

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Saccharum* spp.
RESISTENTES AO AMARELINHO (*Sugarcane yellow leaf*
***virus*) E AO MOSAICO (*Sugarcane mosaic virus*) E**
ASSOCIAÇÃO A MARCADORES MOLECULARES

Roberto Carlos Burbano Villavicencio

Mestre em Biotecnologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICATION OF *Saccharum* spp. GENOTYPES
RESISTANT TO YELLOW LEAF DISEASE (*Sugarcane
yellow leaf virus*) AND MOSAIC DISEASE (*Sugarcane
mosaic virus*) AND ASSOCIATION TO MOLECULAR
MARKERS**

Roberto Carlos Burbano Villavicencio

Orientador: Profa. Dr^a. Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Cesar Gonçalves

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

2019

B946i

Burbano Villavicencio, Roberto Carlos

Identificação de genótipos de *Saccharum* spp. resistentes ao amarelinho (Sugarcane yellow leaf virus) e ao mosaico (Sugarcane mosaic virus) e associação a marcadores moleculares / Roberto Carlos Villavicencio Burbano. -- Jaboticabal, 2019

140 p. : tabs., fotos

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

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientador: Marcos Cesar Gonçalves

1. Cana-de-açúcar. 2. SCYLV. 3. SCMV. 4. Mapeamento associativo. 5. Resistência.

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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Saccharum* spp. RESISTENTES AO AMARELINHO (*Sugarcane yellow leaf virus*) E AO MOSAICO (*Sugarcane mosaic virus*) E ASSOCIAÇÃO A MARCADORES MOLECULARES

AUTOR: ROBERTO CARLOS BURBANO VILLAVICENCIO

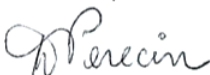
ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO

COORDENADOR: MARCOS CESAR GONÇALVES

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



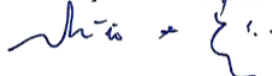
Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP



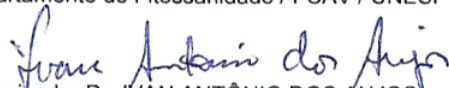
Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN
Departamento de Ciências Exatas / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisadora Dra. PAULA MACEDO NOBILE
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. IVAN ANTÔNIO DOS ANJOS
Centro Avançado de Tecnologia do Agronegócio Cana / IAC/APTA - Ribeirão Preto / SP

Jaboticabal, 29 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTO CARLOS BURBANO VILLAVICENCIO nasceu em 15 de março de 1977 na cidade de Guayaquil, no Equador. Foi formado na *Universidad Agraria del Ecuador* em janeiro de 2002 como engenheiro agrônomo. Em janeiro de 2009, ele conclui seu mestrado em Biotecnologia Agrícola pela *Escuela Superior de Politécnica del Litoral (ESPOL)* do Equador. Em maio de 2010, Roberto Burbano iniciou sua carreira como professor associado na Universidade ESPOL, tornando-se professor de Bioquímica e Microbiologia e esteve envolvido em vários projetos focados em controle biológico para o manejo de pragas e doenças de plantas. Além disso, é autor do livro “*Química Orgânica*” publicado em 2011 por “*Editorial Holguín*” e alguns outros trabalhos de pesquisa. A partir de setembro do mesmo ano, foi indicado como Coordenador do Curso de Engenharia Agrícola na ESPOL; cargo que possuía até julho de 2015. Desde agosto de 2015, iniciou seu doutorado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Jaboticabal, como pesquisador bolsista da PAEDex -AUIP.

AGRADECIMENTOS

Desejo manifestar o meu sentido agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que este trabalho se concretizasse.

À Profa. Dra. Luciana Rossini Pinto e Prof. Dr. Marcos Cesar Gonçalves pelas contínuas orientações de ordem científica e profissional.

Ao Dr. Prof. Dilermando Perecin pelas orientações nas análises estatísticas.

Ao Dr. Marcel Silva e Dra. Paula Nobile pelas orientações nos trabalhos de transformação genética e PCR quantitativa.

Ao Dr. Ivan dos Anjos e a sua equipe de trabalho, pelas contribuições e orientações nas avaliações fenotípicas realizada em campo.

Ao Instituto Agronômico de Campinas – Centro de cana, pela disponibilidade, tanto do seu contingente humano, assim como das instalações físicas e equipamentos necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às Instituições: *Programa de Apoyo a Estudiantes extranjeros de Doctorado (PAEDEX)* e a *Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnologia* do Equador (*SENESCYT*) pela concessão de bolsa de estudos e suporte financeiro. À *Escuela Superior Politecnica del Litoral (ESPOL)* por me brindar as condições necessárias para realizar os meus estudos de doutorado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -	IV
ABSTRACT -	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
CAPITULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Origem e taxonomia da cana-de-açúcar	5
2.2. Vírozes da cana-de-açúcar: amarelinho e mosaico	7
2.3. Fontes e herança da resistência ao amarelinho e mosaico	12
2.4. Marcadores moleculares em cana de açúcar	13
2.5. Mapeamento associativo aplicado ao melhoramento genético de plantas	15
3. REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DO GÊNERO <i>Saccharum</i> spp. PARA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO AMARELINHO DA CANA-DE-AÇÚCAR (SCYLV) COMBINANDO MÉTODOS QUANTITATIVOS DE CONCENTRAÇÃO VIRAL E MENSURAÇÃO VISUAL DA DOENÇA	30
RESUMO.....	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. METODOLOGIA	35
2.1. Coleção de genótipos do gênero <i>Saccharum</i> spp.	35
2.2. Ensaios de campo	35
2.2.1. Estabelecimento de viveiro em condições de campo	35
2.2.2. Estabelecimento de ensaio a campo com delineamento experimental de blocos completos ao acaso (DBCA)	40
2.3. Avaliação de sintomas do SCYLV no viveiro e no ensaio em DBCA.....	41
2.4. Detecção do SCYLV mediante o teste DAS – ELISA no viveiro.....	42
2.5. Determinação da concentração do vírus mediante RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) no ensaio em DBCA.....	43
2.5.1. Amplificação e purificação do fragmento codificante para a capa protéica do SCYLV.....	43

2.5.2. Clonagem do fragmento de 450 bp e elaboração da curva padrão	44
2.5.3. Reação de RT-qPCR	45
2.5.4. Análise de dados	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Severidade do SCYLV em condições de viveiro e quantificação da concentração viral mediante DAS-ELISA	48
3.2. Avaliação da severidade do SCYLV em condições de ensaio a campo em DBCA.....	54
3.3. Quantificação do SCYLV por RT-qPCR.....	59
3.4. Componentes da variância e herdabilidade	68
4. CONCLUSÕES	70
5. REFERÊNCIAS.....	71
CAPITULO 3 - AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO (<i>Sugarcane mosaic virus</i>, <i>SCMV</i>) EM UM PAINEL DE GENÓTIPOS DO GÊNERO <i>Saccharum</i> spp.....	77
RESUMO.....	77
1. INTRODUÇÃO	78
2. METODOLOGIA	82
2.1. Genótipos do género <i>Saccharum</i> spp.....	82
2.2. Ensaio de campo	82
2.2.1. Estabelecimento de ensaio de campo	82
2.2.2. Avaliação da severidade do SCMV	85
2.2.3. Análise de dados	86
2.3. Identificação da estirpe de SCMV predominante no grupo de genótipos avaliados.....	87
2.3.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA	87
2.3.2. Amplificação por RT-PCR da sequência que codifica para a CP do SCMV.....	87
2.3.3. Digestão e sequenciamento do fragmento amplificado de 888pb referente à sequência que codifica para a CP do SCMV	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1. Componentes da variância	90

3.2. Severidade do SCMV em condições de ensaio de campo	91
3.3. Identificação da estirpe de SCMV	98
4. CONCLUSÕES	103
5. REFERÊNCIAS.....	104
CAPITULO 4 - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA AO <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> - SCYLV E <i>Sugarcane mosaic virus</i> – SCMV, EM UM PAINEL DE MAPEAMENTO ASSOCIATIVO DE GENÓTIPOS DO GÊNERO <i>Saccharum</i> spp.	110
1. INTRODUÇÃO	111
2. METODOLOGIA	114
2.1. Coleção de genótipos do gênero <i>Saccharum</i> spp.	114
2.2. Estabelecimento de ensaio a campo	114
2.3. Avaliação fenotípica da severidade do SCMV e SCYLV	117
2.4. Genotipagem com marcadores moleculares	118
2.4.1. Extração de DNA genômico	118
2.4.2. Marcadores microssatélite (SSR, <i>Single Sequence Repeat</i>).....	118
2.4.3. Marcadores AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	120
2.5. Análise de dados	122
2.5.1. Análise de dados fenotípicos para amarelinho e mosaico	122
2.5.2. Avaliação da estrutura genética da população	123
2.5.3. Análise de associação	123
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.1. Análise de dados fenotípicos	125
3.2. Análise da estrutura da população	128
3.3. Análise de associação	131
4. CONCLUSÕES	133
5. REFERÊNCIAS.....	134
CONCLUSÕES GERAIS	140

IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Saccharum* spp. RESISTENTES AO AMARELINHO (*Sugarcane yellow leaf virus*) E AO MOSAICO (*Sugarcane mosaic virus*) E ASSOCIAÇÃO A MARCADORES MOLECULARES

RESUMO – O vírus do amarelinho (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) e o vírus do mosaico (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) são duas importantes viroses que afetam os canaviais dos países produtores de cana-de-açúcar no mundo. As principais características da resistência a essas viroses, as metodologias de avaliação em campo, quantificação viral e as fontes de resistência foram estudadas neste trabalho. Para atingir esse objetivo foi estabelecido um painel com 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. provenientes do banco ativo de germoplasma do Centro de Cana - IAC (Instituto Agronômico de Campinas). A resposta dos genótipos ao SCYLV e SCMV foi avaliada em campo utilizando uma escala diagramática de notas de sintomas e a concentração viral do SCYLV foi determinada mediante DAS-ELISA e RT-qPCR. Os genótipos do painel susceptíveis ao SCMV foram amostrados e uma análise de sequenciamento da sequência parcial do gene que codifica a capa proteica foi feita para determinar a estirpe predominante no ensaio. Adicionalmente, e com o intuito de identificar marcadores moleculares associados com resistência ao SCYLV e SCMV, foi realizado um estudo de análise de associação entre marcas moleculares e notas de severidade de sintomas. O painel foi genotipado com 955 marcas polimórficas usando AFLP e SSR e submetido a análise de regressão linear simples. Um total de 29 genótipos foram categorizados como resistentes para o SCYLV e 72 para SCMV, considerando que a estirpe predominante causadora dos sintomas de mosaico é a SCMV-RIB1. A principal fonte de resistência aos vírus estudados, provavelmente, é composta de acessos de *Saccharum spontaneum* e, em menor proporção, de *Saccharum robustum*. Para o amarelinho, houve uma baixa correspondência entre sintomas expressos e concentração de vírus presente nos tecidos amostrados, principalmente nos genótipos categorizados como moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis. Quatro marcas (AFLP289, AFLP703, AFLP424 e AFLP384) foram identificadas como associadas à susceptibilidade à doença ($p < 0,001$), sendo as duas primeiras para o amarelinho e as restantes para o mosaico. A marca (AFLP346) foi associada com resistência ao SCMV. Os genótipos KRAKATAU, IN84-82, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277 e IACBIO279 não apresentaram nenhuma das marcas associadas com susceptibilidade, enquanto a marca AFLP346 esteve presente em todos eles. Estes genótipos também registraram ausência de sintomas para as duas doenças, podendo ser catalogados como resistentes, tanto ao SCYLV como ao SCMV.

Palavras chave: Cana-de-açúcar, SCYLV, SCMV, resistência, mapeamento associativo.

**IDENTIFICATION OF *Saccharum* spp. GENOTYPES RESISTANT TO YELLOW
LEAF DISEASE (*Sugarcane yellow leaf virus*) AND MOSAIC DISEASE
(*Sugarcane mosaic virus*) AND ASSOCIATION TO MOLECULAR MARKERS**

ABSTRACT - *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) and *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) are two important viruses affecting the sugarcane producing countries worldwide. The main resistance characteristics of these viruses, symptoms expression phenotyping, virus titer and sources of resistance were studied in this research. To achieve this goal, a panel with 98 genotypes of *Saccharum* spp. genus was established from the active germplasm bank of the IAC Sugarcane Research Centre (*Instituto Agronômico de Campinas*). Genotypes responses to SCYLV and SCMV was evaluated in the field using a diagrammatic scale of symptoms and SCYLV virus titer was measured by DAS-ELISA and RT-qPCR. Genotypes with SCMV symptoms were sampled and the partial sequence of the coat protein gene analyzed by sequencing and restriction fragment polymorphism to determine the predominant strain in the plot. In order to identify molecular markers associated to SCYLV and SCMV resistance, an association study between molecular markers and symptoms severity was performed. The panel was genotyped with 955 polymorphic markers using AFLP and SSR and subjected to simple regression analysis. A total of 29 and 72 genotypes were categorized as SCYLV and SCMV resistant, respectively. Our study suggests that the predominant strain causing mosaic symptoms was SCMV-RIB1. The main source of resistance to these viruses probably comes from *Saccharum spontaneum* accessions and, in smaller proportion, from *Saccharum robustum*. To SCYLV, there was a low correlation between expressed symptoms and virus titer in the tissues sampled, mainly in moderately resistant and moderately susceptible genotypes. Four markers (AFLP289, AFLP703, AFLP424 and AFLP384) were identified as associated to the susceptibility of the viruses ($p < 0.001$), the first two for SCYLV and the remaining for SCMV. The (AFLP346) marker was associated to SCMV resistance. KRAKATAU, IN84-82, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277 and IACBIO279 genotypes did not exhibit any of the markers associated with susceptibility, whereas the AFLP346 marker was present in all of them. These genotypes also registered absence of symptoms for both diseases, being classified as resistant for both, SCYLV and SCMV.

Key words: Sugarcane, SCYLV, SCMV, resistance, association mapping.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP-RGA: Amplified Fragment Length Polymorphism – Resistant Gene Analogous

cDNA: DNA complementar

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DEPEC: Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich - ELISA

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAOSTAT: Food and Agriculture Data

GWAS: Genome Wide Association

QR: Quantificação relativa da sequência codificante da capa proteica do vírus

QTL: Quantitative Trait Loci

RAPD: Random Amplified Polymorphism DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCR: Reverse Transcript – Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR: Reverse Transcript – quantitative Polymerase Chain Reaction

SSR: Single Sequence Repeat

SCMV: Sugarcane mosaic virus

SCMV-RIB-1: Sugarcane mosaic virus – estirpe isolada de Guaíra

SCMV-PIR-2: Sugarcane mosaic virus – estirpe isolada de Piracicaba

SCMV-JAU-1: Sugarcane mosaic virus – estirpe isolada de Jaú

SCYLV: Sugarcane yellow leaf virus

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TVD: Top Visible Dewlap

UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages. Método de agrupamento aplicado em estudos de divergência genética

YLS: Yellow leaf síndrome

CAPITULO 1- Considerações Gerais

1. Introdução

A cana-de-açúcar é um dos grandes *commodities* no mundo por ser a matéria prima para elaboração de açúcar, etanol e subprodutos; e uma importante alternativa para a geração de energia. A produção de cana-de-açúcar no mundo é liderada pelo Brasil, cuja produção para o período 2017/18, foi estimada em 633,26 milhões de toneladas (CONAB, 2018), seguido por Índia e China, com 348,4 e 123 milhões de toneladas, respectivamente, para o mesmo período (FAOSTAT, 2018). A partir dessa cultura e da beterraba é produzido ao redor do 60% do etanol que é consumido no mundo, seguido pelos grãos de milho que geram o 40% restante.

