

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

**INCIDÊNCIA DO MARCADOR MOLECULAR DE  
DIAGNÓSTICO ÀS FERRUGENS MARROM (*Puccinia  
melanocephala*) E ALARANJADA (*Puccinia kuehni*) EM  
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Victória Letícia Justiniano Piña

Jaboticabal – SP  
1º semestre/2023

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

**INCIDÊNCIA DO MARCADOR MOLECULAR DE  
DIAGNÓSTICO ÀS FERRUGENS MARROM (*Puccinia  
melanocephala*) E ALARANJADA (*Puccinia kuehnii*) EM  
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**VICTÓRIA LETÍCIA JUSTINIANO PIÑA**

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Co-orientador: Tiago Santana Balbuena

Trabalho apresentado à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias -  
UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP

1º semestre/2023

P645i

Piña, Victoria Leticia Justiniano

Incidência do marcador molecular de diagnóstico as ferrugens marrom (*Puccinia melanocephala*) e alaramjada (*Puccinia kushnii*) em genótipos de cana-de-açúcar /

Victoria Leticia Justiniano Piña. -- Jaboticabal, 2023

28 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Tiago Santana Balbosa

1. Cana-de-açúcar Variedades. 2. Fungos-da-ferrugem. 3. Diagnóstico molecular. 4. Plantas Resistencia a doenças e pragas. 5. Fungos fitopatogenicos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Biotecnologia Agropecuária de Ambiental

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**TÍTULO:** Incidência do marcador molecular de diagnóstico às ferrugens marrom (*Puccinia melanocephala*) e alaranjada (*Puccinia kuehni*) em genótipos de cana-de-açúcar.

**ACADÊMICO:** Victória Letícia Justiniano Pina

**CURSO:** Ciências Biológicas

**ORIENTADOR (ES):** Luciana Rossini Pinto  
Tiago Santana Balbuena

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

**BANCA EXAMINADORA:**

**Presidente** <sup>(Nomes)</sup> Luciana Rossini Pinto  
**Membro** DILGERMANDO PEREIRA  
**Membro** Juan Antonio dos Anjos

<sup>(Assinaturas)</sup>

Jaboticabal 27, 03, 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 27, 03, 2023

\_\_\_\_\_  
Chefe do Departamento

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Luciana Rossini pela orientação, conselhos e por me proporcionar boas condições para o desenvolvimento do trabalho;

Ao Prof. Dr. Tiago Balbuena pela coorientação e apoio;

A Deus por todas as bênçãos e pelos caminhos que abriu para mim;

Aos meus pais, Elaine Piña e Sidnei Piña, por acreditarem em mim, trazerem paz nos momentos mais difíceis, por sempre terem se esforçado tanto para me ajudar a chegar até aqui e todo o incentivo na minha educação;

Aos amigos do laboratório do Centro de Cana (IAC): Thaís Fávero, Felipe Brussolo, Lucélia Santos, Marcel Silva e Paulo Henrique por toda ajuda e troca de conhecimento durante o experimento;

Aos meus inseparáveis companheiros da graduação, Mateus Fabbris e Bruna Sales, por todo o acolhimento, amor e palavras de incentivo;

E aos amigos da van que me acompanharam nas inúmeras viagens de Ribeirão Preto à Jaboticabal e vice-versa, sempre deixando a rotina cansativa mais leve.

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Coleta e material.....	12
3.2 Extração de DNA .....	12
3.3 Amplificação do marcador de diagnóstico para o gene Bru1 .....	13
3.4 Amplificação do marcador de diagnóstico para o gene Ori.....	14
3.5 Purificação de DNA e sequenciamento .....	14
3.6 Análise estatística .....	15
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
4.1 Análise da presença e ausência dos marcadores de Ori e Bru1 .....	15
4.2 Sequenciamento e alinhamento genético.....	23
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

## RESUMO

A cana-de-açúcar é, economicamente, uma das culturas mais importantes no Brasil, principalmente pela produção de açúcar e biocombustíveis, por isso doenças não controladas podem causar impactos devastadores no setor econômico e indústria alimentícia. Algumas das principais doenças responsáveis por prejuízos no setor sucroenergético são causadas por fungos, como a ferrugem marrom e a ferrugem alaranjada. Ambas resultam em lesões no tecido foliar, diminuindo a área verde, o que leva à redução da fotossíntese e, conseqüentemente à perda de biomassa. O uso de fungicidas para o controle dos fitopatógenos é custoso, pode selecionar indivíduos resistentes ao seu uso, podendo não ser uma alternativa sustentável. O mais adequado é o plantio de variedades resistentes a essas doenças. No entanto, a resistência à ferrugem alaranjada está relacionada com a presença do marcador Ori, enquanto para ferrugem marrom está na presença do marcador Bru1, flanqueado por dois marcadores. O presente trabalho teve como objetivo identificar a presença destes marcadores diagnósticos em 62 genótipos de cana-de-açúcar do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do IAC. Análises mostraram que 15 amostras foram positivas para todos os marcadores, que inferem resistência às doenças e 7 foram negativas para todos. Com relação ao marcador Ori, houve um total de 30 genótipos positivos, já os dois marcadores do gene Bru1 estiveram presentes em 37. Apesar de a presença destes marcadores inferir uma possível resistência das variedades de cana-de-açúcar às ferrugens, ainda são necessários dados fenotípicos para a corroboração desta hipótese.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar. Ferrugens. Resistência. Marcadores moleculares.

## ABSTRACT

Sugarcane is, economically, one of the most important crops in Brazil, mainly for the production of sugar and biofuels, therefore uncontrolled diseases can have devastating effects on the economic sector and the food industry. Some of the main diseases responsible for losses in the sugar-energy sector are caused by fungi, such as brown rust and orange rust. Both resulted in lesions in the leaf tissue, reducing the green area, which leads to a reduction in photosynthesis and, consequently, to the loss of biomass. The use of fungicides to control phytopathogens is costly, can select individuals resistant to their use, and may not be a sustainable alternative. The best option is to plant varieties that are resistant to these diseases. However, resistance to orange rust is related to the presence of the Ori marker, while to brown rust it is related to the presence of the Bru1 marker, flanked by two markers. The aim of this work was to identify the presence of diagnostic markers in 62 sugarcane genotypes of the IAC's Sugarcane Genetic Improvement Program. Analyzes have shown that 15 varieties were positive for all markers, that infer disease resistance and 7 were negative for all of them. With regard to the Ori marker, there were a total of 30 positive genotypes, while the two Bru1 gene markers remained present in 37. Although the presence of these markers infers a possible resistance of sugarcane varieties to rusts diseases, phenotypic data are still needed to corroborate this hypothesis.

