
NWEI^a										
Probe	7.8 \pm 1.6 a	9.6 \pm 1.4 a	7.9 \pm 1.1 a	11.2 \pm 1.3 a	11.1 \pm 2.7 a	10.2 \pm 1.4 a	10.7 \pm 1.6 a	6.5 \pm 1.0 a	0.13	11.28
np	8.1 \pm 1.6 a	10.0 \pm 1.4 a	8.3 \pm 1.1 a	11.7 \pm 1.3 a	11.7 \pm 2.8 a	10.6 \pm 1.4 a	10.9 \pm 1.6 a	6.8 \pm 1.0 a	0.08	1.85*
C	12.0 \pm 1.8 a	13.1 \pm 1.5 a	11.5 \pm 1.2 a	15.4 \pm 1.4 a	12.1 \pm 2.6 a	13.3 \pm 1.6 a	12.4 \pm 1.7 a	10.2 \pm 1.2 a	0.40	1.06*
G	2.2 \pm 0.5 ab	1.6 \pm 0.4 ab	1.6 \pm 0.3 ab	2.1 \pm 0.4 b	0.6 \pm 0.2 c	1.2 \pm 0.4 ac	1.1 \pm 0.3 ac	2.0 \pm 0.3 b	<u>0.02</u>	17.09
F	1.8 \pm 0.4 a	1.6 \pm 0.4 ac	2.0 \pm 0.5 a	2.4 \pm 0.6 a	0.2 \pm 0.1 b	1.3 \pm 0.3 ac	0.4 \pm 0.2 b	0.8 \pm 0.4 bc	<u>< 0.01</u>	29.34
pd	48.3 \pm 7.6 ab	52.6 \pm 11.2 ab	41.4 \pm 8.5 a	69.7 \pm 8.2 b	24.0 \pm 9.3 c	37.4 \pm 7.1 ac	32.8 \pm 10.4 ac	37.6 \pm 6.6 ac	<u>< 0.01</u>	24.37
E1	1.6 \pm 0.4 a	1.1 \pm 0.3 ab	0.9 \pm 0.3 ab	0.4 \pm 0.2 b	0.5 \pm 0.2 b	1.3 \pm 0.4 a	1.0 \pm 0.3 ab	1.9 \pm 0.4 a	<u>0.04</u>	14.79
E2	1.2 \pm 0.3 a	1.1 \pm 0.3 a	0.8 \pm 0.2 ab	0.3 \pm 0.2 b	0.5 \pm 0.2 ab	1.0 \pm 0.4 ab	0.9 \pm 0.3 ab	1.4 \pm 0.3 a	<u>0.04</u>	13.83
E2s	0.5 \pm 0.2 a	0.5 \pm 0.2 a	0.2 \pm 0.1 ab	0.1 \pm 0.1 b	0.3 \pm 0.1 ab	0.6 \pm 0.3 ab	0.4 \pm 0.1 ab	0.7 \pm 0.2 a	<u>0.04</u>	14.35
WDI (min)^a										
Probe	367.8 \pm 19.6 a	304.9 \pm 30.2 abc	339.1 \pm 22.6 ab	298.5 \pm 21.9 bc	225.2 \pm 35.0 c	305.0 \pm 27.5 ac	302.7 \pm 30.6 ac	356.5 \pm 22.9 ab	<u>0.04</u>	14.88
np	112.2 \pm 19.6 a	175.1 \pm 30.2 ab	140.9 \pm 22.6 a	181.5 \pm 17.1ab	254.8 \pm 35.0 b	178.3 \pm 26.2 ab	177.3 \pm 30.6 ab	123.5 \pm 22.9 a	<u>0.03</u>	15.15
C	155.4 \pm 18.3 a	163.1 \pm 17.0 a	142.7 \pm 18.4 a	178.6 \pm 17.0 a	140.5 \pm 28.5 a	158.1 \pm 20.7 a	154.3 \pm 27.8 a	142.1 \pm 18.1 a	0.72	0.64*
G	99.1 \pm 28.5 ac	50.5 \pm 13.0 abd	108.5 \pm 19.9 c	60.5 \pm 13.7 ac	17.2 \pm 6.2 b	66.4 \pm 21.1 ac	40.9 \pm 15.5 ab	114.3 \pm 26.7 dc	<u>< 0.01</u>	24.10
F	48.6 \pm 18.3 a	23.6 \pm 7.1 ac	48.4 \pm 13.3 a	52.7 \pm 14.3 a	2.0 \pm 1.0 bc	21.2 \pm 6.9 a	21.1 \pm 12.6 ac	6.2 \pm 2.7 b	<u>< 0.01</u>	29.56
pd	4.7 \pm 0.7 ab	5.0 \pm 1.2 abd	3.5 \pm 0.7 acd	5.9 \pm 0.7 b	2.5 \pm 1.0 c	3.8 \pm 0.9 ac	3.0 \pm 0.9 dc	3.8 \pm 0.8 abd	<u>< 0.01</u>	21.29
E1	9.5 \pm 4.3 a	7.8 \pm 3.8 a	7.9 \pm 4.4 a	5.2 \pm 4.9 a	3.8 \pm 3.6 a	13.7 \pm 5.9 a	19.7 \pm 7.6 a	12.6 \pm 6.4 a	0.11	11.81
E2	55.2 \pm 19.2 a	59.9 \pm 24.4 a	31.6 \pm 15.6 a	4.3 \pm 3.5 b	61.7 \pm 27.8 a	42.4 \pm 18.4 a	66.8 \pm 25.0 a	81.4 \pm 23.1 a	<u>0.04</u>	14.70
Total duration of E	64.7 \pm 21.3 a	67.7 \pm 25.0 a	39.5 \pm 18.4 a	9.5 \pm 6.3 b	65.6 \pm 30.1 a	56.1 \pm 21.6 a	86.5 \pm 28.0 a	94.0 \pm 23.5 a	<u>0.04</u>	19.92