A cana-de-açúcar é uma cultura semi-perene, podendo ser colhida até em cinco safras. Depois de plantada, a cana demora até 18 meses para ser colhida. Geralmente, as usinas renovam em torno de 20% do canavial por ano e a cada cinco anos fazem a sua rotação, empregando-se a soja ou amendoim (DEPEC, 2017). A cultura da cana-de-açúcar representa uma enorme fonte de mão de obra no meio rural, ao redor do mundo, por ser cultivada em mais de 100 países, constituindo-a como uma das principais culturas do planeta (FAOSTAT, 2018).

Segundo a CONAB (2018), a área colhida de cana-de-açúcar no Brasil, na safra 2017/18, foi de 8,73 milhões de hectares. A produção de açúcar, atingiu 37,87 milhões de toneladas, e a produção de etanol de 27,76 bilhões de litros, etanol anidro: 11,09 bilhões de litros (utilizada na mistura com a gasolina) e etanol hidratado: 16,67 bilhões de litros. O Brasil exhibe dois períodos distintos de safra: de setembro a março no Norte-Nordeste, e de abril a novembro no Centro-Sul. Dessa forma, o Brasil tem condições para produzir etanol ao longo dos doze meses do ano.

A produtividade de cana-de-açúcar estimada para safra 2017/18 foi de 72,54 kg/há. A produção para esse período, mostra a região Sudeste, e particularmente o Estado de São Paulo, como o maior produtor do Brasil, com 417,47 milhões de toneladas. A segunda região de importância na produção é o Centro-Oeste, com uma produção de 133,66 milhões de toneladas. Outras regiões como o Nordeste, sul e norte aportaram com 41,14; 37,52 e 3,46 milhões de toneladas, respectivamente

para o mesmo período de safra. É importante destacar que o Estado de São Paulo produz aproximadamente o 55% de toda a cana, açúcar e etanol do país, seguido do estado do Goiás com 11,15% e Paraná, com 5,9% da cana moída no Brasil (CONAB, 2018).

As melhores destilarias produzem aproximadamente 85 litros de etanol anidro por tonelada de cana. As usinas brasileiras estão concentradas na Zona da Mata Atlântica, na região Nordeste e no Estado de São Paulo, na região Sudeste (Kohlhepp, 2010), atingindo uma produção de ao redor de 71 kg de açúcar e 42 litros de etanol para cada tonelada de cana processada (Beauclair, 2011).

A cana-de-açúcar é afetada por várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Particularmente as viroses constituem fatores limitantes para incrementar a sua produtividade. Entre as viroses destaca-se o vírus do amarelinho e o vírus de mosaico, induzindo a expressão de severos sintomas em cultivares que antigamente foram consideradas importantes por apresentar bons caracteres agronômicos. Esta obsolescência das cultivares redundou na sua substituição, causando grandes perdas pelos novos investimentos no desenvolvimento de novos materiais genéticos e na renovação nos canaviais (Gonçalves et al., 2012).

O vírus do amarelinho tem causado grandes perdas, praticamente em todos os países produtores de cana-de-açúcar, particularmente nas cultivares susceptíveis, atingindo perdas de até 54 – 60% (Ramouthar et al., 2013). Estratégias para obter plantas livres do vírus a partir de meristemas têm sido realizadas com sucesso. No entanto, o risco de reinfeção é alto quando são plantadas no campo. No Hawaii, 80% das plantas foram reinfetadas após quatro meses de plantio (Chinnaraja e Viswanathan, 2015). No Brasil, o vírus de amarelinho foi observado a partir de 1989 nos canaviais do sudeste do país, principalmente no estado de São Paulo (Sordi, 1996; Scagliusi, 2003). A cultivar SP71-6163, foi a mais afetada pela doença, constituindo um importante problema para a produção de cana brasileira no início da década dos anos 90, considerando que essa cultivar representou ao redor do 22 - 25% da área cultivada no estado de São Paulo (Sordi, 1996; Veja et al., 1997).

Por muitos anos, o mosaico da cana-de-açúcar (SCMV, *Sugarcane mosaic virus*) foi considerado uma das doenças mais importantes dessa cultura (Gonçalves

et al., 2007). Segundo os autores, o vírus apresenta várias estirpes nos canaviais avaliados, sendo SCMV-RIB1, a estirpe predominante, quem afeta os canaviais do Estado de São Paulo, no Brasil, causando severos sintomas em clones e cultivares comerciais. A estirpe SCMV-RIB1 tem sido considerado como uma nova estirpe, sendo agrupada junto com outros isolados identificados no Brasil, tais como JAU1 e PIR2. As estirpes RIB1, JAU1 e PIR2 foram isoladas respectivamente no Estado de São Paulo, nos municípios de Ribeirão Preto, Jaú e Piracicaba (Gonçalves et al., 2007).

Algumas estratégias têm sido aplicadas para o controle do mosaico, entre elas está a técnica de *roguing* em viveiros, que visa a eliminação de plantas com sintomas da doença e o uso de cultivares resistentes. Isso faz com que nos programas de melhoramento seja aplicada a seleção de clones resistentes e tolerantes a esta doença (Medeiros et al., 2014).

A base genética das cultivares atuais de cana-de-açúcar, em muitos programas de melhoramento ao redor do mundo, é estreita devido ao limitado número de clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum* envolvidos na obtenção dos primeiros híbridos interespecíficos dos quais derivaram as cultivares atuais (Aitken e McNeil, 2010). Esse fato, levou à necessidade de gerar uma coleção muito diversa de germoplasma de cana-de-açúcar, assim como hibridação interespecífica e cruzamentos entre cultivares comerciais e espécies selvagens (Berding e Roach, 1987). Nos programas de melhoramento genético é necessário um registro completo dessas espécies selvagens e das cultivares disponíveis que serão eventualmente utilizadas nos cruzamentos para a geração de novos genótipos que apresentem uma maior concentração de alelos favoráveis (Landell e Silva, 2004). A resistência e susceptibilidade a doenças causadas por vírus é uma das importantes questões que devem ser consideradas com o objetivo de obter novas cultivares melhoradas geneticamente resistentes às viroses do mosaico e amarelinho (Landell e Silva, 2004).

O uso de marcadores moleculares tem sido útil para o estudo dos genomas de plantas constituindo uma ferramenta importante para o melhoramento das culturas (Kesawat e Das, 2009). A partir do polimorfismo no DNA são gerados mapas genéticos mediante potentes ferramentas estatísticas que permitem

encontrar uma associação entre os marcadores moleculares e a variação fenotípica de caracteres agrônômicos de interesse (Govindaraj et al., 2015). A maioria desses caracteres são de herança quantitativa e as regiões que controlam esses caracteres, denominadas de loci de característica quantitativa (*Quantitative Trait Loci* –QTL) (Mackay et al., 2009). O mapeamento associativo quando comparado com o mapeamento de QTL, foca na utilização de populações naturais ou painéis constituídos por bancos de germoplasma, criando uma vantagem no tempo para identificar a associação marcador-característica e maior poder na detecção de associações (Stich e Melchinger, 2010).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar a fenotipagem e genotipagem de genótipos do gênero *Saccharum* spp. para avaliar a severidade dos vírus do amarelinho e mosaico, e identificar por meio da metodologia de regressão linear simples, marcadores associados com resistência a essas duas doenças.

2. Revisão de literatura

2.1. Origem e taxonomia da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, originária do Sudeste da Ásia (Mukherjee, 1957), pertencente à família *Gramineae* (*Poaceae*), subfamília *Panicoidae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum* (Lucchesi, 2001). As espécies de *Saccharum* spp. são altamente poliploides, possuindo um número básico de cromossomos que vai de 5, 6, 8, 10 até 12, além de apresentarem aneuploidia (D'Hont et al., 1998).

Seis espécies ocorrem no gênero *Saccharum*: *S. officinarum* Linnaeus (2n=80), *S. spontaneum* Linnaeus (2n=40-128), *S. robustum* Brandes e Jeswit (2n=60-205), *S. sinense* Roxb. (2n=111-120), *S. barberi* Jeswit (2n=81-124) e *S. edule* Hassk. (2n=60-80) (Jeswiet, 1925, modificado por Artschwager & Brandes, 1956). Essas seis espécies, juntamente com os gêneros *Narenga* Bor, *Sclerostachya* (Anderss. Ex Hackel), *Erianthus* Michx. e *Miscanthus* Anderss. Seção *Ripidium* formam o "complexo *Saccharum*" (Mukherjee, 1957). No entanto, alguns autores, com base em dados moleculares sugerem que os acessos de *Saccharum* poderiam ser resumidos em duas espécies principais: *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Irvine, 1999; Nayak et al., 2014).

Estima-se que a espécie *S. officinarum* tem sua origem a partir da espécie *S. robustum*, segundo estudos moleculares baseados em RFLP que confirmam que as duas espécies são muito relacionadas quando comparadas com as outras quatro espécies de *Saccharum* estudadas (Glaszmann et al., 2003).

A domesticação da cana-de-açúcar em Nova Guiné é aceita pela maioria dos melhoristas, sendo considerada como a origem dos acessos de *S. officinarum* e *S. robustum*. A partir da Nova Guiné, os acessos foram distribuídos para a Indonésia, China, Índia, Micronésia e Polinésia (Moraes et al., 2015). Segundo Daniels e Roach (1987), a maior diversidade encontra-se nos seguintes centros de origem: Nova Guiné para *S. officinarum* e *S. robustum*, a China para *S. sinense* e o norte da Índia para *S. barberi*.

Existe evidencia de que *S. officinarum* foi transportada pelos humanos até as principais ilhas da Ásia (Brandes, 1956), e a partir de cruzamentos naturais com a espécie *S. spontaneum*, deu origem às espécies *S. barbieri* e *S. sinense* (Irvine, 1999; D'Hont et al., 2002). Estes resultados foram confirmados por Brown et al. (2002), mediante avaliação de acessos de *S. barberi*, *S. sinense*, *S. spontaneum* e *S. robustum*. Por outro lado, existem evidências de que *S. edule* teve sua origem a partir de cruzamentos intergenéricos entre *S. officinarum* e *S. robustum* com os gêneros relacionados, tais como *Miscanthus* e *Erianthus* (Irvine, 1999).

Recentes estudos baseados em ferramentas moleculares revelam que *S. spontaneum* apresenta a mais ampla diversidade genética, quando comparada com as outras espécies do gênero, sendo encontrado um alto grau de polimorfismo (84,25%) entre 40 acessos estudado por Sheji et al. (2006). O autor utilizou o coeficiente de Jaccard para calcular a similaridade genética dos acessos e agrupados mediante o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*). A distância genética entre os 40 genótipos variou de 29,8 a 60,0 com uma distância genética média de 48,9%.

O genoma das cultivares modernas é o resultado de hibridações interespecíficas da espécie domesticada *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Roach, 1989); contendo um número de cromossomos de 100 – 130, com aproximadamente 80% de cromossomos de *S. officinarum*, 10% de cromossomos de *S. spontaneum* e 10% de cromossomos recombinantes (D'Hont, 2005). Os clones da espécie *S. officinarum* ou "cana-nobre" contêm grande capacidade para acumular altos níveis de sacarose no colmo (Daniels e Roach, 1987); no entanto, possuem pouca resistência às doenças (Morais et al., 2015).

Nos programas de melhoramento, as hibridações entre as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, visaram introduzir características como rusticidade e resistência a fatores bióticos e abióticos (Landell e Bressiani, 2010), além de melhorar características como teor de fibra, visando obter cultivares com perfil bioenergético, maior teor de sacarose, boa pureza de caldo e colmos suculentos para a produção de açúcar (Paterson et al., 2013).

2.2. Viroses da cana-de-açúcar: amarelinho e mosaico

A cana-de-açúcar, e particularmente os híbridos interespecíficos e canas nobres (*Saccharum officinarum*), são afetadas por uma série de vírus que reduzem a sua produtividade (Xu et al., 2008). Entre os mais importantes encontramos o *Sugarcane bacilliform badnavirus* (SCBV), *Fiji disease fivirus* (FDV), *Sugarcane mild mosaic virus* (SCMMV), *Sugarcane streak virus* (SCSV), *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) e *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Rott et al., 2000; Lapierre et al., 2001). No entanto, as duas principais viroses reportadas nessa cultura são o SCYLV e SCMV.

O amarelinho da cana-de-açúcar, denominado inicialmente síndrome do amarelecimento foliar ou YLS (*Yellow leaf síndrome*, por suas siglas em inglês), foi relatado pela primeira vez no Havai em 1989 (Schenk, 1990). O YLS é uma doença de origem viral causada por uma partícula viral isométrica de aproximadamente 25 nm de diâmetro e contém RNA linear de fita simples e sentido positivo (Scagliusi, 2003).

Inicialmente, Moonam et al. (2000) afirmaram que SCYLV emergiu por eventos de recombinação entre ancestrais do gênero *Luteovirus* e *Polerovirus*. Maia et al. (2000) e Moonan et al. (2000), finalmente confirmaram que o SCYLV pertence ao gênero *Polerovirus*, da família *Luteoviridae* mediante caracterização molecular da proteína da cápside (CP, *coat protein*) do vírus via amplificação por RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) da sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína CP do vírus (uma proteína de 17 kDa). A comparação da sequência deduzida de aminoácidos compartilha um alto grau de identidade e similaridade com as correspondentes sequências de luteovirus conhecidos.

Os luteovírus são transmitidos por afídeos (insetos *Homópteros*) de maneira persistente, circulativa e não propagativa, ou seja, com a circulação do vírus pelo corpo do vetor, porém sem haver replicação do vírus no afídeo (Smith e Barker, 1999). No caso do SCYLV, o vírus é transmitido de uma forma semi-persistente pelos afídeos *Sipha flava*, *Melanaphis sacchari*, *Rhopalosiphum maidis*, *Rhopalosiphum rufoabdominalis*. No entanto, *M. sacchari* é considerado o principal vetor do vírus (Scagliusi e Lockhart, 2000; Chinnaraja e Viswanathan, 2015).

Os sintomas típicos causados pelo vírus são o amarelecimento foliar, começando pelo amarelamento da nervura central e, em estágios avançados o sintoma se espalha pelo limbo foliar (Figura 1). Na maioria das cultivares e genótipos avaliados, nos primeiros meses de desenvolvimento das plantas, os sintomas não se apresentam de forma acentuada (Cronje et al., 1998).



Figura 1. Sintomas de amarelinho da cana-de-açúcar. Observa-se o característico amarelamento da nervura central das folhas.

No Brasil, foi evidenciada a causa e origem da síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar mediante microscopia de luz e microscopia eletrônica, combinada com sorologia. Os resultados mostraram a presença de um material anormal de fluorescência verde-amarela no floema das plantas afetadas pela síndrome quando comparadas com as plantas sadias (Vega et al., 1997).

Existem várias ferramentas desenvolvidas para detectar a presença do SCYLV, destacando-se técnicas imunoenzimáticas como TBIA (*Tissue blot immunoassay*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), e ISEM (*immunosorbent electron microscopy*). Nestas metodologias de diagnóstico, são desenvolvidos anticorpos específicos que interagem com as proteínas do capsídeo dos *virions*, permitindo sua detecção (Scagliusi e Lockhart, 2000).