**Keywords:** Sugarcane. Rusts. Resistance. Molecular markers.

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea perene classificada como C4, muito produtiva e capaz de armazenar seus produtos de reserva em seu colmo na forma de sacarose, enquanto outras gramíneas armazenam suas reservas nas sementes (CUNFF et al., 2008). Além disso, é uma das culturas economicamente mais importantes do Brasil (YANG et al., 2018). De acordo com a Conab (2022), há uma estimativa de produção de 598,3 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra brasileira de 2022/23, sendo o Sudeste a região mais produtiva do setor canavieiro, responsável por 63,7% deste total. Essa importância está relacionada principalmente ao açúcar e biocombustíveis, como o etanol e o bagaço (MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019). A cana como qualquer outra planta, é acometida por doenças, as quais podem trazer prejuízos econômicos.

Apesar de haver outros fitopatógenos causadores de doenças em cana-de-açúcar, a maioria deles são os fungos, como os do gênero *Puccinia* que provocam as doenças das ferrugens, eles são classificados como basidiomicetos biotróficos, ou seja, se alimentam de tecido vivo (PEIXOTO JÚNIOR, 2011) e ocasionam prejuízos ao setor canavieiro, atingindo todas as regiões do mundo nas quais essa cultura é cultivada (PEIXOTO JÚNIOR, 2011; MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019). Os esporos são dispersos, principalmente, pelo vento e pela água, por isso acredita-se que a ferrugem marrom tenha chegado até as Américas através de correntes de vento provenientes de Camarões na África, uma região com presença significativa deste fitopatógeno (PEIXOTO JÚNIOR, 2011).

A ferrugem marrom é causada por *Puccinia melanocephala*, enquanto a ferrugem alaranjada é causada por *Puccinia kuehnii*. De modo geral, as lesões causadas por essas duas espécies de fungos resultam em uma redução da área verde da folha e (imagem 1), conseqüentemente, há interferência na fotossíntese (WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2011), o que leva à perda de biomassa (MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019; RAID; COMSTOCK, 2006), o ambiente, patógeno e hospedeiro influenciam fortemente na ocorrência e agressividade dessas doenças.

Inicialmente, *P. melanocephala* foi considerado como um fitopatógeno mais agressivo e de maior preocupação mundial, já que a partir da década de 1970 espalhou-se por todo o mundo causando prejuízos às culturas de cana-de-açúcar,

enquanto a ferrugem alaranjada já existia na Austrália desde 1880 sem ocasionar grande impactos e dispersão para outras regiões, apesar de *P. kuehnii* ter causado uma grande epidemia na Austrália em 2000. Tal epidemia levou a um prejuízo de 150 a 200 milhões de dólares australianos (MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019) visto que acometeu a variedade de cana Q124, muito cultivada no país, a qual era resistente a ela e a ferrugem marrom, sendo que alguns anos depois a ferrugem alaranjada passou a ser encontrada em outras regiões (BRAITHWAITE et al., 2009).

O primeiro relato de cana-de-açúcar infectada com ferrugem alaranjada no Brasil foi em dezembro de 2009 em uma fazenda próxima a Rincão-SP, próximo da cidade de Araraquara, mas ela se difundiu para diversas outras regiões do Estado de São Paulo, além do Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Goiás e Minas Gerais (PEIXOTO JÚNIOR, 2011), afetando as variedades comerciais RB72-454, SP84-2025 e SP89-1115, hoje consideradas como altamente suscetíveis (DE LIMA, 2013). Os primeiros sintomas ocorrem mais em plantas maduras favorecidos por clima quente e úmido, e são caracterizados pelo aparecimento de manchas longas e amareladas que vão adquirindo um contorno amarelo-esverdeado (RYAN; EGAN, 1989), depois a lesão passa a ter um tom laranja claro ou escuro dependendo da variedade da cana infectada. As pústulas ficam agrupadas e se encontram principalmente na face inferior das folhas e em sua base, além disso os esporos desse fungo são pequenos, alaranjados e pálidos, com um espessamento apical e espinhos bastante espaçados de forma irregular (MAGAREY et al., 2000).

**Figura 1** – Foto da ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) na parte abaxial de uma folha de cana-de-açúcar.



**Fonte:** Arquivo pessoal L.R. Pinto.

A presença da ferrugem marrom no Brasil foi identificada pela primeira vez em Capivari-SP no ano de 1986 (PEIXOTO JÚNIOR, 2011), mas como a maioria das variedades cultivadas no país eram resistentes à essa doença, não houve grandes perdas econômicas e nem muito alarde nessa época, porém em 1992 ocorreram muitas infecções no Estado de São Paulo, pois as variedades cultivadas não possuíam uma resistência suficiente. Recentemente, um clone de elite do Programa de Melhoramento do IAC (IACSP95-3018) foi analisado e constatado como suscetível a ferrugem marrom, assim como a popular CTC4 (NEUBER et al., 2017). Essa doença acomete em maior número as plantas jovens, podendo levá-las à morte, as infecções podem ocasionar a redução da taxa de fotossíntese devido às manchas em suas folhas, o que aumenta a taxa de respiração das mesmas (AGRIOS, 2005), além de diminuir também o tamanho dos colmos e número de perfilhos (RAID; COMSTOCK, 2006). As pústulas são de coloração amarelada a marrom escuro e se encontram principalmente na superfície inferior das folhas, com esporos subepidérmicos que provocam lesões do tecido foliar para serem liberados no ambiente (JOKESHI, 1997). Os esporos são grandes, com espinhos próximos uns dos outros e espaçados de forma regular (MAGAREY et al., 2000).