^a NWEI, number of waveform events per insect; WDI, total waveform duration (min) per insect; ^b Statistical comparisons between treatments for each parameter were made by Tukey test (*) for Gaussian distribution variables or Kruskal-Wallis H-test for non-Gaussian distribution variables. Underline-type indicates significant differences ($P < 0.05$) (Backus et al., 2007).

Table S2. Mean (\pm SEM) of sequential EPG variables for 8-h recordings of the probing behavior of *Melanaphis sacchari* on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV).

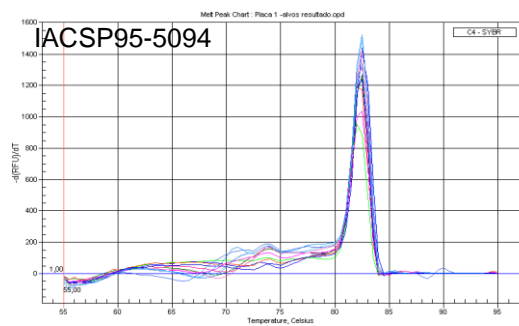
EPG- Sequential variables	5094 n = 20	2562 n = 17	5503 n = 20	7569 n = 18	Bio266 n = 17	3127 n = 17	5000 n=18	6163 n=18	P-value^a	H value
Time to 1 st probe from start of EPG	11.1 \pm 3.7 a	21.0 \pm 8.2 a	34.3 \pm 11.5 a	24.6 \pm 10.5 a	10.9 \pm 3.8 a	17.1 \pm 6.9 a	20.8 \pm 13.0 a	17.9 \pm 8.9 a	0.54	5.95
Time from start of EPG to 1 st E	322.4 \pm 35.7 a	339.9 \pm 38.6 a	379.3 \pm 29.9 a	439.5 \pm 25.6 a	369.2 \pm 40.0 a	344.7 \pm 33.5 a	360.1 \pm 33.9 a	292.8 \pm 38.6 a	<u>0.08</u>	12.79
Time from 1 st probe to 1 st E	311.2 \pm 36.3 a	318.8 \pm 36.3a	344.9 \pm 31.6 a	415.0 \pm 28.8 a	358.3 \pm 40.8 a	327.6 \pm 32.9 a	339.3 \pm 34.9 a	274.9 \pm 41.4 a	0.16	10.58
Time from start of EPG 1 st sustained E ₂ (>10min)	400.9 \pm 26.1 a	378.7 \pm 33.9 a	446.9 \pm 16.6a	454.3 \pm 22.3 a	410.8 \pm 32.3 a	408.8 \pm 28.9 a	391.7 \pm 32.1 a	359.9 \pm 30.4 a	0.10	12.00
Time from start of EPG to 1 st E ₂	350.8 \pm 32.2 a	342.2 \pm 37.8 a	394.4 \pm 28.3 a	440.2 \pm 25.6 a	387.0 \pm 37.5 a	373.4 \pm 32.8 a	364.5 \pm 32.7 a	315.2 \pm 34.2 a	0.12	11.38