Uma das técnicas mais amplamente usadas para o diagnóstico do amarelinho é o TBIA, descrita inicialmente por Schenck et al. (1997). Por seu baixo custo e praticidade, a metodologia tem sido utilizada como ferramenta habitual para o monitoramento da doença nos canaviais dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, tais como Canal Point na Florida (Comstock et al., 1998), CIRAD na França (Chatenet et al., 2001), CENICANA, na Colômbia (Victoria et al., 2005) e CINCAE no Equador (Garcés et al., 2013). Debibakas et al. (2014) usaram a metodologia para fenotipagem de um painel de genótipos de cana-de-açúcar mediante amostragem de colmos e folhas com o primeiro *dewlap* visível (FVD, *first visible dewlap*). Os autores conseguiram estimar tanto a incidência como a severidade baseados na porcentagem de folhas e colmos encontrados positivos e mesurando a intensidade de fluorescência direta das partículas virais fixadas numa membrana de nitrocelulose, utilizando uma escala de 0 - 5.

Por outro lado, técnicas moleculares têm sido usadas para amplificar fragmentos de nucleotídeos codificando parcial ou totalmente a capa proteica do vírus. Entre essas ferramentas encontram-se a RT-PCR (*Reverse transcriptase-PCR*) (Comstock et al., 1998) e quantificação do produto amplificado mediante RTq-PCR (*Reverse transcriptase quantitative-PCR*). Essa última ferramenta tem sido utilizada com sucesso por Chinnaraja e Viswanathan (2015), mediante a elaboração de uma curva padrão a partir da amplificação por PCR convencional de um fragmento de DNA que codifica para a síntese da capa proteica do vírus e posterior clonagem do fragmento amplificado. Os autores fizeram diluições seriadas em uma escala de 10 vezes de cada diluição do plasmídeo ligado com o fragmento para obter os respectivos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) na qPCR. Os valores de *Ct* refere-se a ciclos determinados para cada amostra que apresenta um valor de fluorescência detectado na presença de um fluoróforo (normalmente *Cyber Green*). Baseados nos valores de *Ct* e na concentração logarítmica da diluição seriada, a curva padrão foi elaborada junto com a equação da reta e o coeficiente de determinação. Usando os dados da tangente e da intersecção da reta, foram estimadas a concentração do SCYLV nas respectivas amostras de concentração desconhecida.

A produção de plantas livres de vírus mediante cultura de tecidos tem sido utilizada como uma ferramenta para combater a doença causada por SCYLV. Fitch et al. (2001) produziram plantas livres do patógeno a partir de tecido meristemático de cultivares suscetíveis, e quase todas as linhas se mantiveram sadias por um tempo superior a quatro anos, quando plantadas em estufa ou em campos isolados. A reinfeção das plantas livres de vírus mediante afídeos virulíferos demonstrou que a produção de plantas a partir de tecido meristemático não afeta a susceptibilidade ao SCYLV. Chatenet et al. (2001) provaram que a cultura de meristemas apicais é mais eficiente para a geração de plântulas sadias quando comparada com a cultura de gemas, sendo a primeira técnica utilizada amplamente nas biofábricas para a indexação de plantas, além de ser uma alternativa para o intercâmbio de germoplasma de cana-de-açúcar sem o risco de introduzir o SCYLV em outros países.

Nos canaviais brasileiros, o vírus do mosaico da cana-de-açúcar é uma das doenças mais proeminentes desta cultura, ocorrendo várias epidemias, principalmente na década dos anos 20 (Gonçalves et al., 2007). Esse vírus é considerado como um subgrupo de quatro espécies de *potyvirus*: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) e *Sorghum mosaic virus* (SrMV) (Shukla et al., 1992).

Os sintomas característicos do mosaico são observáveis primeiramente nas folhas das plantas suscetíveis, sendo os indivíduos jovens com ativo crescimento, os mais suscetíveis quando comparado com aqueles com mais maturidade ou com crescimento lento (Perera et al., 2012). Como na maioria das viroses, a intensidade dos sintomas pode variar segundo o genótipo e as condições ambientais de crescimento, as espécies e as estirpes envolvidas na infecção.

O sintoma mais característico do mosaico é o padrão que contrasta com graus da cor verde, com frequência com ilhas de cor verde normal sob um fundo de verde claro ou áreas de amarelamento clorótico no limbo das folhas (Figura 2). Na maioria dos casos, as áreas cloróticas podem ser difusas, porém, podem ser intensamente definidas em alguns materiais infectados por determinadas estirpes do vírus (Rott et al., 2002).



Figura 2. Sintomas característicos de mosaico da cana-de-açúcar numa cultivar suscetível.

Todos os membros da família *Potyviridae* têm partículas filamentosas entre 650 - 900 nm e 11-13 nm de largura, construídas por proteínas da cápside (CP, *coat protein*) compostas por umas 2000 unidades, rodeando um genoma de RNA linear, fita simples de senso positivo com um tamanho de 8500 – 12000 nucleotídeos, possuindo uma calda de poly-A na extremidade 3' (Chen et al., 2001).

Estudos de diversidade genética conduzidos por Perera et al. (2009) relataram novos genótipos de SCMV e SrMV associados com mosaico na Argentina. A estirpe "E" de SCMV, identificada via RT-PCR e RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), é a mais frequente nos canaviais argentinos.

Essas mudanças no material genético que geram novas estirpes poderiam estar relacionadas com a substituição das cultivares plantadas. Grisham e Pan (2007) observaram no estado de Luisiana nos Estados Unidos, mudanças nos isolados a partir do plantio de novos cultivares na região.

Por outro lado, Gonçalves et al. (2012) em estudos realizados nas principais áreas canaveiras do Brasil, relataram a presença do isolado chamado de RIB-1 (presente na região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo), induzindo severos sintomas em várias espécies hospedeiras e particularmente em cultivares e clones de cana-de-açúcar antigamente considerados como resistentes para o mosaico.

Adicionalmente, foi descrito que isolados de mosaico presente no milho são de fato estirpes de SCMV via inoculação do vírus em plantas de sorgo "Rio" e "TX 2986" (Gonçalves et al., 2011).

2.3. Fontes e herança da resistência ao amarelinho e mosaico

A resistência ao vírus do mosaico dos cultivares de cana-de-açúcar dentro do gênero *Saccharum* pode variar dependendo do genótipo e do isolado envolvido na infecção, sendo *S. officinarum* o mais suscetível, seguido por *S. barberi* e *S. robustum* como moderadamente susceptíveis e; *S. sinense* e *S. spontaneum*, catalogados como resistentes (Koike e Gillaspie, 1989). Grisham et al. (1992) encontraram que os acessos de *Erianthus*, *S. spontaneum*, *S. barberi* e *S. sinense* foram os mais resistentes ao vírus de mosaico, acessos de *S. robustum*, os mais susceptíveis, enquanto híbridos interespecíficos e acessos de *S. officinarum*, intermediários. Por outro lado, pesquisas realizadas por Li et al. (2013), encontraram resistência a SrMV HH de alta a moderada na espécie *Erianthus arundinaceus* e em acessos de *S. spontaneum*.

Em trabalhos realizados por Silva et al. (2015a), foi relatada a existência de fontes de resistência para o SCMV. Essas fontes foram encontradas principalmente em clones das espécies *S. spontaneum* e *S. barberi*, confirmando os resultados obtidos por Koike e Gillaspie, (1989) e Grisham et al. (1992). Por outro lado, Silva et al. (2015b) encontraram que a herança da resistência a mosaico apresentou uma herdabilidade no sentido amplo, de 19,37% ao nível individual. Adicionalmente, os autores encontraram que a variância genética foi inferior à variância ambiental devido a efeitos ambientais, o que significa que a seleção individual para resistência a mosaico é ineficiente.

Em relação ao SCYLV, são conhecidas as fontes de resistência, sendo que acessos de *S. officinarum* apresentaram maior incidência da doença quando comparadas com *S. robustum* e *S. sinense*, enquanto clones híbridos do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar de Coimbatore, na Índia (acrônimo Co), mostraram resistência (Viswanathan et al., 2016).

Em estudos realizados por Komor (2011) utilizando cultivares havaianas, dois terços dos híbridos comerciais e canas nobres encontraram-se infectadas pelo SCYLV e, portanto, classificados como suscetíveis ao SCYLV, em contraste com as canas selvagens *S. spontaneum* e *Erianthus arundinaceus*, onde menos de um terço dos cultivares foram infectadas. Por outro lado, em cruzamentos feitos entre um cultivar resistente de *S. robustum* e um suscetível de *S. officinarum*, 85% da progênie mostrou-se resistente, indicando que a resistência a SCYLV é uma característica dominante.

Em relação a herdabilidade em sentido amplo da resistência ao vírus do amarelinho, Debibakas et al. (2014) encontraram que essa varia entre 0,7 e 0,84; a partir de dados obtidos de um painel de 189 acessos de 26 programas de melhoramento ao redor do mundo plantados em dois sucessivos ensaios, coletando dados de cana planta, primeira e segunda soqueira.

Islam et al. (2018) detectaram o QTL (*Quantitative Trait Loci*) identificado como *qSCYLVR79*, conferindo resistência ao SCYLV. Esse QTL foi responsável por 28% da variação fenotípica a partir de uma população F_1 , derivada do cruzamento entre CP95-1039 $\times$ CP88-1762, sendo que esse último cultivar é um híbrido complexo entre *Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. spontaneum* e *S. sinense*. A progênie contendo a combinação dos dois principais alelos apresentou 31% menos incidência do SCYLV que aquela progênie com uma combinação dos alelos principal e menor, sendo que nesta condição o *qSCYLVR79* não é efetivo na geração de resistência ao vírus do amarelinho.

2.4. Marcadores moleculares em cana de açúcar

Na atualidade, existe um grande número de marcadores moleculares aplicados para o estudo da diversidade de recursos genéticos, fornecendo informação para serem utilizados nos programas de conservação e melhoramento genético (Idrees e Irshad, 2014). É desejável que os marcadores sejam altamente polimórficos, de herança codominante, rápidos, fáceis de aplicar, baixo custo, alta reprodutibilidade e de distribuição e ocorrência muito frequentes ao longo do genoma dos indivíduos estudados (Kesawat e Das, 2009).

Segundo o fundamento da técnica utilizada, os marcadores moleculares se classificam em marcadores baseados em proteínas: Isoenzimas (Kephart, 1990). Baseados em enzimas de restrição para obter o polimorfismo: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Tanksley et al., 1989). Baseados na técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*): RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), VNTP (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Wolff et al., 1988); e marcadores microsatélite ou SSR (*Single Sequence Repeat*) (Edwards et al., 1992). Finalmente, marcadores que são uma combinação entre aqueles baseados em enzimas de restrição e PCR: AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995). Por outro lado, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) têm sido muito utilizados nas análises de diversidade genética pelo fato de serem muito abundantes em genomas de plantas e animais, emergindo como uma nova geração de marcadores moleculares para várias aplicações (Idrees e Irshad, 2014).

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microsatélites, são sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem. Os SSRs estão distribuídos ao longo do genoma dos eucariotos e podem ser analisados mediante a técnica da PCR (Smiullah et al., 2013). Uma das razões pelas quais os microsatélites são escolhidos para a genotipagem é o alto nível de variação alélica, seu caráter codominante, a sua alta reprodutibilidade e relativo baixo custo de implementação (De-Lucas et al., 2008).

Os marcadores SSR são considerados como codominantes pela capacidade de permitir distinguir entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos. No entanto, autores como Cordeiro et al. (2003) ressaltam que a Taq Polimerase adiciona um nucleotídeo de adenosina ao extremo 3' dos produtos amplificados gerando a incapacidade do marcador para distinguir entre homologia de fragmentos amplificados que apresentam o mesmo tamanho. Além disso, mutações na região de anelamento dos primers de microsatélites resultam na não amplificação do alelo de microsatélite (alelos nulos). Esses fatos também acontecem no genoma altamente poliplóide da cana, particularmente onde a dificuldade em distinguir alelos de cromossomos homólogos não permite determinar heterozigosidade ou homozigosidade em quaisquer loci.

O AFLP é uma técnica de sucesso aplicada para encontrar polimorfismo em genótipos de cana-de-açúcar, sendo considerados como marcadores muito informativos segundo os seus valores de poder de resolução *rp* (*resolving power values*) (Rodríguez et al., 2003). O AFLP frequentemente usa uma combinação de enzima de restrição EcoRI/MseI para digerir o DNA genômico. Uma pré-amplificação é feita com primers que apresentam em sua extremidade um nucleotídeo seletivo. Em seguida, uma amplificação seletiva é realizada com três nucleotídeos seletivos que são adicionados às extremidades cortadas pelas enzimas EcoRI e MseI, respectivamente (Vos et al., 1995).

Por causa da poliploidia da cana-de-açúcar, recentemente são utilizados com mais frequência os marcadores SNPs, caracterizados por mudanças de um único nucleotídeo no DNA, muito utilizados para identificar polimorfismos e mutações geradas por inserção ou deleção de uma base única. A vantagem em comparação com os outros marcadores é a possibilidade de gerar uma grande quantidade de polimorfismos e a probabilidade de detectar variações nos códons codificadores de aminoácidos, gerando perda de função de proteínas importantes na fisiologia do organismo (Cho et al., 1999).

Garcia et al. (2013) demonstraram pela primeira vez, a utilização de marcadores SNPs para realizar análises do genoma de cana-de-açúcar altamente poliploide permitindo um melhor entendimento da estrutura genômica autopoliploide. Yang et al. (2018) identificaram um total de 4,26 milhões de SNPs com alta resolução, gerando uma nova e importante base de dados para *Saccharum* spp. Esse conjunto de SNPs poderia ser a base para análise de seleção genômica em cana-de-açúcar, tais como estudos de associação genômica ampla (GWAS, *Genome Wide Association*) e mapeamento genético, entre outras aplicações.

2.5. Mapeamento associativo aplicado ao melhoramento genético de plantas

O mapeamento de associação, ou também chamado mapeamento de desequilíbrio de ligação, é uma ferramenta para encontrar sítios específicos do genoma relacionados com variações complexas de características fenotípicas de interesse (Peña Malavera et al., 2014). Pela dificuldade de gerar populações provenientes de cruzamentos controlados, a metodologia foi inicialmente utilizada

para encontrar segmentos do genoma envolvidos com a resistência às doenças em humanos. A técnica tem sido aplicada para estudos da variabilidade de características complexas, de interesse agrônomo, em espécies vegetais associadas com genes específicos que governam tais características (Jannink e Walsh, 2002).

Existem duas metodologias principais para estudar as características quantitativas: o mapeamento de ligação e o mapeamento associativo. O mapeamento de ligação explora a herança de polimorfismos funcionais ligados a marcadores adjacentes em pedigrees de estruturas conhecidas. As populações de estudo são geradas a partir de dois genótipos homozigóticos (Stich e Melchinger, 2010). Por outro lado, o mapeamento associativo é realizado mediante a exploração da herança de polimorfismos funcionais ligadas a marcadores adjacentes proveniente de populações de ancestrais desconhecidos. A vantagem deste método se baseia no fato de que a herança ligada pode se estender por muitas gerações, de tal maneira que somente persistem os polimorfismos estreitamente ligados (Stich e Melchinger, 2010).

Embora ambas as duas metodologias, mapeamento de ligação e mapeamento associativo sejam diferentes, elas guardam semelhanças pelo fato de que as duas estratégias exploram a habilidade de recombinação para quebrar o genoma em fragmentos que podem ser correlacionados com variação fenotípica. A denominação mapeamento de famílias é utilizada quando o mapeamento é conduzido em uma população obtida mediante cruzamento biparental e mapeamento de populações quando este é realizado em uma população na qual os parentescos são desconhecidos (Myles et al., 2009).