Existem algumas diferenças na aparência das lesões e coloração dos esporos de ambas as ferrugens, mas no estágio inicial da infecção é difícil diferenciar as duas espécies do gênero *Puccinia* (CHANDRA; KEIZERWEERD; GRISHAM, 2016) e as duas podem estar infectando a mesma planta ao mesmo tempo, além de que é muito trabalhoso e pouco sensível confiar o diagnóstico a apenas por observação no microscópio. Um método melhor para essa diferenciação é o uso de primers específicos, como o Pk1-F e Pk2-R para *P. kuehnii* que geram um produto de 527 pb, e Pm1-F e Pm1-R para *P. melanocephala* que geram um produto de 480 pb (GLYNN et al., 2010), o uso de marcadores diagnósticos garante uma elevada especificidade e sensibilidade, o que garante resultados confiáveis, e este método pode ser ideal para detecção de infecção de outras doenças na cana-de-açúcar, como o carvão, mosaico e amarelinho, já que a partir deste resultado podem ser formuladas estratégias específicas para o controle de cada uma. Estudos de Chandra, Keizerweerd e Grisham (2016) também conseguiram desenvolver um método alternativo para diagnóstico, especificamente para ferrugem alaranjada, através de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), um método mais

simples, rápido, econômico e específico apenas pela mudança de coloração alaranjada da amostra para a verde, sem precisar de outro processo após a amplificação para confirmar o diagnóstico, mas o método não obteve sucesso com relação a diagnóstico de ferrugem marrom.

Existem muitos fungicidas capazes de controlar a infecção por fungos do gênero *Puccinia*, porém são muito caros e o seu uso indiscriminado pode selecionar indivíduos resistentes (MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019) e não é uma alternativa sustentável (YANG et al., 2018), por isso, a melhor e mais utilizada forma de controle é o plantio de variedades resistentes (MCCORD; GLYNN; COMSTOCK, 2019). Variedades suscetíveis ou de resistência intermediária também podem ser cultivadas em regiões que não são muito afetadas pelas doenças da ferrugem (PEIXOTO JÚNIOR, 2011). O Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do IAC possuía variedades de interesse que ainda não haviam sido analisadas com relação a presença dos marcadores de resistência à ferrugem marrom e alaranjada, obter conhecimento dessa característica é importante para um cultivo adequado, prevendo os cuidados necessários e identificando as que possam apresentar menos empecilhos durante o processo, podendo evitar o cruzamento com genótipos suscetíveis, já que muitas variedades precisam ser substituídas nas culturas quando apresentam uma resistência muito baixa a essas doenças.

A cana-de-açúcar possui um genoma extremamente complexo devido ao seu elevado grau de poliploidia e origem interespecífica, por isso há diversos desafios quando se trata de estudá-la geneticamente (D'HONT et al., 2005). Fier et al. (2012) correlacionaram a presença do marcador "Ori" ou "G1" com a resposta de resistência à ferrugem alaranjada e identificaram a variedade RB86-7515 como resistente, pois apresenta uma média de severidade para esta doença de 1,86, a eficiência de Ori para inferir resistência a ferrugem alaranjada foi de 71,43%, ele foi encontrado em 58,43% de genótipos brasileiros e mesmo que a variedade apresentasse alguma suscetibilidade, a presença deste marcador reduzia a severidade em 35%, além disso importantes cultivares comerciais, como SP81-3250 e RB72-454, foram caracterizadas como altamente suscetíveis a *P. kuehni*. Costet et al. (2012) demonstraram que a presença de dois marcadores, o R12H16-PCR e 9020-F4-PCR-Rsal, flanqueando o gene Bru1, o qual, confere resistência à ferrugem marrom, classificando-o como principal gene de resistência à ferrugem marrom, identificado inicialmente na variedade R570, e definido como o gene de maior resistência à

ferrugem marrom por estar presente em 73.5% das variedades resistentes brasileiras, este gene está localizado a 10 cM de um marcador RFLP (NEUBER et al., 2017; DAUGROIS et al., 1996; COSTET et al., 2012).

## **2. OBJETIVO**

Identificar a presença do marcador de diagnóstico para resistência às ferrugens marrom (*Puccinia melanocephala*) e alaranjada (*Puccinia kuehni*) em um grupo de genótipos de cana-de-açúcar.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Coleta e material**

Os marcadores de diagnóstico para inferência da resistência às ferrugens marrom e alaranjada foram analisados em 62 genótipos de cana-de-açúcar de interesse para o programa cana do Instituto Agrônomo de Campinas. A maioria dos genótipos são clones e variedades desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Além dos clones e variedades IAC, foi incluído uma variedade do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e uma da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA). Estes genótipos fazem parte da Coleção de Trabalho do Programa Cana IAC e podem ser utilizados nas campanhas de hibridação para o desenvolvimento de novas variedades o que justifica sua caracterização quanto a presença dos marcadores de diagnóstico para inferência da resistência as ferrugens marrom e alaranjada (tabela 1).

### **3.2 Extração de DNA**

Para a extração do DNA, as folhas frescas dos genótipos avaliados foram cortadas, limpas e maceradas com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana e armazenadas em ultra-freezer a -80°C. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) e posteriormente quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c).

### 3.3 Amplificação do marcador de diagnóstico para o gene Bru1

Para o marcador de diagnóstico do gene Bru1 foram utilizados dois pares de primers para amplificar cada região flanqueadora do gene e o padrão das bandas da eletroforese foram comparados com a variedade R570, do programa de melhoramento de Reunion, considerada controle positivo da reação por apresentar os dois marcadores de Bru1 e uma taxa de segregação 3:1 (resistentes:suscetíveis), o que a classifica como resistente à ferrugem marrom (DAUGROIS et al., 1996), mas é suscetível a ferrugem alaranjada (MUNGUR et al., 2020). O par de primers R12H16-F (CTACGATGAACTACACCCTTGTC) e R12H16-R (CTTATGTTAGCGTGACCTATGGTC) foi utilizado para amplificar um fragmento de 570 pb (pares de bases), enquanto o par 9020-F4-F (TACATAATTTTAGTGCCACTCAGC) e 9020-F4-R (ACCATAATTCAATTCTGCAGGTAC) foi utilizado para amplificar um fragmento de 200 pb após digestão com RsaI (10U/μl).

A reação de amplificação para o par de primer (R12H16-F/ R12H16-R) foi conduzida em um volume final de 20 uL contendo 100 ng de DNA, tampão 1x, 0,2 mM de dNTP; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 uM de primer forward e reverse e 0,5 unidades de Taq DNA polimerase. Para o par de primer 9020-F4-F/9020-F4-R, a reação foi conduzida em um volume final de 25 uL com as mesmas condições acima, considerando 0,8 unidades de Taq DNA polimerase.

As condições de amplificação foram as descritas por Costet et al. (2012) e Neuber et al. (2016): um ciclo de 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 72 segundos, seguido de um ciclo final de alongamento de 72°C por 8 minutos.