^aStatistical comparisons between treatments for each variable were made by non-parametric Kruskal-Wallis test. Underline-type indicates significant differences ($P < 0.05$).

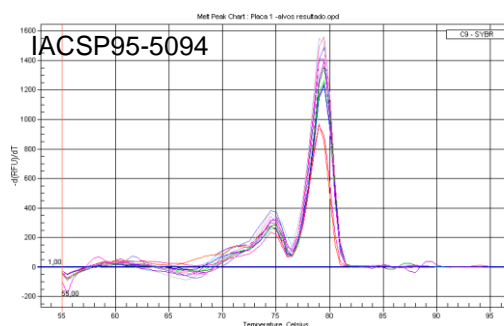
Table S3. Proportion of *Melanaphis sacchari* that produced a specific waveform type (PPW) on sugarcane cultivars infected with sugarcane yellow leaf virus (ScYLV) during 8-h recording.

Waveform	5094	2563	5503	7569	Bio266	3127	5000	6163	<i>P</i> -value ^b	<i>X</i> ²
F	16/20 a (80.0%)	11/17 a (64.7%)	12/20 a (60.0%)	13/18 a (72.2%)	4/17 b (23.5%)	13/17 a (76.5%)	4/18 b (22.2%)	5/18 b (27.8%)	<u>≤ 0.01</u>	31.011
E1	13/20 a (65.0%)	10/17 a (58.8%)	9/20 a (45.0%)	4/18 a (22.2%)	6/17 a (35.3%)	10/17 a (58.8%)	10/18 a (55.6%)	12/18 a (66.7%)	0.09	12.250
E2	11/20 a (55.0%)	10/17 a (58.8%)	9/20 a (45.0%)	3/18 a (16.7%)	6/17 a (35.3%)	8/17 a (47.1%)	10/18 a (55.6%)	12/18 a (66.7%)	0.09	12.372
E2>10 min	7/20 a (35.0%)	8/17 a (40.0%)	4/20 a (20.0%)	1/18 b (5.5%)	5/17 a (29.4%)	6/17 a (35.3%)	8/18 a (44.0%)	11/18 a (61.1%)	<u>0.01</u>	16.355

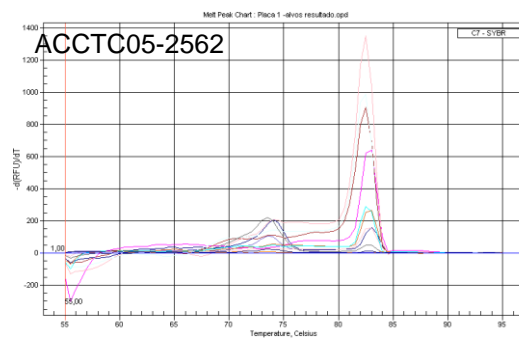
^aEPG waveforms: (F) derailed stylet mechanics, (E1) salivation in phloem sieve elements, (E2) phloem sap ingestion. ^bProportion followed by the same letter, in the same row, do not differ significantly (*P*-value>0.05) using chi-square (*X*²) test for pairwise comparisons.