No mapeamento associativo podemos encontrar, dependendo do foco e dos objetivos da pesquisa, duas abordagens: (1) *mapeamento associativo para genes candidatos*, que relaciona o polimorfismo com genes selecionados que tem demonstrado um papel no controle da variação fenotípica em estudo e; o *mapeamento associativo amplo do genoma*, que consiste em registrar a variação genética no genoma completo na busca da associação dos QTLs com a variação fenotípica alvo (Zhu et al., 2008).

É importante salientar que nos trabalhos de mapeamento associativo deve se considerar os possíveis erros envolvidos na metodologia. Um deles é a sobrestimação da associação causada pela estrutura da população (Bennett et al., 2010). Tem sido detectado que em populações geneticamente estruturadas incrementa-se o número de falsos positivos na associação marcador – caráter. Para melhorar a acurácia, a análise multivariada de componentes principais é uma alternativa para reduzir esses erros, incorporada como covariável do modelo de mapeamento associativo (Peña Malavera et al., 2014).

A fim de encontrar genótipos de cana-de-açúcar resistentes às doenças, especialmente contra vírus, o mapeamento de associação surge como uma metodologia importante para atingir esse objetivo. Utilizando modelos lineares mistos, Debibakas et al. (2014) encontraram seis marcadores ligados a um ou vários parâmetros de resistência ao SCYLV, com taxas abaixo de 10%. Entre eles, dois marcadores DArT (*Diversity array technology*), B424681 e B424690 foram associados à incidência do amarelinho nas folhas. Trabalhos de associação feitos por Costet et al. (2012) revelaram que a resistência ao amarelinho é controlada por *Ry/1*, um QTA (*quantitative trait allele*) responsável por 32% da variação fenotípica, sendo o *Ry/1* o primeiro QTA descrito como principal alelo no controle do SCYLV em cana-de-açúcar.

Embora esses resultados sejam favoráveis, têm sido reportados pequenos números de associações importantes, sugerindo que são necessárias uma população muito grande ou uma genotipagem mais densa para incrementar o poder estatístico de detecção da associação. O mapeamento associativo necessita do uso de marcadores moleculares para gerar uma centena de bandas polimórficas que serão genotipadas e utilizadas para construir mapas de ligação mostrando possíveis bandas associadas a genótipos resistentes (Gouy et al., 2015). Yang et al. (2018b), utilizando uma ampla coleção de germoplasma, identificaram 91 marcadores de DNA e 82 genes candidatos significativamente associados à resistência a ferrugem alaranjada e ao vírus do amarelinho, gerando uma importante fonte genética na busca de genes e marcadores para resistência às doenças.

Souza et al. (2008), na busca de resistência ao SCMV em milho, identificaram três QTLs, sendo que dois deles (*Scm2a* e *Scm2b*) foram agrupados

no cromossoma 3, e o outro, Scm1, no cromossoma 6, explicando 13,34, 41,85 e 7,66% da variação fenotípica para resistência a SCMV, respectivamente. Os autores utilizaram *Multiple Interval Mapping* para a detecção de QTLs baseados em 19 marcadores SSR. Adicionalmente, Li et al. (2015), mediante estudos de GWAS, identificaram cinco genes fortemente associados com resistência ao SCMV em uma população de cultivares de milho. Um grupo de quatro genes foi detectado dentro ou próxima da região Scmv2, no cromossoma 3. O gene denominado *GRMZM2G116204*, que codifica para a proteína *Auxin binding protein* foi encontrado na região Scmv2.

3. Referências

Aitken K, McNeil M (2010) Diversity Analysis. In: Henry RJ, Kole Ch (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. Science Publishers p. 19-42.

Artschwager E, Brandes EW (1958) **Sugarcane** (*Saccharum officinarum* L.). **Agriculture Handbook**, 122. Washington: USDA, 307p.

Beauclair EGF de (2011) **Sustentabilidade da cana-de-açúcar, etanol e energia no Brasil**. Departamento de Produção Vegetal ESALQ / USP p. 1-66.

Bennett BJ, Farber CR, et al. (2010) A high-resolution association mapping panel for the dissection of complex traits in mice. **Genome Research** 20:281–290.

Berding N, Roach BT (1987) Germplasm collection, maintenance and use. In: DJ Heinz (Eds.) **Sugarcane Improvement Through Breeding**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands p. 143–210.

Brandes EW (1956) Origin, dispersal and use in breeding of the Melanesian garden sugarcane and their derivatives, *Saccharum officinarum* L. **Proc Int Soc Sugar Cane Technol** 9: 709–750.

Brown JS, Schnell RJ, Tai PYP, Miller JD (2002) Phenotypic evaluation of *Saccharum barberi*, *S. robustum*, and *S. sinense* germplasm from the Miami, FL, USA world collection. **Sugar Cane Int** 3–16.

Chatenet M, Delage C, Ripolles M, Irey M, Lockhart BEL, Rott P (2001) Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Dis** 85:1177-1180.

Chen J, Chen J, Adams MJ (2001) A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Archives of Virology** 146(4):757-66.

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.

Cho RJ, Mindrinos M, et al. (1999) Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics** 23(2):203-207.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO) (2018) Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018, segundo levantamento. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2018_1o_lev.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

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.

Cordeiro, GM, Pan Y-B, Henry, RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science** 165:181-189.

Costet L, Louis-Marie Raboin LM, Payet M, D'Hont A, Nibouche S (2012) A major quantitative trait allele for resistance to the *Sugarcane yellow leaf virus* (*Luteoviridae*). **Plant Breeding** 131 (5): 637 – 640.

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. **Proc S Afr Sug Technol Ass** 72: 81-84.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz, DJ (Eds.). Sugarcane improvement through breeding. **Elsevier**, Amsterdam, p.7-84.

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. **Theor Appl Genet** 127:1719–1732.

De-Lucas AI, Santana JC, Recio P, Hidalgo E (2008) SSR-based tool for identification and certification of commercial *Populus* clones in Spain. **Annals of Forest Science** 65(1): 107-107.

DEPEC – Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos (2017) Açúcar e Etanol. Disponível: www.economiaemdia.com.br. Acesso em: 19 out. 2018.

D' Hont A, Ison D, Alix K, Roux C, Glaszmann J-C (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome** 41(2): 221-225.

D'Hont A, Paulet F, Glaszmann J-C (2002) Oligoclonal interspecific origin of 'North Indian' and 'Chinese' sugarcane. **Chrom Res** 10: 253–262.

D'Hont A (2005) Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenet.Genome Res** 109: 27-33.

Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics** 12: 241-253.

FAOSTAT Rome: Food and Agriculture Organization of the United States, (2018) Área colhida, produção mundial e produção nos principais países produtores de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 18 out. 2018.

Fitch MMM, Lehrer AT, Komor E, Moore PH (2001) Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. **Plant Pathology** 50: 676 - 680.

Garcés F, Fiallos F, Mendoza J, Silva E, Castillo R, Valdez M, Viteri I (2013) Manejo preventivo del raquitismo de la soca (*Leifsonia xyli subsp xyli*), escaldadura de la hoja (*Xanthomonas albilineans*) y la hoja amarilla (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en Ecuador. In: **III Congreso AETA**, Sep.18-20. Guayaquil-Ecuador.

Garcia AAF, Mollinari M, Marconi TG, et al. (2013) SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Scientific Reports** 3(3399): 1-10.

Glaszmann J-C, Jannoo N, Grivet L, D'Hont A (2003) Sugarcane. In: Hamon H, Sejuin M, Perrier X, Glaszmann JC (Eds.) **Genetic Diversity of Tropical Plants**. CIRAD, Montpellier, France and Science Publi, Enfield, NH, USA, p 337.

Gonçalves MC, Manzano Galdeano D, De Godoy Maia I, Chagas CM (2011) Variabilidade genética de *Sugarcane mosaic virus*, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 46 (4): 362-369.

Gonçalves MC, Santos AS, Maia IG, Chagas CM, Harakava R (2007) Caracterização de um isolado do Sugarcane mosaic virus que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira** 32:032-039.

Gonçalves MC, Pinto LR, Souza SC, Landell MG (2012) Virus diseases in sugar cane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology** 6(2): 108-116.

Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M (2015) Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. **Genetics Research International** 2015: 1-14.

Gouy M, Rousselle Y, Thong Chane A, Anglade A, Royaert S, Nibouche S, Costet L (2015) Genome wide association mapping of agro-morphological and disease resistance traits in sugarcane. **Euphytica** 202: 269–284.

Grisham MP, Burner DM, Legendre BL (1992) Resistance to the H strain of Sugarcane *mosaic virus* among wild forms of sugarcane and relatives. **Plant Disease** 76: 360–362.

Grisham MP, Pan YB (2007) A genetic shift in the virus strains that cause mosaic in Louisiana sugarcane. **Plant Disease** 91:453-458.

Idrees M, Irshad M (2014) Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review. II.

Irvine JE (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor Appl Genet** 98: 186–194.

Islam MS, Yang X, Sood S, Comstock JC, Wang J (2018) Molecular characterization of genetic basis of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) resistance in *Saccharum* spp. hybrid. **Plant Breed** 137: 598 - 604.

Jannink J-L, Walsh B (2002) Association Mapping in Plant Populations. In: Kang, MS (Eds.). **Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding**. CABI Publishing p. 59-68.

Jeswiet J (1925) Beschrijving der soorten van het swikerriet. Elf de bijdrage. Bijdrage tot de systematick van het geslacht *Saccharum*. Meded Proefst. Java - Suikerind: p.391-404.

Kephart SR (1990) Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany** 77(55): 693 - 712.

Kesawat MS, Das BK (2009) Review Article. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. **J. Crop Sci. Biotech** 12(4): 168 - 178.

Koike H, Gillaspie AG Jr (1989) Mosaic. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr, Hughes CG (Eds.) **Diseases of Sugarcane**. Elsevier, Amsterdam p. 301-322.

Kohlhepp G (2010) Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados** 24(68): 223-253

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.

Landell MGA, Silva MA (2004) As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão Agrícola** 1: 18-23

Landell MGA, Bressiani A (2010) Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (Eds.). **Sugarcane**. Campinas: Agronomic Institute p. 101-155.

Lapierre H, Signoret PA editors (2001) Víruses and Virus disease of *Poaceae* (*Gramineae*). **Institut National de la Recherche Agronomique** p. 697 – 722.

Li, Wen-Feng & Xiao-Yan, Wang & Huang, Ying-Kun & Shan, Hong-Li & Luo, Zhi-Ming & Ying, Xiong-Mei & Zhang, Rong-Yue & Shen, Ke & Yin, Jiong (2013) Screening sugarcane germplasm resistant to Sorghum mosaic virus. **Crop Protection** 43: 27 - 30.

Li Z, Chen J, Han L, Wen J, Chen G, Li H, Wang Y, Zhao R, Zhang X, Xia Z, Yan J, Wu J, Ding J (2015) Association mapping resolving the major loci Scmv2 conferring resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. **Eur J Plant Pathol** 145: 385 - 391.

Lucchesi AA (2001) Sugarcane (In Brazilian). In: Castro, P. R. C.; Kluge, R. A. (Eds.). **Ecophysiology of extractive crops: sugarcane, rubber, coconut, oil palm and olive**. Piracicaba: Cosmópolis Stoller do Brasil, v. 1. p. 13-45.

Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF (2009) The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. **Nat Rev Genet** 10 (8): 565 - 577.

Maia IG, Gonçalves MC, Arruda P, Vega J (2000) Molecular evidence that *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. **Archives of Virology** 145: 1009 - 1019.

Medeiros CNF, Gonçalves MC, Harakava R, Creste S, Nóbile PM, Pinto LR, Perecin D, Landell MGA (2014) Sugarcane Transcript Profiling Assessed by cDNA-AFLP Analysis during the Interaction with *Sugarcane mosaic virus*. **Advances in Microbiology** 4: 511 - 520.

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 (1): 156-171.

Morais LK, Aguiar MS, Silva PA, Câmara TMM, Cursi DE, Fernandes Junior AR, Chapola RG, Carneiro MS, Bespalhok Filho JC (2015) Breeding of Sugarcane, In: Cruz, V. M. V.; Dierig, D. A. (Eds.). **Industrial Crops: breeding for bioenergy and bioproducts**. New York, USA: Springer p. 444.

Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE, Buckler ES (2009) Association Mapping: Critical Considerations Shift from Genotyping to Experimental Design. **The Plant Cell** 21: 2194 - 2202.

Mukherjee SK (1957). Origin and distribution of *Saccharum*. **Botanical Gazette** 199(1):55–61

Nayak SN, Song J, et al. (2014) Promoting utilization of *Saccharum* spp. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. **PLoS ONE** 9 (10): 1-12.

Paterson AH, Moore PH, Tew TL (2013) The Gene Pool of *Saccharum* Species and Their Improvement. In: Paterson A. (Eds.) **Genomics of the Saccharinae. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models**, vol 11. Springer, New York, NY p. 43-71.

Peña Malavera A, Gutierrez L, Balzarini M (2014) Principal components in associative mapping. **Journal of Basic & Applied Genetics** 25(2): 32 - 40.

Perera MF, Filippone, MP, Ramallo CJ, Cuenya MI, García ML, Ploper LD, Castagnaro, AP (2009) Genetic Diversity Among Viruses Associated with Sugarcane Mosaic Disease in Tucumán, Argentina. **Phytopathology** 99(1): 38 - 49.

Perera MF, Filippone, MP, Noguera AS, Cuenya MI, Castagnaro AP (2012) An overview of the sugarcane Mosaic disease in South America. **Functional Plant Science and Biotechnology** 6(2): 98-107.

Roach BT (1989) Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Proc Aust Soc Sugar Cane Technol** 12: 34 - 47.

Rodríguez M, Hernández I, Coto O, Canales E, Cornide MT (2003) RFLP and AFLP polymorphism analysis in sugarcane varieties. *Revista CENIC* **Ciencias Biológicas** 34(3): 121 - 128.

Rott Ph, Bayley RA, Comstock JJ, Croft BJ, Saumtally, AS. Editors. (2000) A guide to sugarcane disease. CIRAD and ISSCT 340 p.

Rott P, Comstock JC, Gilbert RA e Sandhu HS (2002) Sugarcane Mosaic. **Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension**. SS-AGR-209, p. 1-3.

Ramouthar PV, Berry SD, Rutherford RS e McFarlane SA (2013) Yield loss due to *Sugarcane yellow leaf virus* and its prevalence in the South African sugar industry. **Proc S Afr Sug Technol Ass** 86: 244 - 254.

Scagliusi SM e Lockhart BEL (2000) Transmission, Characterization, and Serology of a *Luteovirus* Associated with Yellow Leaf Syndrome of Sugarcane. **Phytopathology** 90(2): 120-124.

Scagliusi SMM (2003) Vírus do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar: caracterização e estudo comparativo entre variedades com diferentes respostas à infecção viral. 106 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas.

Schenk S (1990) Yellow leaf syndrome. A new sugarcane disease. In: Hawaiian Sugar Planters. Association Annual Report. p 38.

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

Sheji M, Nair NV, Chaturvedi PK, Selvi A (2006) Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions in India, using molecular markers. **Genet Resour Crop Evol** 53: 1221 - 1231.

Shukla DD, Frenkel MJ, McKern NM, Ward CW, Jilka J, Tosic M, Ford RE (1992) Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. **Archives of Virology Supplementum** 5: 363 - 73.