O produto amplificado pelo par de primer R12H16-F/ R12H16-R foi separado em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para a visualização do marcador de 570 pb. Uma alíquota de 10 uL do produto amplificado pelo par de primer (9020-F4-F/9020-F4-R) foi separada em gel de agarose a 1,5% para confirmação da amplificação antes de proceder a digestão com a RsaI. Após confirmação, os 15 uL restantes foram submetidos a digestão em um volume final de 25 uL contendo 1x de tampão C (Promega) da enzima, 5 U de RsaI (Promega) e água miliQ. A reação foi incubada a 37°C por 2h. Após a digestão, a reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificação do fragmento de 200 pb.

### 3.4 Amplificação do marcador de diagnóstico para o gene Ori

Para a análise do marcador Ori de 940 pb, foi utilizado o par de primers Ori-F (ACCATGGAAATCCATACGTC) e Ori-R (GGCCAACACTTAGGCCAATA), a variedade RB867515 foi usada como controle positivo da reação, já que é resistente a ferrugem alaranjada, apresentando uma severidade média de 1,36 (FIER et al.). A reação foi conduzida em um volume final de 20 uL contendo 125 ng de DNA utilizando a GoTaq Green Master Mix 2x (Promega) conforme instruções do fabricante e 1 uM de primer forward e reverse.

As condições de amplificação foram: um ciclo de 95°C por 5 minutos, 5 ciclos de 96°C por 1 minuto, 68°C por 5 minutos em que a temperatura é reduzida em 2°C a cada ciclo e 72°C por 1 minuto, 5 ciclos de 96°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos em que a temperatura é reduzida em 2°C a cada ciclo e 72°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. A análise dos fragmentos resultantes da amplificação foi feita em gel de agarose 1%.

Todos os géis de agarose foram corados com brometo de etídio, e os fragmentos comparados com ladder de 50 e 100 pb e visualizados em transiluminador por luz UV (Analytick Jena).

Os genótipos positivos, isto é, apresentando ambos os fragmentos/marcadores que flanqueiam o gene Bru1 (R12H16 e 9020-F4) possuem grande probabilidade de ser resistentes à ferrugem marrom, enquanto os positivos para o marcador Ori para à ferrugem alaranjada.

### 3.5 Purificação de DNA e sequenciamento

Esse processo foi realizado para as amostras R570 (controle), CTC4, IAC07-381, IAC07-52 e IAC12-7060, já que, com exceção do genótipo controle, essas amostras não foram digeridas mesmo após 4 repetições. A variedade GBW11103 também não pôde ser digerida pela enzima, mas ela não foi sequenciada.

Inicialmente, foi realizada a amplificação do fragmento com o par de primers 9020-F4-F/ 9020-F4-R e posterior eletroforese em gel de agarose. O fragmento de 400 pb foi retirado do gel (sem que fosse feita a reação de restrição) com auxílio de um bisturi e purificado com o kit Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit de acordo com a metodologia disponibilizada pelo fabricante. As amostras purificadas

foram preparadas de acordo com as instruções do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP campus de Jaboticabal e submetidas ao sequenciamento direto do fragmento purificado.

Após o sequenciamento, a visualização das sequências e seu alinhamento múltiplo foi feito através do programa BioEdit e da plataforma online Clustal Omega. O banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) e sua ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), foram utilizados para adquirir informações genômicas adicionais.

### 3.6 Análise estatística

A partir da leitura dos fragmentos resultantes da eletroforese, foi obtida a frequência de presença e ausência dos marcadores dos genes de resistência à ferrugem marrom e alaranjada através do software JASP 0.17.1 disponibilizado pela Universidade de Amsterdã.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da presença e ausência dos marcadores de Ori e Bru1

Das 62 amostras estudadas, 15 delas são positivas para todos os marcadores de resistência às ferrugens, são elas: IAC08-6153, IAC09-2128, IAC09-2188, IAC12-7065, IACCTC05-2562, IACCTC05-5571, IACCTC05-5579, IACCTC06-1050, IACCTC08-9052, IACSP01-4402, IACSP02-2036, IACSP03-4090, IACSP04-2503, IACSP04-6007 e RB03-5159. Enquanto 7 variedades não apresentam nenhum destes marcadores, são elas: CTC4, IAC12-7059, IAC13-3173, IACCTC05-3578, IACCTC06-9734, IACCTC07-7120 e IACCTC08-6099 (Tabela 1).

A reação 2 para averiguar a presença de um dos marcadores Bru1 falhou na variedade IACCTC08-6099, mas como na reação 1 o resultado havia sido negativo, consideramos ambos negativos, já que de 391 genótipos de cana-de-açúcar analisados por Neuber et al. (2017), nenhum dos que eram suscetíveis a ferrugem marrom amplificou os marcadores do gene Bru1, demonstrando uma baixa probabilidade de que não haja conformidade entre os resultados das duas reações.

**Tabela 1** - Variedades estudadas e sua resposta a presença das regiões associadas a resistência às ferrugens, sendo (+) positivo e (-) negativo.

<b>Variedade</b>	<b>Ori</b>	<b>Bru1 (reação 1)</b>	<b>Bru1 (reação 2)</b>
<b>CTC4</b>	-	-	-
<b>IAC07-381</b>	-	+	-
<b>IAC07-391</b>	-	+	+
<b>IAC07-52</b>	+	-	-
<b>IAC07-7078</b>	-	+	+
<b>IAC08-6153</b>	+	+	+
<b>IAC09-2128</b>	+	+	+
<b>IAC09-2188</b>	+	+	+
<b>IAC11-4053</b>	-	+	+
<b>IAC11-4091</b>	-	+	+
<b>IAC12-7059</b>	-	-	-
<b>IAC12-7060</b>	+	-	-
<b>IAC12-7065</b>	+	+	+
<b>IAC13-1010</b>	+	-	-
<b>IAC13-3173</b>	-	-	-
<b>IAC14-5084</b>	-	+	+
<b>IACCTC05-2562</b>	+	+	+
<b>IACCTC05-3576</b>	+	-	-
<b>IACCTC05-3578</b>	-	-	-
<b>IACCTC05-5548</b>	-	+	+
<b>IACCTC05-5571</b>	+	+	+
<b>IACCTC05-5578</b>	-	+	+
<b>IACCTC05-5579</b>	+	+	+
<b>IACCTC05-5580</b>	-	-	+
<b>IACCTC05-9510</b>	+	-	-
<b>IACCTC05-9526</b>	-	+	+
<b>IACCTC05-9536</b>	-	+	+