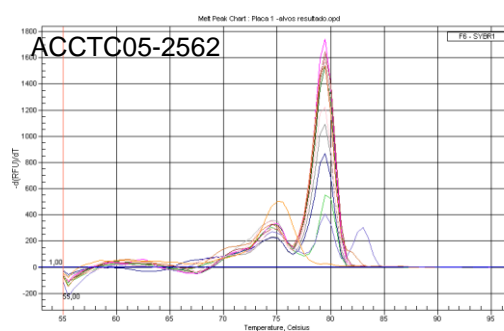
Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~81



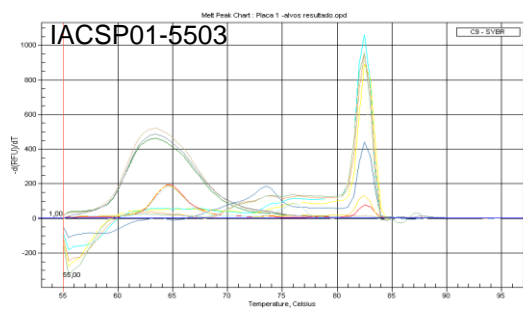
Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81



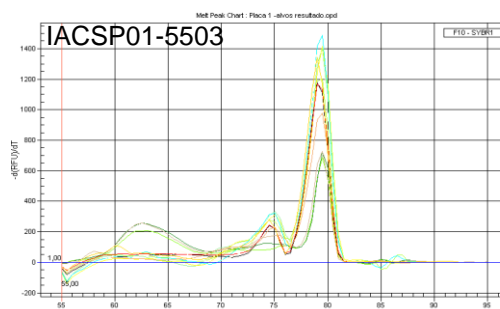
Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84



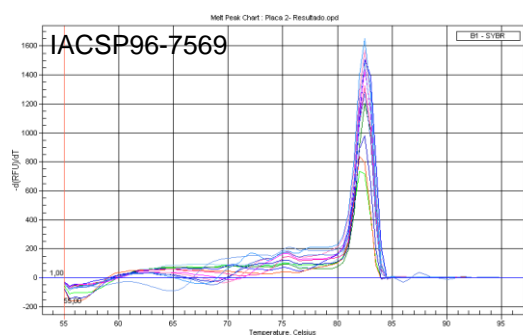
Normalizador: Temperatura de *Melting*: 78~81



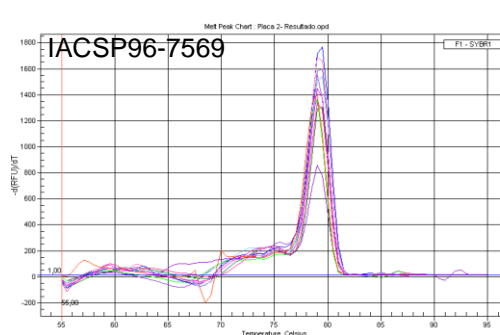
Alvo: Temperatura de *Melting*:



Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81

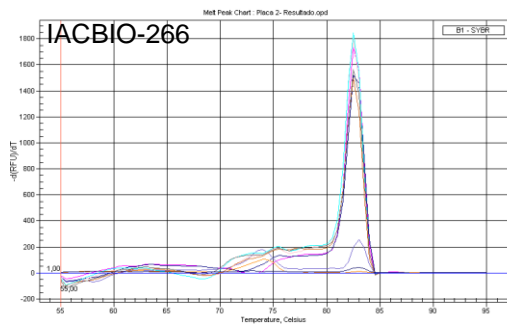


Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84

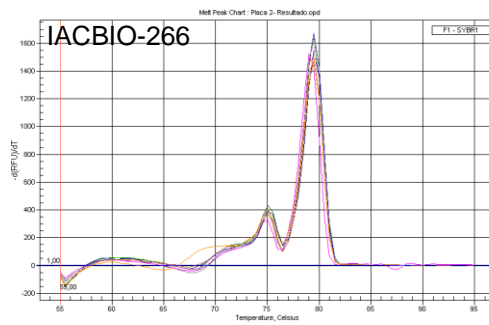


Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81

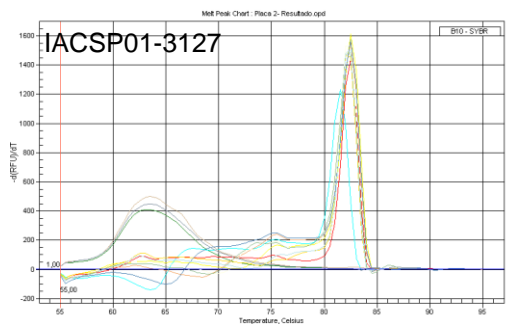
Apêndice, Figura 1. Curvas de temperatura de *melting* de 8 cultivares de cana-de-açúcar analisadas durante reações de RT-qPCR.



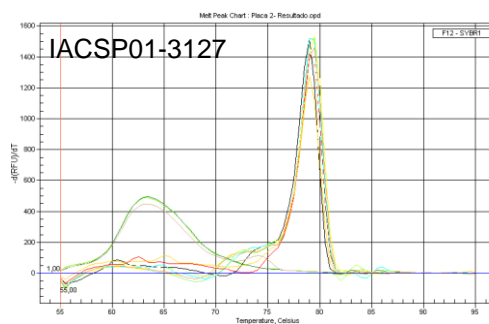
Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84



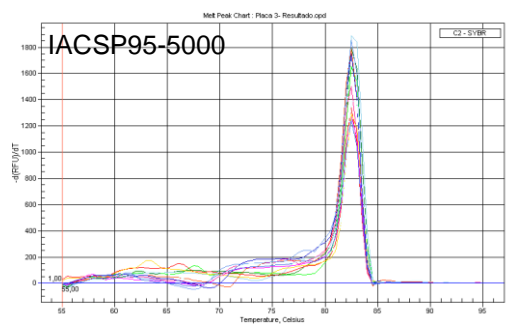
Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81



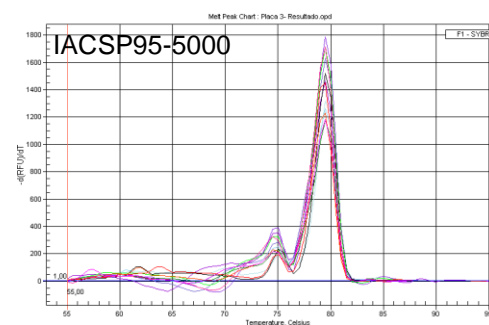
Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84



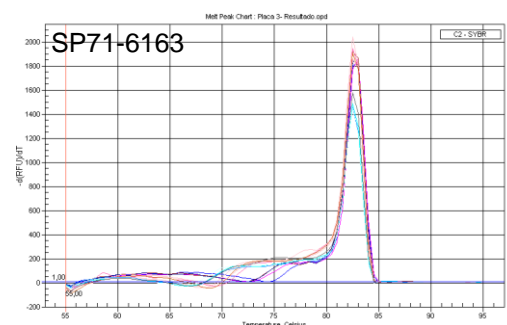
Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81



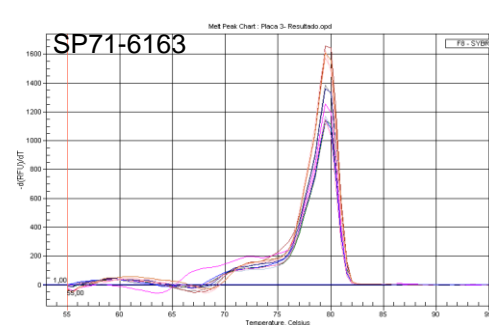
Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84



Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81



Alvo: Temperatura de *Melting*: 81~84



Normalizador: Temperatura de *Melting*: 77~81

Apêndice, Figura 1. Curvas de temperatura de *melting* de 8 cultivares de cana-de-açúcar analisadas durante reações de RT-qPCR.