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

Silva MF, Gonçalves MC, Melloni MNG, Perecin D, Landell MGA, Xavier MA, Pinto LR (2015b) Screening Sugarcane Wild Accessions for Resistance to *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). **Sugar Tech** 17(3): 252 - 257.

Smith HG, Barker H (1999) The luteoviridae. 1rd Edition, CAB International Publishing, New York. p. 88-111.

Smiullah, Farooq Ahmed Khan, Aqeel Afzal, Abdullah, Ambreen Ijaz, Usman Ijaz (2013) Diversity analysis of sugarcane genotypes by microsatellite (SSR) markers. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research** 4(7): 105-110.

Sordi R (1996) Relatório annual Corpersucar.

Souza IRP de, Schuelter A R, Guimarães CT, Schuster I, Oliveira E de, Redinbaugh M (2008) Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas** 145: 167-173.

Stich B, Melchinger AE (2010) An introduction to association mapping in plants. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources** 5 (039). Disponível em: <http://www.cabi.org/cabreviews>. Acesso em: 25 jan. 2019.

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH & Bonierbale MW (1989) RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. **Bio/Technology** 7: 257 - 264.

Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EU (1997) Sugarcane Yellow Leaf Disease in Brazil: Evidence of Association with a luteovirus. **Plant Disease** 81:21-26.

Victoria JI, Avellaneda MC, Ángel JC e Guzmán ML (2005) Resistance to *Sugarcane yellow leaf virus* in Colombia. *Proc. ISSCT*, Vol 25 p. 664-669.

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.

Vos P, Hogers R, et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res** 23(21): 4407- 4414.

Wolff RK, Nakamura Y, White R (1988) Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence. **Genomics** 3(4): 347 - 51.

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** 153: 1031 - 1039.

Yang X, Song J, Todd J, Peng Z, Paudel D, Luo Z, Ma X, You Q, Hanson E, Zhao Z, Zhao Y, Zhang J, Ming R, Wang J (2018) Target enrichment sequencing of 307 germplasm accessions identified ancestry of ancient and modern hybrids and signatures of adaptation and selection in sugarcane (*Saccharum* spp.), a 'sweet' crop with 'bitter' genomes. **Plant Biotechnol J** p. 1–11.

Yang X, Sood S, Luo Z, Todd J, Wang J (2018b) Genome-wide association studies identified resistance loci to orange rust and yellow leaf virus diseases in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Phytopathology** 109(4): 623-631.

Zhu Ch, Gore M, Buckler ES, Yu J. (2008) Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome** 1: 5 - 20.

CAPÍTULO 2 - Avaliação de genótipos do género *Saccharum* spp. para resistência ao vírus do amarelinho da cana-de-açúcar (SCYLV) combinando métodos quantitativos de concentração viral e mensuração visual da doença

Resumo - Um total de 98 genótipos compostos de cultivares, clones elites, e acessos de germoplasma básico (*Saccharum robustum*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*), foram avaliados em viveiro e em ensaio em delineamento em blocos completos ao acaso (DBCA) para resistência ao *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV). A severidade da doença foi avaliada em campo usando uma escala diagramática de notas. A quantificação do vírus nas plantas no viveiro de campo foi confirmada mediante teste *Double Antibody Sandwich* -ELISA, e no ensaio a campo em DBCA mediante a técnica RT-qPCR (*Reverse Transcription* - *Quantitative PCR*). A aplicação dessas metodologias junto com a avaliação da severidade mediante notas da escala permitiu classificar os genótipos em resistentes, suscetíveis e intermediários para o vírus SCYLV. A quantificação absoluta com a curva padrão (DAS-ELISA) e quantificação relativa (QR) utilizando a equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ na RT-qPCR foram ferramentas sensíveis para detectar diferenças na concentração do vírus entre os genótipos avaliados. As variáveis genéticas foram estimadas a partir das análises de variância, encontrando uma herdabilidade ao nível de parcela de 52,62%. Em condições de viveiro, um total de 52 genótipos (53,06%) foi registrado como resistente, enquanto no ensaio a campo em DBCA, foram categorizados 42 (42,86%) genótipos dentro desta categoria. Os genótipos CANA ALHO, CTC15, IACBIO232, IACBIO241, IACBIO257, IACBIO266, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277, IACBIO279, IACCTC05-9578, IACSP01-2410, IACSP01-5519, IACSP01-8034, IACSP02-2067, IACSP04-2504, IACSP04-6007, IACSP95-3018, IACSP96-3076, IACSP97-6628, IACSP99-3357, IACSP96-2008, IJ76-293, IN84-88, KRAKATAU, RB93-5744 e IACCTC05-9552 foram classificados como resistentes, tanto em viveiro como no ensaio em DBCA, não apresentando sintomas da doença. Por outro lado, os genótipos mais suscetíveis foram: IACSP01-8082, IACCTC05-6518, IACSP01-8046, IACCTC06-9767, IACSP02-3025 e SP71-6163. A principal fonte de resistência à doença provavelmente pode ser atribuída à espécie *Saccharum spontaneum*, presente nos genitores da maioria dos genótipos classificados como resistentes.

Palavras chave: *Sugarcane yellow leaf virus*, DAS-ELISA, RT-qPCR.

1. Introdução

O amarelinho da cana-de-açúcar, conhecido inicialmente como síndrome do amarelecimento foliar da cana-de-açúcar ou YLS (*Yellow leaf syndrome*) por suas siglas em inglês, foi reportado pela primeira vez no Havaí em 1989 (Schenk, 1990; 2001), posteriormente na Austrália em 1989 (Borth et al., 1994), nos Estados Unidos da América, no Estado da Florida, em 1990 (Comstock et al., 1994), no Brasil em 1990 (Vega et al., 1997) e na África do Sul em 1994 (Bailey et al., 1996; Rutherford et al., 2004). O termo YLS, também foi utilizado para se referir a uma doença causada por um fitoplasma que gerava sintomas similares (Moonan et al., 2000). O amarelinho é uma doença de origem viral causada pelo *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) que pertence ao gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae* (Maia et al., 2000, Moonan et al., 2000), transmitido de forma semi-persistente pelos afídeos *Sipha flava*, *Melanaphis sacchari*, *Rophalosiphum maidis*, *Rophalosiphum rufoabdominalis* (Schenck e Lehrer, 2000). No entanto, *M. sacchari* é considerado o principal vetor da doença (Scagliusi e Lockhart, 2000; Chinnaraja e Viswanathan, 2015). Scagliusi e Lockhart (2000) determinaram que o *virion* do SCYLV possui diâmetro de 24 a 29 nm de diâmetro e contém RNA genômico de fita simples de 5.8 Kb. A capa proteica do vírus é não glicosilada e possui uma massa molecular estimada em 27 kDa.

Os sintomas típicos causados pelo vírus são o amarelecimento foliar, começando na nervura central abaxial, sendo que em estágios avançados o sintoma se espalha pelo limbo foliar (Schenk et al., 1997), podendo também apresentar coloração avermelhada na parte dorsal da nervura central (Cronje et al., 1998). Os sintomas também podem incluir encurtamento dos internódios terminais (Vega et al., 1997; Comstock et al., 1998) e acumulação de sacarose nas nervuras (Gonçalves et al., 2005). Na maioria dos cultivares e genótipos avaliados, nos primeiros meses de desenvolvimento das plantas, os sintomas não se apresentam de forma acentuada e a concentração do vírus é significativamente alta nas folhas jovens quando comparadas com folhas velhas. Comparativamente, a maior concentração do vírus da-se na nervura central que no limbo das folhas (Scagliusi et al., 2009).

Tem sido demonstrado que o SCYLV foi o causador de grandes perdas de produtividade em cultivares suscetíveis, alcançando até 54 a 60% (Ramouthar et al.,

2013) na maioria dos principais países produtores de cana-de-açúcar (Rassaby et al., 2004). Embora uma das alternativas para obter plantas livres do vírus seja a produção de plântulas a partir de meristemas, existe um alto risco de reinfeção quando as plantas são introduzidas no campo. Fitch et al. (2001) relataram que plantas livres de vírus permaneciam sadias até quatro anos, desde que fossem plantadas em campos isolados ou em casa de vegetação. No Havaí, 80% das plantas foram reinfetadas após quatro meses do plantio (Lehrer et al., 2007).

No Brasil, a doença foi inicialmente observada entre 1990 a 1991, e espalhou-se por todo o estado de São Paulo, adquirindo caráter epidemiológico a partir de 1992 (Vega et al., 1997), infectando cultivares altamente produtivas, como a SP71-6163, que deixou de ser plantada nos canaviais devido a perdas de produtividade de até 50% geradas pela doença (Vega et al., 1997). No entanto, a incidência de SCYLV no Brasil está subestimada, precisando de mais estudos para determinar o verdadeiro impacto do vírus nos canaviais brasileiros (Gonçalves et al., 2012).

Os primeiros híbridos de cana-de-açúcar foram desenvolvidos a partir de cruzamentos interespecíficos entre acessos das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* seguidos de retrocruzamentos contínuos com acessos de *S. officinarum*, espécie considerada nobre pela riqueza em sacarose. Este processo teve como objetivo restaurar os teores de açúcares de *S. officinarum* e manter características como alto perfilhamento, resistência aos estresses bióticos e abióticos de *S. spontaneum* (Daniels e Roach, 1987; Irvine, 1999; Landell et al., 2007).

Segundo relatos de Komor (2011), *S. robustum* é fonte de resistência ao SCYLV, visto que, em cruzamentos entre clones resistentes de *S. robustum* e acessos suscetíveis de *S. officinarum*, 85% da progênie mostrou-se resistente, assegurando também que a resistência a SCYLV é uma característica dominante.

Na obtenção dos primeiros híbridos de cana-de-açúcar participaram uma quantidade limitada de clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, causando uma base genética estreita nos cultivares comerciais que são cultivados na atualidade (Aitken e McNeil, 2010). Considerando que a principal forma de controle do SCYLV baseia-se no uso de cultivares resistentes, existe a necessidade de levantar um registro dos genótipos e espécies selvagens disponíveis que apresentem resistência

às doenças, particularmente ao vírus do amarelinho. Esses genótipos avaliados poderão ser utilizados nos programas de melhoramento com o objetivo de introduzir os fatores de resistência nas novas cultivares comerciais de cana-de-açúcar.

O amarelinho é uma doença de difícil fenotipagem devido ao fato que na maioria das cultivares e genótipos avaliados e nos primeiros estádios fenológicos das plantas, os sintomas não se manifestam de forma clara (Cronje et al., 1998). Por causa disso, os testes serológicos e moleculares têm sido ferramentas de apoio para determinar a incidência e severidade do vírus. As técnicas de diagnóstico mais utilizadas para detectar e quantificar o SCYLV, são o TBIA (*Tissue blot immunoassay*) (Schenck et al., 1997; Fitch et al., 2001; Lehrer e Komor, 2008) e DAS-ELISA (*Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*) (Scagliusi e Lockhart, 2000; Chatenet et al., 2001).

Além das técnicas serológicas, têm sido utilizadas ferramentas de diagnóstico molecular, conhecidas por serem muito mais sensíveis quando comparadas com as técnicas serológicas (Gonçalves et al., 2002; Korimbocus et al., 2002). As técnicas de diagnóstico molecular mais utilizadas para o vírus do amarelinho são a RT-PCR (*Reverse transcriptase-PCR*) (Comstock et al., 1998) e quantificação do produto amplificado mediante RTq-PCR (*Reverse transcriptase quantitative-PCR*) (Gonçalves et al., 2002; Korimbocus et al., 2002; Chinnaraja e Viswanathan, 2015). Gonçalves et al. (2002) e Scagliusi et al. (2009), detectaram a presença do vírus mediante RTq-PCR e RT-PCR em algumas amostras que se mostraram negativas por DAS-ELISA.

Mais recentemente, Chinnaraja et al. (2014) utilizaram com sucesso a RT-qPCR para quantificação da concentração do SCYLV, utilizando tanto a metodologia de quantificação absoluta, como a quantificação relativa (QR). A primeira delas utiliza uma curva padrão de concentrações conhecidas de um fragmento de DNA (sequência parcial ou total) codificante da capa proteica do vírus que será amplificado pela qPCR. O fragmento é clonado em um vetor apropriado e diluições seriadas são preparadas para elaboração da curva a partir da qual são estimadas a equação de regressão linear e o coeficiente de determinação baseado nos valores de *Ct* (*Cycle threshold*) para cada dado de concentração do vírus. Os autores também empregaram a metodologia QR mediante a aplicação da formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ na

RT-qPCR, que visa obter valores relativos (número de vezes) de expressão quando comparados com um controle negativo e um normalizador apropriado.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta quanto à resistência ao amarelinho de um grupo de 98 genótipos do gênero *Saccharum* com base na escala de notas de sintomas da doença e quantificação do vírus via DAS-ELISA e RT-qPCR. A utilização das técnicas de diagnóstico e a quantificação da concentração viral associada aos sintomas da doença na identificação de potenciais fontes de resistência ao SCYLV é discutida.

2. Metodologia

2.1. Coleção de genótipos do género *Saccharum* spp.

Utilizou-se um grupo de 98 genótipos do género *Saccharum* composto por acessos de germoplasma básico (*Saccharum robustum*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*), clones do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônômico, além de cultivares comerciais procedentes dos Programas de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira, Rede Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético e Corpesucar.

O mesmo painel de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. foi utilizado por Coutinho (2017) para avaliar características tecnológicas (pol% e fibra%), características importantes para o desenvolvimento de cultivares tradicionais de cana-de-açúcar ricas em sacarose e cultivares de cana-energia, respectivamente. Em relação à fibra, cultivares ricas em este elemento são consideradas resistentes ao tombamento e incidência de pragas (Fernandes, 2011), importante para os objetivos do presente estudo. Adicionalmente, o painel de genótipos apresenta uma ampla variabilidade genética, sendo que além dos genótipos provenientes dos programas de melhoramento já citados, possui materiais provenientes de Nova Guiné, Indonésia e genótipos selvagens. Uma parte importante dos genótipos em estudo, tem como genitores, acessos de *S. spontaneum*, conhecido por oferecer resistência a estresses bióticos e abióticos.

2.2. Ensaios de campo

2.2.1. Estabelecimento de viveiro em condições de campo

Anteriormente à instalação do ensaio de campo, em março de 2016, um viveiro de multiplicação foi instalado em área do Centro de Cana do Instituto Agrônômico (IAC), em Ribeirão Preto, São Paulo. Cada genótipo foi plantado em uma unidade experimental (UE) de 1,0 m de comprimento e 1,0 m entre cada UE, colocando apenas duas mudas pre-brotadas (MPB) por UE. A distância entre linhas foi de 1,5 m (Figura 1). A cada nove genótipos, foi plantada uma parcela da cultivar

Tabela 1. Lista de genótipos, origem e genitores utilizados para o estudo da resposta à infecção pelo SCYLV, plantados no viveiro de campo e em ensaio em DBCA.