IACCTC05-9553	+	-	-
IACCTC05-9564	+	-	-
IACCTC06-1050	+	+	+
IACCTC06-1090	+	-	-
IACCTC06-5732	+	-	+
IACCTC06-9734	-	-	-
IACCTC07-2247	-	+	+
IACCTC07-3037	+	-	-
IACCTC07-7120	-	-	-
IACCTC07-7207	+	+	-
IACCTC07-7270	+	-	+
IACCTC08-6099	-	-	FALHA
IACCTC08-6260	-	+	+
IACCTC08-9052	+	+	+
IACCTC09-2238	-	+	+
IACCTC09-8053	+	-	-
IACSP01-2419	-	+	+
IACSP01-2421	-	+	+
IACSP01-4402	+	+	+
IACSP01-8082	+	-	+
IACSP01-8158	-	+	+
IACSP02-2008	-	+	+
IACSP02-2032	-	+	+
IACSP02-2036	+	+	+
IACSP02-3062	-	+	+
IACSP02-4092	-	+	+
IACSP02-615	-	+	+
IACSP03-2014	+	-	+

<b>IACSP03-4090</b>	+	+	+
<b>IACSP03-8158</b>	-	+	+
<b>IACSP04-2503</b>	+	+	+
<b>IACSP04-6007</b>	+	+	+
<b>IACSP04-7096</b>	-	+	+
<b>GBWI1103</b>	-	+	-
<b>RB03-5159</b>	+	+	+

Fonte: Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

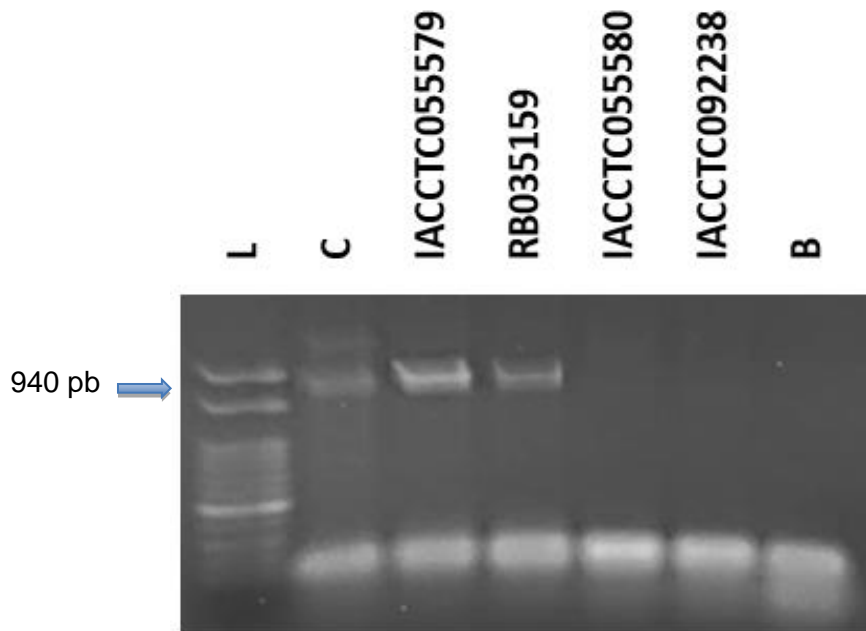
As amostras IAC07-52, IAC12-7060, IAC13-1010, IACCTC05-3576, IACCTC05-9510, IACCTC05-9553, IACCTC05-9564, IACCTC06-1090, IACCTC07-3037, IACCTC09-8053 e IACSP03-2014 são positivas apenas para o marcador Ori. Além destas, ele está presente nas outras 15 variedades positivas para todos os marcadores, além da IACCTC06-5732, IACCTC07-7207, IACCTC07-7270 e IACSP01-8082, ou seja, é encontrado em um total de 30 genótipos, equivalente à 48.38% (Tabela 2). O resultado da eletroforese pode ser visualizado na figura 2.

**Tabela 2** - Frequência da presença do marcador Ori nas amostras estudadas.

Ori	Porcentagem (%)
0 (ausência)	51.613
1 (presença)	48.387
Total de amostras	100.000

Fonte: Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

**Figura 2** – Foto da eletroforese do marcador diagnóstico Ori (940 pb) para ferrugem alaranjada detectado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. Ladder de 50 pb (L); RB86-7515 (C); IACCTC05-5579 e RB03-5159 positivas para Ori; IACCTC05-5580 e IACCTC09-2238 negativas para Ori; branco (B).



**Fonte:** Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

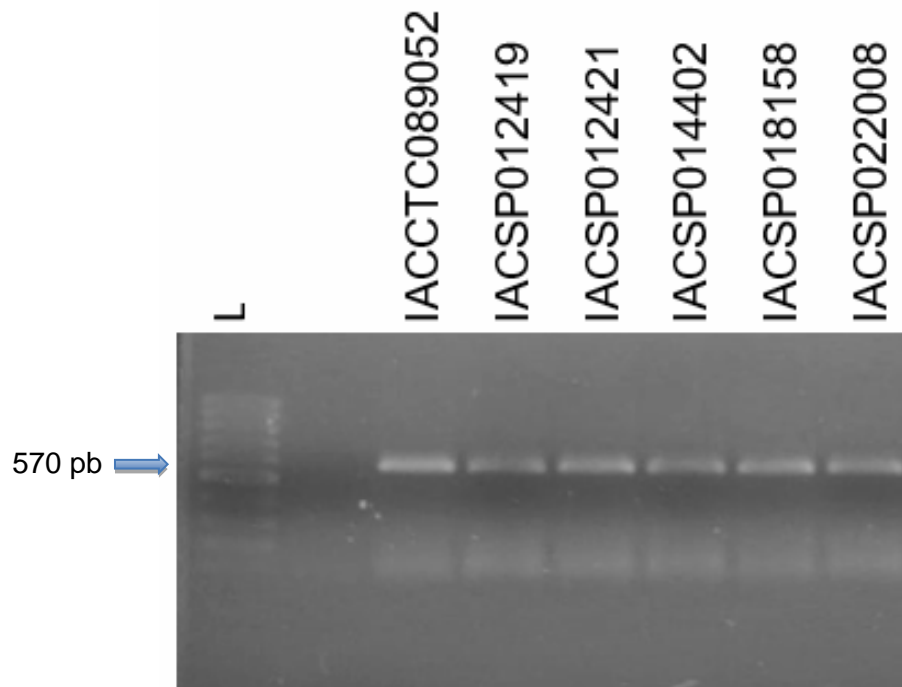
O marcador flanqueador da região de resistência à ferrugem marrom, analisado na reação 1, está presente também nas amostras IAC07-381, IAC07-391, IAC07-7078, IAC11-4053, IAC11-4091, IAC14-5084, IACCTC05-5578, IACCTC05-5548, IACCTC05-9526, IACCTC05-9536, IACCTC07-2247, IACCTC07-7207, IACCTC08-6260, IACCTC09-2238, IACSP01-2419, IACSP01-2421, IACSP01-8158, IACSP02-2008, IACSP02-2032, IACSP02-3062, IACSP02-4092, IACSP02-615, IACSP03-8158, IACSP04-7096 e GBWI1103, somando um total de 40 amostras positivas para o marcador desta reação, equivalente à 64.5% (Tabela 3). O resultado da eletroforese pode ser visualizado na figura 3.