Id	Genótipo	A/B/C*	Genitor feminino	Genitor Masculino
1	US57-1415	C	<i>S. spontaneum</i>	-
2	CANA ALHO	A	<i>S. officinarum</i>	-
3	IACSP01-2410	A	R570	IAC87-3396
4	IACSP04-6007	A	PO88-62	CTC-9
5	IACSP04-6059	A	IACSP95-3018	SP96-3092
7	IACSP95-3028	B	IACSP95-3028	RB85-5156
8	NG57-12	A	<i>S. robustum</i>	-
9	IACSP042516	A	IAC91-2288	SP80-185
10	KRAKATAU	C	<i>S. spontaneum</i>	-
11	IN84-82	A	<i>S. spontaneum</i>	-
12	IACSP04-2508	A	SP91-3059	IACSP97-2077
13	IACSP95-5037	A	SP84-2066	IAC87-3396
14	IACCTC05-9630	A	IACSP97-2053	RB85-453
15	IACSP04-6053	A	IACSP95-6114	IACSP93-3046
16	IACSP99-3009	A	CP70-1133	SP83-2847
17	IS76-155	A	<i>S. officinarum</i>	-
18	IACSP01-2421	A	RB83-5486	SP77-5158
19	IACSP04-2521	A	IAC91-2288	SP96-3092
20	IACSP04-6058	A	IACSP95-3018	SP96-3092
21	IACSP99-1020	A	SP85-1682	SP80-185
22	IACSP04-5065	A	IACSP95-6114	IACSP95-3050
23	IACCTC06-9767	A	IACSP96-3069	IACSP95-2078
24	IACSP98-5046	A	SP81-3251	SP82-3697
25	IACSP01-8034	A	IAC91-3093	SP87-432
26	IACSP99-3357	A	SP92-1584	?
27	IACCTC05-9578	A	WHITETRANS	SP80-3280
28	IACCTC05-5580	A	CTC-4	IACSP93-3046
29	IACSP97-6628	A	RB83-5486	SELF
30	IACSP97-6680	A	SP84-2066	SP84-7017
31	IACCTC05-9534	A	IACSP95-3028	CT96-1414
32	IACSP97-2084	A	RB85-5035	SP80-185
33	CTC15	B	SP84-2025	?
34	IAC91-4168	A	SP81-3137	?
35	IACBIO232	A	RB85-5465	GLAGAH
36	IACBIO241	A	RB85-5465	GLAGAH
37	IACBIO257	A	NG26-011	?
38	IACBIO266	A	NG26-011	?
39	IACBIO270	A	SES-069	?
40	IACBIO271	A	SES-069	?
41	IACBIO273	A	SES-069	?
42	IACBIO275	A	SES-069	?
43	IACBIO277	A	SES-069	?
44	IACBIO-279	A	SES-069	?

45	IACCTC05-3616	A	IAC91-5155	CT96-1414
46	IACCTC05-6518	A	SP91-1049	CT93-1231
47	IACCTC05-9552	A	IACSP95-5011	CT96-1414
48	IACCTC05-9607	A	IACSP97-2053	SP88-721
49	IACCTC05-9634	A	IACSP97-2053	RB85-5453
50	IACCTC06-1050	A	CT94-3165	IAC91-1099
51	IACCTC06-9708	A	IACSP96-2042	CT01-4455
52	IACCTC06-9713	A	IACSP95-5000	CT96-1307
53	IACCTC06-9741	A	IACSP95-5000	RB72-454
54	IACSP01-2417	A	RB83-5486	SP77-5181
55	IACSP01-2430	A	IAC91-2195	SELF
56	IACSP01-5501	A	SP91-3059	CTC-957
57	IACSP01-5519	A	RB83-5486	SP77-5181
58	IACSP01-8046	A	R-570	IAC87-3396
59	IACSP01-8082	A	IAC91-3093	SP87-365
60	IACSP01-8158	A	RB83-5486	SP77-5181
61	IACSP02-2067	A	SP97-3060	SP70-1143
62	IACSP02-2125	A	SP90-1161	SP90-1644
63	IACSP02-3025	A	SP92-4230	SP88-813
64	IACSP02-3168	A	IAC91-4216	SP80-3280
65	IACSP04-2503	A	PO88-62	CTC-9
66	IACSP04-2504	A	IACSP95-5037	?
67	IACSP04-2509	A	SP91-3059	IACSP97-3391
68	IACSP04-2510	A	IAC91-3093	CTC-9638
69	IACSP04-3123	A	IACSP95-3028	SP83-2847
70	IACSP04-3148	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
71	IACSP04-3150	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
72	IACSP04-3259	A	IACSP96-6026	RB85-5453
73	IACSP04-5081	A	IACSP96-6026	RB85-5453
74	IACSP04-6032	A	IACSP95-3028	SP77-5181
75	IACSP04-6035	A	SP91-3059	IACSP96-6026
76	IACSP04-6073	A	IACSP95-3028	SP92-4221
77	IACSP04-6077	A	IACSP97-2109	IACSP95-6114
78	IACSP04-6152	A	IAC91-1099	SP93-1124
79	IACSP93-3046	B	SP79-1011	?
80	IACSP95-3018	A	SP84-2189	SP80-1842
81	IACSP95-6114	A	IAC87-3187	CTC-9019
82	IACSP96-2008	A	SP80-144	?
83	IACSP96-3056	A	SP82-6108	?
84	IACSP96-3069	A	SP80-3280	?
85	IACSP96-3076	A	SP84-7017	?
86	IACSP97-3384	A	RB85-5113	RB85-5453
87	IACSP97-4039	A	RB83-5486	RB85-5453
88	IACSP97-4048	A	SP84-2066	IAC86-3154
89	IACSP98-2053	A	SP84-7017	SP80-1842
90	IACSP98-3011	A	IAC91-3093	SP82-3530
91	IACSP99-3369	A	SP90-1616	?

92	IACSP99-4011	A	SP84-2025	RB85-5113
93	IJ76-293	A	<i>S. robustum</i>	-
94	IN84-58	A	<i>S. spontaneum</i>	-
95	IN84-88	A	<i>S. spontaneum</i>	-
96	NG57-213	A	?	?
98	RB93-5744	B	RB83-5089	RB76-5418
100	SP83-2847	B	HJ57-41	SP70-1143
101	SP71-6163	B		

?=Policruzamento. *A= clone IAC; B= Cultivar comercial, C=especie

Afídeos vetores da espécie *Melanaphis sacchari* Zenth, foram liberados no viveiro para permitir a inoculação e dispersão uniforme do vírus. Os afídeos foram previamente criados em condições de laboratório em folhas da cultivar SP71-6163 infectadas com o SCYLV. As liberações foram feitas com uma frequência semanal durante quatro semanas a partir do mês de junho/2016 (três meses após plantio) mediante o grampeamento de pedazos folhas colonizadas com o inseto, na parte abaxial das folhas das torceiras de cada genótipo (Figuras 2.a, 2.b e 2.c).

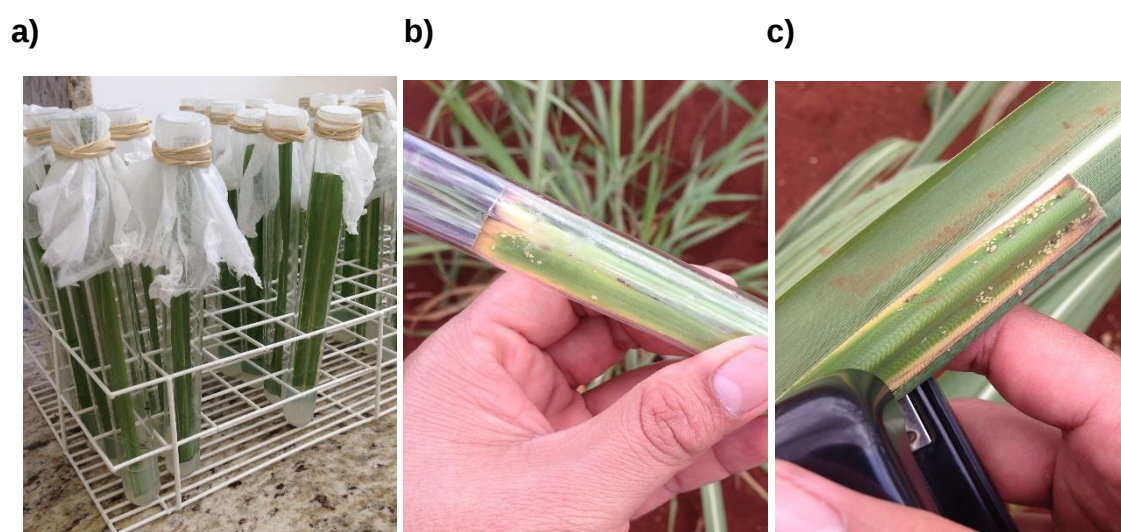


Figura 2. Propagação e liberação de colônias de afídeos virulíferos de *M. sacchari* no viveiro e no ensaio em DBCA. **a)** Cria dos insetos em condições de laboratório. **b)** Colônias de afídeos prontas para ser liberados a campo. **c)** Aplicação das colônias de afídeos nas folhas das torceiras nas unidades experimentais.

2.2.2. Estabelecimento de ensaio a campo com delineamento experimental de blocos completos ao acaso (DBCA)

A partir do viveiro de multiplicação foram produzidas mudas pré-brotadas (MPB) dos 98 genótipos para instalação do experimento a campo, adotando-se delineamento experimental em blocos ao acaso com três repetições e unidades experimentais constituídas por três linhas de 1,0 m, espaçadas 1,5 m. Cada linha da parcela recebeu duas MPBs, espaçadas 0,5 m. O espaçamento entre parcelas foi de 2,0 m (Figura 3). A cultivar SP71-6163 foi utilizada como bordadura. O ensaio foi instalado em maio de 2017, localizado nas coordenadas geográficas 47°52' 34,33" W, 21° 12'50,69" S e altitude 626 m. Da mesma forma que no viveiro, afídeos vetores de *M. sacchari* foram liberados no ensaio de campo a partir do sexto mês após plantio com uma frequência semanal, durante os seguintes cinco meses.

O ensaio foi estabelecido num solo contendo um pH de 4,8, matéria orgânica de 33 g.dm⁻³ e 96,16 mmol.dm⁻³ de CTC (capacidade de troca de cátions), medidos nos primeiros 20 cm de profundidade. O fertilizante 20-5-20 foi utilizado para adubo de cobertura e 8-28-16, para o adubo de plantio (*Garcia, 2019).

*Garcia JC (2019) (Instituto Agronômico de Campinas – Centro de Cana). Comunicação Pessoal.

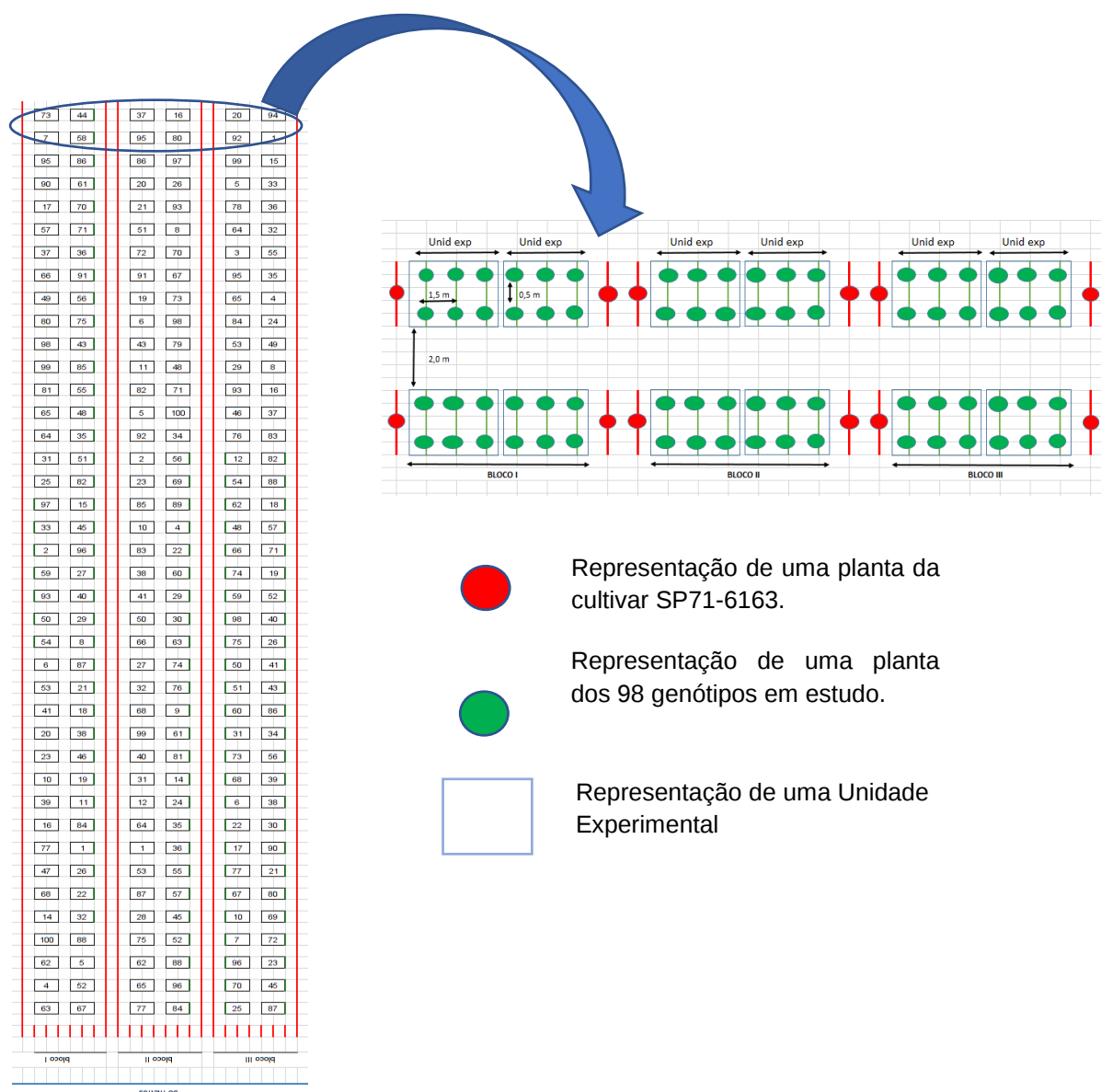


Figura 3. Croqui do ensaio a campo em DBCA, contendo os 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp., avaliados para resistência ao SCYLV.

2.3. Avaliação de sintomas do SCYLV no viveiro e no ensaio em DBCA

A severidade do vírus de amarelinho foi avaliada tanto no viveiro como em condições do ensaio no campo, utilizando uma escala diagramática de notas compreendida por 4 níveis (1 - 4) (Figura 4) e elaborada a partir de folhas coletadas no viveiro, cobrindo toda a faixa de sintomas expressos nos 98 genótipos baixo estudo, desde folhas sadias sem sintomas até folhas fortemente amareladas.



Figura 4. Escala diagramática de notas para avaliação de SCYLV. (1) folha verde sem sintomas; (2) amarelecimento acentuado da nervura central, com limbo foliar levemente amarelo; (3) amarelecimento intenso da nervura central e amarelecimento parcial do limbo foliar; (4) amarelecimento intenso da nervura central e do limbo foliar.

As folhas avaliadas foram as denominadas TVD0 (*Top Visible Dewlap 0*), TVD1, TVD2 e TVD3, sendo que TVD1, refere-se à primeira folha com o "dewlap" visível. No viveiro, foi feita apenas uma leitura aos 13 meses após o plantio com três avaliadores diferentes. As leituras no ensaio a campo foram feitas mensalmente, a partir dos sete meses após plantio, com início em dezembro de 2017 e finalizando em junho de 2017, totalizando sete avaliações. Da mesma forma que no viveiro, em cada avaliação participaram três avaliadores diferentes, com o intuito de reduzir o erro experimental.