**Tabela 3** - Frequência da presença do marcador da reação 1 de Bru1 nas amostras estudadas.

Bru1 R1	Porcentagem (%)
0 (ausência)	35.484
1 (presença)	64.516
Total de amostras	100.000

**Fonte:** Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

**Figura 3** – Foto da eletroforese do marcador diagnóstico Bru1 (reação 1 - 570 pb) para ferrugem marrom, detectado em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídio. Ladder de 100 pb (L); as 6 variedades foram positivas para a presença do marcador.



**Fonte:** Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

Já o segundo marcador de resistência à Bru1, averiguado na reação 2, é positivo nas mesmas variedades que possuem o outro marcador da reação 1, com exceção da IAC07-381 e IACCTC07-7207. Além disso, ele é encontrado também na IACCTC05-5580, IACCTC06-5732, IACCTC07-7270, IACSP01-8082, IACSP03-2014 e GBWI1103, atingindo uma frequência de 42 que é equivalente a pouco mais de 67.74%, um pouco maior se comparada a frequência dos outros marcadores. Portanto, 37 variedades são positivas para ambos os marcadores de Bru1, ou seja, 59.77% (Tabela 4), um valor próximo do esperado, já que NEUBER et al. (2017) haviam analisado outras variedades do Programa de Melhoramento do IAC, sendo 61,9% delas positivas para ambos os marcadores de Bru1. O resultado da eletroforese pode ser visualizado na figura 4.

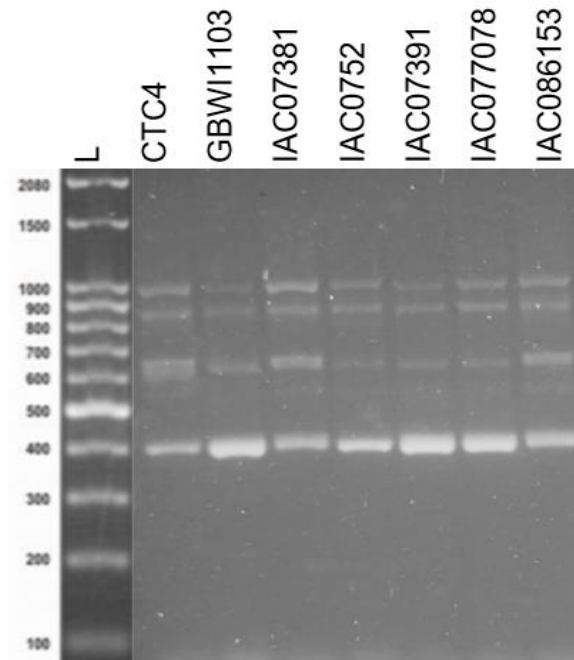
**Tabela 4** - Frequência da presença do marcador da reação 2 de Bru1 nas amostras estudadas.

Bru1 R2	Porcentagem (%)
0 (ausência)	29.032
1 (presença)	67.742
Total de amostras	100.000

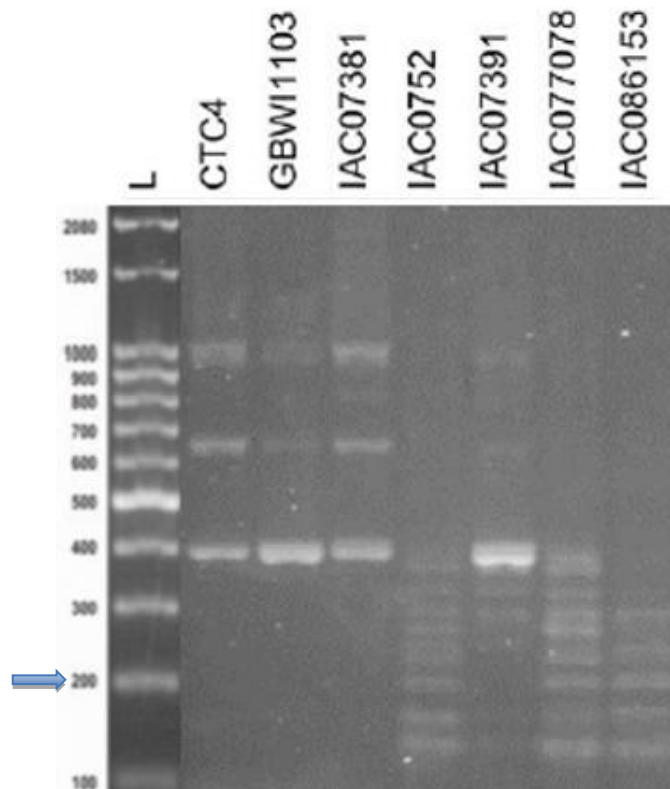
**Fonte:** Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

**Figura 4 - (a)** Foto do teste de amplificação para reação 2 do marcador diagnóstico Bru1; ladder de 100 pb (L). **(b)** Foto da eletroforese do marcador diagnóstico Bru1 reação 2 (200 pb) para ferrugem marrom: Ladder de 100 pb (L); as amostras CTC4, GBWI1103, IAC07-381 e IAC0752 são negativas; as amostras IAC07-391, IAC07-7078 e IAC08-6153 são positivas. Ambos os géis foram visualizados em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

a)



b)