2.4. Detecção do SCYLV mediante o teste DAS – ELISA no viveiro

Para confirmar a presença do SCYLV nas plantas do viveiro, o teste DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich - ELISA*) foi conduzido utilizando anticorpo específico para o SCYLV, conforme descrito por Clarck e Adams (1977), com modificações. A folha TVD0 foi considerada para a quantificação do vírus por quanto é estabelecido que nas folhas jovens a concentração viral é maior que aquelas com maior idade fenológica (Scagliusi et al., 2009).

As amostras de tecido foliar de 12 meses de idade, contendo a lâmina e nervuras centrais do tercio superior foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram adicionados 1500 µL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*) 10 mM, pH 7,4, sendo as amostras armazenadas a -70°C. Como controles positivos foram utilizados a cultivar SP71-6163 e o vírus purificado à concentração de 62 ng/100µL. Como controle negativo, foi utilizada a cultivar IACSP95-5000 obtida via cultura de micromeristemas e indexada negativa para a presença do SCYLV via diagnóstico molecular por RT-qPCR.

A leitura do DAS-ELISA foi realizada em um espectrofotômetro iMark™ *Microplate Absorbance Reader* da Bio-Rad a uma absorbância de 405 nm. Para a estimativa da concentração de proteínas virais foi elaborada uma curva padrão, mediante uma diluição seriada a partir de uma alíquota do vírus purificado a 62,0 ng/µL, seguida pelas concentrações de 31,0; 15,5; 7,75; 3,9; 1,95; 0,98 e 0,49ng/100µL. Para cada uma das diluições correspondeu um valor médio de densidade ótica OD (*optical density*), composto por três réplicas de cada concentração. A equação da linha de tendência e o coeficiente de determinação (R^2) foram estimados e os dados da curva padrão foram utilizados para estimar o título viral nos 98 genótipos submetidos à análise.

2.5. Determinação da concentração do vírus mediante RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) no ensaio em DBCA

2.5.1. Amplificação e purificação do fragmento codificante para a capa protéica do SCYLV

O fragmento de 450 pb, correspondente à sequência parcial do gene que codifica para o capsídeo do SCYLV foi obtido a partir de plantas da cultivar SP71-6163 infectadas com o vírus e expressando sintomas severos da doença (nota 4), mediante amplificação por RT-PCR e purificação do produto amplificado. O RNA total foi isolado, a partir do qual se procedeu a síntese do cDNA utilizando-se o Kit *GoScript™ Reverse Transcription System* da PROMEGA.

A amplificação do fragmento de 450 pb foi conduzida em um volume final de 20 μL contendo: 2,5 μL de cDNA (1:1), 1X de PCR buffer, 1 mM de dNTPs, 1,25 mM de MgCl_2 , 1 μM dos primers SCYLVP1f (5-GCTAACCGCTCACGAAGGAATGT-3) e SCYLVP2r (5-GAAGGGGGCCGGGAAGACT-3) e 0,025 U de Taq Polimerase BIO-21105. O programa da PCR consistiu de um ciclo de 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por um minuto e 72°C por dois minutos, finalizando com um ciclo de 72°C por sete minutos. A presença do produto específico da PCR foi conferida mediante eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X e corado com brometo de etídio, para visualização sob luz ultravioleta.

A partir do gel de eletroforese, o fragmento específico de DNA de 450 pb foi extraído com um bisturi e colocado em um tubo de centrífuga de 2,0 μL . O fragmento foi separado do gel utilizando o kit *Wizard SV gel and Clean-Up System*, seguindo as instruções do fabricante.

O fragmento purificado foi adenilado mediante o uso de 0,45 U da enzima Taq DNA Pol BIO-21105, 1X de tampão, 0,45 mM de dATP, 2,27 mM de MgCl_2 e 196,5 ng do fragmento purificado. Para permitir a ação da enzima, a amostra foi colocada no termociclador por 30 minutos a uma temperatura de 70°C.

2.5.2. Clonagem do fragmento de 450 bp e elaboração da curva padrão

A ligação do fragmento com o vetor foi feita aplicando 5 μL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 50 ng do vetor *pGEM®-T Easy* (3000 pb) (PROMEGA), 3 U de *T4 DNA ligase* e 3 μL do fragmento adenilado, num volume final de 10 μL , segundo as instruções do fabricante. A mistura foi colocada na geladeira por 16 horas (*overnight*). A clonagem do fragmento foi feita utilizando o meio Luria-Bertani sólido (LB) (1% de Triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl e 1,5% de ágar), contendo 100 mgL^{-1} de ampicilina, 60 mgL^{-1} de X-Gal (substrato cromogênio para β -Galactosidase) e 1 mmol L^{-1} de IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactoside).

A transformação de células foi feita mediante eletroporação, aplicando 1 μL do fragmento ligado ao plasmídeo *pGEM®-T Easy* e 40 μL de células competentes (sem parede celular) de *E. coli* da cepa JM109. As células transformadas foram

incubadas a 37°C em agitação a 200 rpm e centrifugadas a 4000 rpm por 4 minutos. As bactérias foram plaqueadas em médio LB sólido e incubadas *overnight* a 37°C.

Para verificar a presença do inserto, foi realizada uma PCR de colônias, aplicando 1X de tampão PCR; 2,2 mM de MgCl₂; 0,43mM de dNTP; 0,43 µM do primer SP6; 0,43 µM do primer T₇; 11,5 µL de água Milli-Q; 2 µL de Taq DNA Polimerase caseira e 2 µL de uma mistura colônias + água, para um volume final de 23 µL. O programa da PCR consistiu em um ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por um minuto, 65°C por um minuto e uma extensão final de 71°C por dez minutos. O plasmídeo foi purificado a partir de uma cultura de células de *E. coli* utilizando o kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* da SIGMA, seguindo as instruções do fabricante.

O vetor plasmidial *pGEM®-T Easy* contendo o inserto de 450 pb correspondente a proteína capsidial parcial do SCYLV foi utilizado para elaborar a curva padrão. O número de cópias do plasmídeo foi calculado utilizando a ferramenta *on line* da *URI Genomics and Sequencing centre* (<https://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>), enquanto o número de cópias da sequência codificante da capa proteica do SCYLV foi calculado usando a fórmula: “número de cópias = [quantidade (ng) * 6.022 x 10²³]/[comprimento (nt) * 1 x 10⁹ * 650]”.

Baseado no número de cópias do plasmídeo, cinco diferentes diluições seriadas (1:10 vezes) foram preparadas iniciando com 1x10⁻¹ng, seguido por 1x10⁻², 1x10⁻³, 1x10⁻⁴ e 1x10⁻⁵ng. Baseado nos valores de *Ct* (*Cycle threshold*), foi elaborada a curva padrão e foram estimados a correlação linear e o coeficiente de determinação para a curva.

2.5.3. Reação de RT-qPCR

Para cada unidade experimental do ensaio a campo em DBCA, foi feita a amostragem do ápice (tercio superior) da folha TVD0 de plantas de 12 meses de idade para realizar a extração de RNA utilizando o reagente Trizol, conforme instruções do fabricante. O tecido foliar foi previamente macerado utilizando o equipamento *TissueLyser* (QIAGEN), empregando o limbo e a nervura central das folhas coletadas. O RNA obtido foi ressuspenso em 25 µL de água DEPC (dietil-

pirocarbonato) e sua concentração obtida no equipamento NanoDrop (Termofisher Scientific). O tratamento com DNase foi feito a partir de 1 µg de RNA utilizando o kit *RQ1 RNase-Free DNase* (PROMEGA), conforme 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).

Para a desnaturação do RNA, as amostras já tratadas com a enzima DNase foram submetidas a uma temperatura de 70°C por 5 minutos e resfriadas em gelo por 5 minutos. O cDNA foi sintetizado utilizando o Kit *GoScript™ Reverse Transcription System* da PROMEGA. A um volume final de 10 µL adicionou-se 500 ng de RNA, 2 µL do *GoScript Reaction Buffer, Random Primers*; 1 µL do *GoScript Enzyme Mix* e 2 µL de água livre de nucleases. A reação de síntese do cDNA foi submetida à temperatura de 25°C por 5 minutos, seguido de 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C em um termociclador MyCycle Thermal Cycler, BIO-RAD.

A reação de RT-qPCR foi conduzida utilizando o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* da PROMEGA. O mix da reação foi composto por 5,0 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 2X; 1,6 µL de água livre de nuclease e 2 µM dos primers YLS RT FOR-N (5'-GGACCGAACCTATCTCAGTAC-3') e YLS RT REV-N (5'-TAGTAATCTTGGAGCCTGTTGTTG-3') em um volume final de 10 µL. Os primers amplificaram uma região de 181 nucleotídeos da sequência parcial da capa protéica do SCYLV (ORF3) (Chinnaraja e Viswanathan, 2015).

Como normalizador foi utilizado o gene referente à sub-unidade 25S do RNA ribossômico (25SrRNA) cujo par de primers 25SrRNA RT-F (5'-GGCAGCCAAGCGTTCATAGC-3') e 25SrRNA RT-R (5'-GGGTAAACTAACCTGTCTCACGAC-3') amplifica uma região de 156 nucleotídeos do referido gene (Chinnaraja e Viswanathan, 2015). As condições da qPCR foram otimizadas a 95°C por dois minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, 95°C por um minuto, 55°C por um minuto e a especificidade do amplicon foi analisada mediante perfis de curvas de dissociação (curvas de melting) durante 81 ciclos de 55°C por 10 segundos. A PCR foi realizada em um equipamento *IQ™5 Real-Time PCR Detection Systems* da Bio-Rad em microplacas de 96 poços. Em cada microplaca, além das amostras referentes aos genótipos avaliados foram

colocadas as diluições referentes à curva padrão para a estimativa da equação da reta e o respectivo coeficiente de determinação.

O número comparativo de cópias do inserto alvo, foi determinado como a média das três réplicas técnicas, baseado no método de quantificação relativa do DNA codificante do capsídeo do vírus (QR). O ΔCt foi obtido subtraindo o Ct do controle interno 25SrRNA, do Ct das amostras. O $\Delta\Delta Ct$ foi calculado subtraindo o ΔCt do controle negativo, do ΔCt das amostras. As QRs do SCYLV de todos os genótipos foram determinadas usando a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O genótipo que apresentou o valor médio mais alto do Ct e temperatura de melting de $82,5 \pm 1,0$ °C (Ririe et al., 1997), foi considerado como controle negativo dentro do painel.

Para verificar a consistência dos resultados, cDNA de uma planta da cultivar IACSP96-2042, obtida mediante cultura de micromeristemas e indexada por RT-PCR como livre de vírus, foi utilizada como controle negativo absoluto. Uma planta da cultivar SP71-6163 expressando severos sintomas do vírus, foi utilizada como controle positivo. Adicionalmente à QR, a metodologia de quantificação absoluta foi aplicada para determinar o número de cópias da sequência parcial da capa protéica do SCYLV para cada genótipo, mediante aplicação da equação da reta da curva padrão e a fórmula: “número de cópias = [quantidade (ng) * 6.022 x 10²³]/[comprimento (nt) * 1 x 10⁹ * 650]”.

2.5.4. Análise de dados

Os dados de severidade de sintomas da infecção pelo SCYLV coletados no ensaio a campo foram submetidos à análise de variância (teste F) usando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013) mediante o procedimento Proc GLM e a comparação de médias foi feita utilizando o teste t (LSD=*least significance difference*) a um $p < 0,05$, segundo o modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + B_j + G_i + E_{ijk}$, onde Y_{ij} = observação de i éximo genótipo no j éximo bloco, μ = média geral, B_j = efeito do j éximo bloco, G_i = efeito do i éximo genótipo, e E_{ij} = erro médio experimental. Os dados são apresentados como medias das notas dos sintomas e foram transformados mediante $\ln(x + 5)$.

A partir dos dados e assumindo o efeito aleatório dos genótipos no modelo misto, estimou-se a variância genética (σ_G^2) e a variância ambiental (σ_E^2). A herdabilidade em sentido amplo (h^2) foi estimada utilizando os componentes da variância, segundo a equação: $h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_E^2)$.

3. Resultados e discussão

3.1. Severidade do SCYLV em condições de viveiro e quantificação da concentração viral mediante DAS-ELISA

O teste DAS-ELISA foi realizado na absorvância de 405 nm e a curva padrão foi elaborada a partir de concentração conhecida do vírus purificado. A média dos valores de OD das diluições de 62,0; 31,0; 15,5; 7,75; 3,9; 1,95; 0,98 e 0,49ng/100µL foi de 0,202; 0,141; 0,087; 0,042; 0,050; 0,026; 0,001 e -0,005; respectivamente. As concentrações de vírus dos genótipos do viveiro de 12 meses de idade foram estimadas por DAS-ELISA a partir da equação linear $y = 287,29x - 4,09$ e o respectivo coeficiente de determinação $R^2 = 0,93$ (Figura 5).

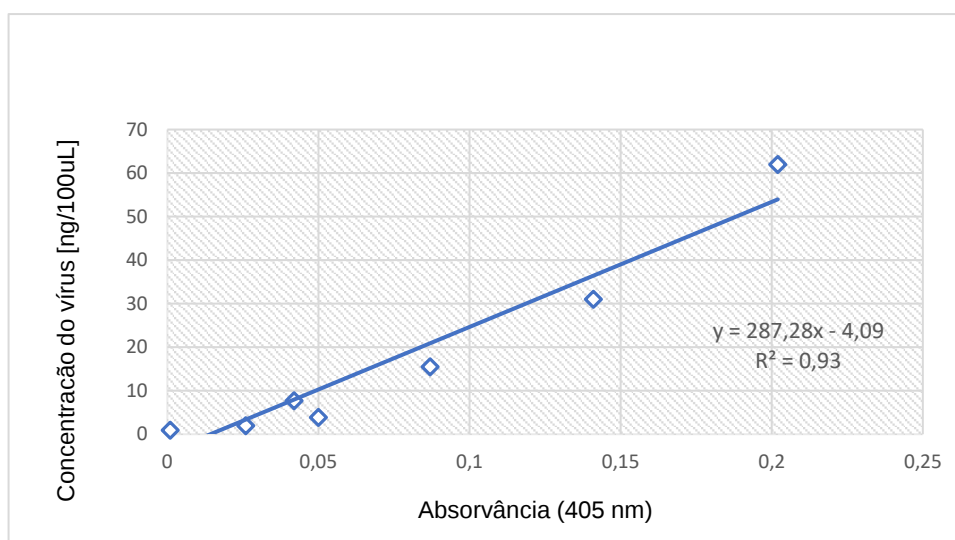


Figura 5. Gráfico da curva padrão obtida a partir de oito diluições seriadas de vírus purificado no teste DAS-ELISA para estimar a concentração do SCYLV.

Tomando como base o valor médio da OD do controle negativo do teste DAS-ELISA, somente genótipos com um valor de OD acima de 0,048, que corresponde a um valor três vezes acima do controle negativo (0,016), foram considerados

positivos. Segundo este critério, um total de 24 (24,48%) genótipos foram considerados como negativos para o vírus do amarelinho.

Segundo a escala de notas elaborada a partir de folhas do viveiro, os genótipos foram classificados em resistentes (nota 1,0), moderadamente resistentes (notas de 1,1 até 2,0), moderadamente susceptíveis (notas de 2,1 até 3,0) e susceptíveis (notas de 3,1 até 4,0) (Tabela 2). Desta maneira, dos 98 genótipos avaliados, 52 (53,06%) foram categorizados como resistentes, 43 (43,87%) moderadamente resistentes, 2 (2,04%) moderadamente susceptíveis e 1 (1,02%) susceptível. (Figura 6).