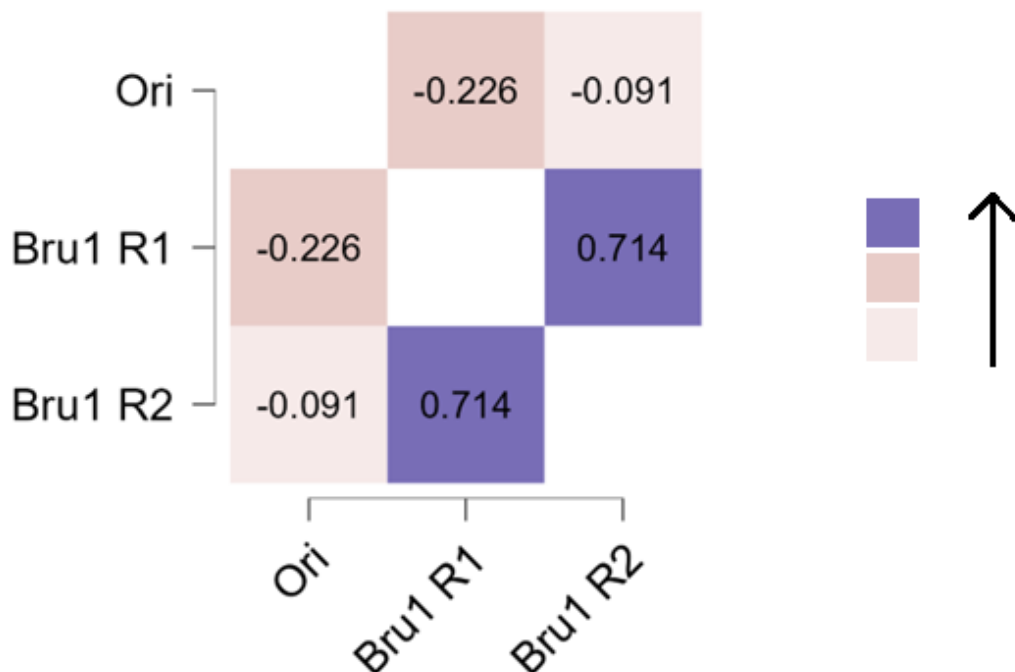


Fonte: Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

Apesar de as amostras IAC07-381, IACCTC05-5580, IACCTC06-5732, IACCTC07-7207, IACCTC07-7270, IACSP01-8082, IACSP03-2014 e GBWI1103 possuírem apenas um dos marcadores para Bru1, é possível que ainda assim possam apresentar este gene, que possui uma alta frequência (73,5%), como já citado anteriormente, nas amostras com a presença de marcadores diagnósticos. Além de que, de acordo com estudos anteriores, algumas variedades que apresentam apenas um dos marcadores de Bru1 também possuem resistência considerável à ferrugem marrom (NEUBER et al., 2017).

Para verificar a presença de correlação entre os marcadores foi feita a análise de correlação de Pearson (Figura 5). Conforme os resultados obtidos, pode-se verificar que não há correlação entre os marcadores Bru1 e Ori, enquanto há uma correlação positiva e significativa (0,714;  $P < 0,001$ ) entre a presença dos dois marcadores que flanqueiam o gene Bru1. Isto indica, mais uma vez, que a utilização de apenas um deles, como por exemplo, o que dispensa a digestão, seria suficiente para avaliar a presença do gene Bru1, economizando esforços e recursos financeiros.

**Figura 5** – Gráfico da correlação entre marcadores.



**Fonte:** Luciana Rossini Pinto (2023)

## 4.2 Sequenciamento e alinhamento genético

O sítio de restrição da enzima RsaI no sentido 5'-3' é GT<sup>^</sup>AC, enquanto no 3'-5' é CA<sup>^</sup>TG. O resultado esperado do sequenciamento das amostras CTC4, IAC07-381, IAC07-52 e IAC12-7060, era a ausência do sítio de restrição de RsaI, porém ele esteve presente em todas as sequências no mínimo uma vez, como observado no alinhamento abaixo (Figura 6). Todas as amostras foram alinhadas de acordo com suas sequências semelhantes que foram amplificadas pelo par de primers 9020-F4, assim é possível comparar a região em que estão localizados os sítios de restrição de cada variedade para a enzima utilizada no estudo.

**Figura 6** - Alinhamento múltiplo de sequências consenso: sequência completa da R570 adquirida através do GenBank (FN431669.1), R570 (LP01), CTC4 (LP02), IAC07-381 (LP03), IAC07-52 (LP04) e IAC12-7060 (LP05). Primer forward destacado em azul; primer reverse destacado em verde; sítio de restrição (GTAC) de RsaI destacado em amarelo.

```

FN431669.1 ACCATAAATTC AATTC TGCAGGTAC GTCAGAATTGGACCCCAAGAAGACTTCGTCATTTC 60
LP03 ----- 0
LP05 ----- 0
LP04 ----- 0
LP01 ----- 0
LP02 ----- 0

FN431669.1 AGTACCCCAACACTATGTCCAGATGACCTCATGGAA GTACAGGCCATGCATCGATATTGGGT 120
LP03 ----- 0
LP05 ----- CATTGATATTGGGT 14
LP04 ----- CATTGATATTGGGT 14
LP01 ----- CATCGATATTGGGT 14
LP02 ----- CATTGATATTGGGT 14

FN431669.1 TAAGGTGTGTGGAGGTTGATCAGTTCTGGAGGCGTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 180
LP03 ----- GGAGGCGTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 33
LP05 TAAGGCGTGTGGAGGTTGATCA GTACCGGAGGCCTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 74
LP04 TAAGGCGTGTGGAGGTTGATCA GTACCGGAGGCCTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 74
LP01 TAAGGTGTGTGGAGGTTGATCAGTTCTGGAGGCGTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 74
LP02 TAAGGCGTGTGGAGGTTGATCA GTACCGGAGGCCTTCCATAGTGGAGATTGTTGACAGGC 74
*****

FN431669.1 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 240
LP03 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 93
LP05 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 134
LP04 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 134
LP01 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 134
LP02 TOCAGGGAAGACGTTCTTTCTAGATGAAAGACTAGGTATGAACACTAGGGACACCGATGT 134
*****

FN431669.1 GCTCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGTGTTATTGT GTACTGTGTATGAG 300
LP03 GCTCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGTGTTATTGT GTACTGTGTATGAG 153
LP05 GCTCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGT GTACTGTGTATGAT--G 192
LP04 GCTCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGT GTACTGTGTATGAT--G 192
LP01 G-TCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGT GTACTGTGTATGAG 193
LP02 GCTCTGTTAGTATGATTTGGTTTTACTATGTTGTATTGT GTACTGTGTATGAT--G 192
* *****

```

```

FN431669.1      AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAACAGGACGGCCTATGCCATCT 360
LP03            AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAA----- 194
LP05            AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAA----- 233
LP04            AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAA----- 233
LP01            AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAA----- 234
LP02            AGGCTGACAAGTTTTACACAAATCTAGATCTAGCGCAAGCAA----- 233
*****

FN431669.1      TAAATCTGAGTGGCCACTAAAATTATGTA 389
LP03            ----- 194
LP05            ----- 233
LP04            ----- 233
LP01            ----- 234
LP02            ----- 233

```

**Fonte:** Victória Letícia Justiniano Piña (2022).

Portanto, o fator responsável pela falha da atividade de RsaI, provavelmente está ligado à baixa qualidade destas amostras, pois os sítios de restrição estão presentes na sequência consenso de DNA e mesmo após serem feitas as 4 repetições dessa reação, houve falha na digestão do material. Esta queda de qualidade pode ter ocorrido devido ao período de transporte das folhas que foram utilizadas no experimento e armazenamento das amostras pós maceração no ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , além de erros durante a extração, como o contato com contaminantes.

## 5. CONCLUSÕES

A frequência do marcador Ori foi de 48.38%, enquanto a do gene Bru1 (com a presença dos dois marcadores) foi de 59.77%.

Apesar de a presença de marcadores inferir uma possível resistência das variedades de cana-de-açúcar às ferrugens, ainda são necessários dados fenotípicos para a corroboração desta hipótese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAITHWAITE, Kathy *et al.* Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehniin* a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 38, n. 4, p. 380-388, 2009. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1071/ap09012>

CHANDRA, Amaresh.; KEIZERWEERD, Amber; GRISHAM, Michael. Detection of *Puccinia kuehnii* Causing Sugarcane Orange Rust with a Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Assay. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 58, n. 3, p. 188-

196, 2 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-016-9914-5>

COMPANHIA Nacional de Abastecimento (Conab). Produção de cana-de-açúcar cresce 4,4% e pode chegar a 598,3 milhões de toneladas na safra 2022/23, Brasília, 27 de dezembro de 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 4 de janeiro de 2023.

COSTET, Laurent *et al.* Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlim, v. 125, n. 5, p. 825-836, 10 maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1875-x>

CUNFF, Loic *et al.* Diploid/Polyploid Syntenic Shuttle Mapping and Haplotype-Specific Chromosome Walking Toward a Rust Resistance Gene (Bru1) in Highly Polyploid Sugarcane ( $2n \sim 12x \sim 115$ ). **Genetics**, Oxford, v. 180, n. 1, p. 649-660, 1 set. 2008. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.108.091355>

D'HONT, Angélique. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic And Genome Research**, Montpellier, v. 109, n. 1-3, p. 27-33, 2005. S. Karger AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000082378>

DAUGROIS, Jean-Heinrich *et al.* A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlim, v. 92, n. 8, p. 1059-1064, jun. 1996. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00224049>

DE LIMA, Lonjoré. Aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar (*Puccinia kuehni*). Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p. 77. 2013.

FIER, Ícaro. *et al.* Field resistance and molecular detection of the orange rust resistance gene linked to G1 marker in Brazilian cultivars of sugarcane. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 46, n. 2, p. 92-97, jun. 2020. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/221803>

GLYNN, Neil *et al.* PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehni* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical

distribution in *P. kuehni*. **Plant Pathology**, Londres, v. 59, n. 4, p. 703-711, 24 mar. 2010. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02299.x>

HALL, Tom. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 98/98/NT. Versão 7.2.5, [S.L.], 1999. Disponível em: <https://bioedit.software.informer.com/>

JOKESHI, Hasime. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, Hiroshi (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 19, p. 199-214.

MAGAREY, Robert. Diseases caused by fungi: Orange rust. In: ROTT, Philippe (Ed.). A guide to sugarcane diseases. 1 ed. Montpellier: Cirad, 2000, v. 1, p. 121-125.

MCCORD, Per; GLYNN, Neil; COMSTOCK, Jack. Identifying markers for resistance to sugarcane orange rust (*Puccinia kuehni*) via selective genotyping and capture sequencing. **Euphytica**, Wagenigen, v. 215, n. 9, set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-019-2340-6>

MCWILLIAM, Hamish *et al.* Analysis Tool Web Services from de EMBL.EBI. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. W597-W600, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>

MUNGUR, Harrydas *et al.* Presence of Sugarcane Orange Rust in Mauritius. **Sugar Tech**, Kalyan, v. 22, p. 671–674, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00818-x>

NEUBER, Ana *et al.* Survey of the Bru1 gene for brown rust resistance in Brazil local and basic sugarcane germoplasm. **Plant Breeding**, Berlim, v. 136, n. 2, p. 182-187, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbr.12463>

PEIXOTO JÚNIOR, Rafael. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem marrom em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 66. 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-12062012-163104/en.php>

RAID, Richard; COMSTOCK, Jack. Sugarcane rust disease. Gainesville: **IFAS Extension - University of Florida**, Gainesville, 2006. 3 p. (SS-AGR-207).

UNIVERSIDADE DE AMSTERDÃ. JASP. Versão 0.17.1, Amsterdã, 2023. Disponível em: <https://jasp-stats.org/download/>

WANG, Heng-Bo *et al.* Molecular insights into the origin of the brown rust resistance gene Bru1 among *Saccharum* species. **Theoretical And Applied Genetics**, Berlim, v. 130, n. 11, p. 2431-2443, 18 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-017-2968-3>

YANG, Xiping *et al.* Identifying Quantitative Trait Loci (QTLs) and Developing Diagnostic Markers Linked to Orange Rust Resistance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). **Frontiers In Plant Science**, Lausana, v. 9, 19 mar. 2018. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00350>

ZHAO, Duli *et al.* Orange Rust Effects on Leaf Photosynthesis and Related Characters of Sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. 640-647, jun. 2011. Scientific Societies. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-10-0762>