Tabela 2. Categorização da resistência de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. em condições de viveiro de campo de acordo com os resultados analisados por notas de sintomas e concentração viral estimada por DAS-ELISA

Categoria de resistência	Média da Nota TVD0	Faixa da concentração do Vírus [ng]	Média Vírus [ng]	r (X,Y)	p-valor
Resistente	1,0	0 - 51,5	10,92	-	-
Moderadamente resistente	1,1 - 2,0	0,8 - 68,31	12,00	0,14	0,37 ^{ns}
Moderadamente susceptível	2,1 - 3,0	61,45 - 95,31	78,36	1,00	-
Susceptível	3,1 - 4,0	156,79 - 156,79	156,79	-	-

TVD0=Top Visible Dewlap Zero, r=Coeficiente de Correlação de Perason; X: Nota TVD0; Y: concentração viral; ns: não significativo. -: não estimado.

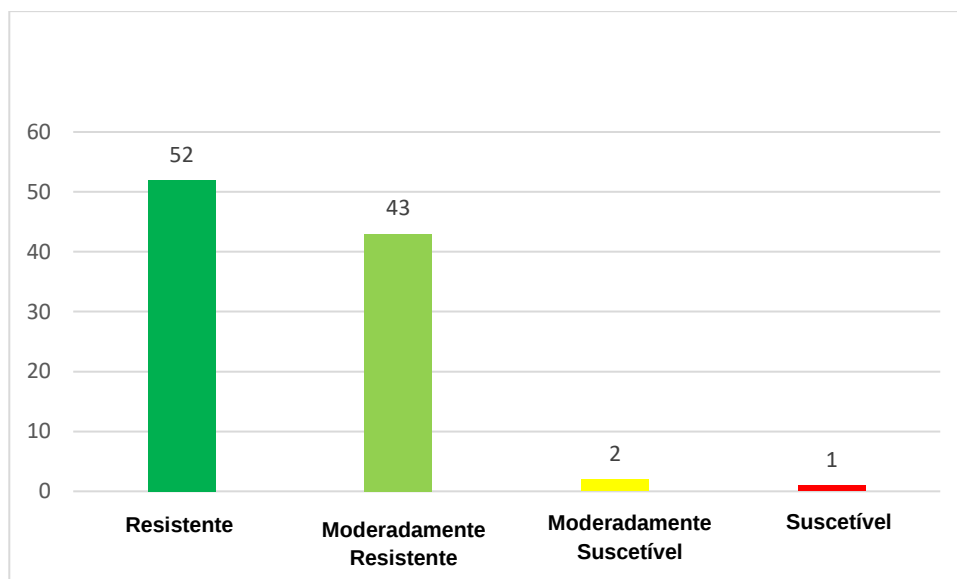


Figura 6. Distribuição da resposta de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. à infecção do SCYLV em viveiro, avaliados mediante escala de notas de severidade de sintomas.

Vários dos genótipos avaliados não apresentaram correspondência entre a nota de severidade obtida no campo e a concentração viral obtida no teste imunoenzimático. Uma baixa correlação (coeficiente de correlação de Pearson $r=0,50$) também foi encontrada por Lehrer e Komor (2008) em avaliações feitas em cultivares procedentes de Havaí, utilizando a técnica serológica TBIA como ferramenta de quantificação viral. A correlação foi fraca devido ao fato que a cultivar H65-7052 mostrou baixa concentração do vírus, porém expressou sintomas fortes e a cultivar H78-3606 expressou um comportamento oposto. Em outros estudos, alguns cultivares procedentes do Centro Tecnológico da Cana-de-açúcar do Brasil, também exibiram uma fraca correlação entre sintomas e concentração do vírus, causados principalmente por genótipos com carga viral, baseado no teste DAS-ELISA, e sem sintomas da doença (Scagliusi et al., 2009).

Apenas a cultivar SP71-6163 foi categorizada como suscetível à doença apresentando uma média de 4,0 (nota máxima) na folha TVD0, atingindo uma concentração de vírus de 156,79 ng/100µL, segundo o teste DAS-ELISA. Por outro lado, os genótipos IACCTC06-9767 e IACSP02-3025 foram categorizados como moderadamente suscetíveis (nota de severidade entre 2,1 e 3,0) e apresentaram uma concentração do vírus de 61,45 e 95,31 ng/100µL, respectivamente.

No estudo foi verificado que um grupo de 43 genótipos foi agrupado como moderadamente resistentes à doença (nota de severidade de 1,1 a 2,0), apresentando uma faixa de concentração viral de 0,8 até 68,31 ng/100 µL. Os genótipos com estas características foram: IACSP04-3150, IACSP96-3069, IACSP01-8082, IACSP97-2084, IACSP04-5065, IACSP97-6680, IACSP04-3259, IACSP01-5501, IACSP04-6152, IACSP01-2417, IN84-82, IACSP97-4039, IACSP04-6032, IACSP02-3168, IACSP04-2510, IACSP04-2508, IACSP04-2509, IACSP97-4048, IACSP97-3384, IACCTC06-9713, IACSP04-6073, IACSP99-4011, IACCTC05-9607, IACSP98-3011, SP83-2847, IACSP99-3369, IACSP04-2516, IACSP04-6058, IACSP04-6035, IACSP04-6059, IACSP98-5046, IACSP01-8046, NG57-213, IACSP01-2421, IACSP96-3056, IACCTC05-5580, IACSP04-6077, IACCTC06-9741, IACSP04-6053, IACSP01-2430, IS76-155, IACCTC06-9708 e IACCTC05-9634 (Tabela 3). Note-se que existe uma baixa correlação ($r=0,14$) entre a concentração do vírus e as notas de severidade, explicada pelo amplo intervalo de concentração

do vírus dos genótipos que conformam este grupo. A baixa concentração do vírus em plantas com notas intermediárias e altas de sintomas no viveiro poderia estar relacionada com o início da senescência das plantas amostradas (acima de 13 meses de idade). No entanto, os sintomas assemelhados à senescência das plantas infectadas também poderiam ser causados pelo vírus, que promove alterações no processo fotossintético, provavelmente ocasionadas pela ruptura na estrutura e função dos cloroplastos e também por desordens no metabolismo de carboidratos (Gonçalves et al., 2005).

Finalmente, um grupo de 52 genótipos foi categorizado como resistente (nota de severidade: 1,0), apresentando uma faixa de concentração do vírus entre 0,0 e 51,5 ng/100100 µL. Os genótipos com estas características foram: IACBIO266, IACBIO277, IACCTC05-3616, IACCTC06-1050, NG57-12, IACBIO257, IACCTC05-6518, IACBIO273, IACBIO241, CTC15, IN84-88, IACBIO270, IACBIO271, IJ76-293, US57-1415, IN84-58, IACBIO232, IACBIO275, KRAKATAU, IAC91-4168, IACBIO279, IACSP04-6007, IACSP98-2053, IACCTC05-9534, IACSP04-3148, IACSP96-3076, IACSP95-5037, IACSP01-8158, IACSP04-2503, IACSP96-2008, IACSP04-2521, IACSP95-3028, IACCTC05-9630, IACSP01-5519, IACSP99-3009, IACSP93-3046, IACSP01-8034, IACSP04-5081, IACSP99-3357, IACSP02-2125, IACSP04-3123, IACSP01-2410, IACSP04-2504, IACSP99-1020, IACCTC05-9578, RB93-5744, CANA ALHO, IACSP02-2067, IACSP95-3018, IACSP97-6628, IACSP95-6114 e IACCTC05-9552 (Tabela 3). Observa-se que todos os genótipos IACBIO, assim como o KRAKATAU, IN84-88, IN84-58, NG57-12 e IJ76-293, presentes nesta categoria, são originários de *S. spontaneum* e *S. robustum*, o que poderia ser a causa da ausência de sintomas, sendo estas espécies conhecidas por apresentar resistência a estresses bióticos e abióticos. Adicionalmente, os genótipos IACBIO apresentam resistência do tipo antibiose e não preferência para alimentação de adultos de espécies de insetos hemípteros, o que poderia explicar um baixo índice de infecção pelo SCYLV, caracterizando neste caso, um tipo de resistência ao vetor (Lopez, 2016).

Tabela 3. Média de notas de severidade causadas pelo SCYLV e concentração viral obtidas por DAS-ELISA em 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. em condições de viveiro.

Genótipo	(+)/(-)	Méd TVD0	ln(MédTVD0+5)	Vírus [ng]	Classe de Resistência
IACBIO266	-	1,00	1,79	0,00	R
IACBIO277	-	1,00	1,79	0,00	R
IACCTC05-3616	-	1,00	1,79	0,00	R
IACSP04-3150	-	2,00	1,95	0,80	MR
IACCTC06-1050	-	1,00	1,79	1,08	R
NG57-12	-	1,00	1,79	1,23	R
IACBIO257	-	1,00	1,79	1,37	R
IACCTC05-6518	-	1,00	1,79	2,09	R
IACBIO273	-	1,00	1,79	2,81	R
IACBIO241	-	1,00	1,79	3,09	R
CTC15	-	1,00	1,79	3,24	R
IN84-88	-	1,00	1,79	3,24	R
IACBIO270	-	1,00	1,79	3,38	R
IACBIO271	-	1,00	1,79	4,82	R
IJ76-293	-	1,00	1,79	5,10	R
IACSP96-3069	-	2,00	1,95	5,10	MR
IACSP01-8082	-	2,00	1,95	5,39	MR
US57-1415	-	1,00	1,79	5,68	R
IN84-58	-	1,00	1,79	5,82	R
IACBIO232	-	1,00	1,79	6,11	R
IACBIO275	-	1,00	1,79	6,54	R
IACSP97-2084	-	2,00	1,95	7,98	MR
IACSP04-5065	-	2,00	1,95	7,98	MR
IACSP97-6680	-	2,00	1,95	9,70	MR
IACSP04-3259	+	2,00	1,95	9,84	MR
KRAKATAU	+	1,00	1,79	9,84	R
IACBIO279	+	1,00	1,79	9,99	R
IAC91-4168	+	1,00	1,79	10,13	R
IACSP01-5501	+	1,66	1,90	10,13	MR
IACSP04-6007	+	1,00	1,79	10,56	R
IACSP98-2053	+	1,00	1,79	10,56	R
IACSP04-6152	+	1,33	1,85	10,71	MR
IACCTC05-9534	+	1,00	1,79	10,71	R
IACSP04-3148	+	1,00	1,79	10,71	R
IACSP01-2417	+	1,33	1,85	10,71	MR
IN84-82	+	1,66	1,90	10,71	MR
IACSP96-3076	+	1,00	1,79	10,85	R
IACSP97-4039	+	1,66	1,90	10,85	MR
IACSP95-5037	+	1,00	1,79	10,99	R

IACSP04-6032	+	1,66	1,90	10,99	MR
IACSP02-3168	+	1,33	1,85	10,99	MR
IACSP04-2510	+	1,33	1,85	10,99	MR
IACSP01-8158	+	1,00	1,79	11,14	R
IACSP04-2503	+	1,00	1,79	11,14	R
IACSP96-2008	+	1,00	1,79	11,14	R
IACSP04-2521	+	1,00	1,79	11,28	R
IACSP04-2508	+	1,33	1,85	11,28	MR
IACSP04-2509	+	1,33	1,85	11,28	MR
IACSP97-4048	+	1,33	1,85	11,28	MR
IACSP97-3384	+	1,33	1,85	11,42	MR
IACSP95-3028	+	1,00	1,79	11,57	R
IACCTC05-9630	+	1,00	1,79	11,57	R
IACSP01-5519	+	1,00	1,79	11,57	R
IACCTC06-9713	+	1,66	1,90	11,86	MR
IACSP04-6073	+	1,33	1,85	11,86	MR
IACSP99-3009	+	1,00	1,79	12,00	R
IACSP93-3046	+	1,00	1,79	12,00	R
IACSP99-4011	+	1,66	1,90	12,00	MR
IACCTC05-9607	+	1,66	1,90	12,29	MR
IACSP98-3011	+	1,66	1,90	12,29	MR
SP83-2847	+	1,66	1,90	12,86	MR
IACSP99-3369	+	1,66	1,90	12,86	MR
IACSP04-2516	+	1,66	1,90	13,29	MR
IACSP04-6058	+	1,33	1,85	13,44	MR
IACSP04-6035	+	1,66	1,90	13,44	MR
IACSP04-6059	+	1,66	1,90	13,87	MR
IACSP98-5046	+	1,66	1,90	13,87	MR
IACSP01-8046	+	2,00	1,95	14,15	MR
IACSP01-8034	+	1,00	1,79	14,30	R
IACSP04-5081	+	1,00	1,79	14,58	R
NG57-213	+	1,33	1,85	14,87	MR
IACSP01-2421	+	1,33	1,85	15,02	MR
IACSP99-3357	+	1,00	1,79	15,16	R
IACSP96-3056	+	1,66	1,90	15,59	MR
IACSP02-2125	+	1,00	1,79	15,59	R
IACSP04-3123	+	1,00	1,79	16,60	R
IACSP01-2410	+	1,00	1,79	16,88	R
IACSP04-2504	+	1,00	1,79	19,18	R
IACSP99-1020	+	1,00	1,79	19,76	R
IACCTC05-5580	+	2,00	1,95	20,04	MR
IACCTC05-9578	+	1,00	1,79	21,77	R
RB93-5744	+	1,00	1,79	21,77	R
CANA ALHO	+	1,00	1,79	25,21	R

IACSP02-2067	+	1,00	1,79	27,80	R
IACSP95-3018	+	1,00	1,79	29,38	R
IACSP04-6077	+	1,66	1,90	30,10	MR
IACCTC06-9741	+	1,66	1,90	31,39	MR
IACSP04-6053	+	1,66	1,90	32,54	MR
IACSP01-2430	+	1,66	1,90	32,97	MR
IS76-155	+	1,33	1,85	34,26	MR
IACSP97-6628	+	1,00	1,79	41,66	R
IACSP95-6114	+	1,00	1,79	44,32	R
IACCTC05-9552	+	1,00	1,79	51,50	R
IACCTC06-9708	+	2,00	1,95	52,22	MR
IACCTC069767	+	2,50	2,01	61,41	MS
IACCTC05-9634	+	2,00	1,95	68,31	MR
IACSP023025	+	3,00	2,08	95,31	MS
SP71-6163	+	4,00	2,20	156,79	S

Média TVD0: Valor médio da nota de severidade de sintomas registrada com escala diagramática de notas da folha TVD0 (*Top visible dewlap* 0). Ln (MédTVD0+5): dado de nota de severidade transformado mediante $\ln(x+5)$. (-) negativo e (+) positivo para o SCYLV. Vírus [ng]: concentração do SCYLV quantificada mediante curva padrão no teste DAS-ELISA. Classe de resistência: R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente suscetível) e S (suscetível).

3.2. Avaliação da severidade do SCYLV em condições de ensaio a campo em DBCA

Para avaliar a severidade do SCYLV no ensaio a campo em DBCA, foi utilizada a mesma classificação de resistência e suscetibilidade usada para avaliar a severidade no viveiro (notas de 1 até 4), sendo que nota 1, indica ausência de sintomas e nota 4, expressão máxima dos sintomas da doença. Dessa maneira, os genótipos foram agrupados como resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis.

Dos 98 genótipos avaliados para intensidade de sintomas de SCYLV a campo no ensaio em DBCA, 42 (42,86%) não apresentaram sintomas de amarelinho ao longo das avaliações realizadas. Um grupo de 41 genótipos (41,84%) apresentou notas baixas de intensidade de sintomas e, em alguns casos, expressão tardia dos sintomas (12 e 13 meses após plantio). Um outro grupo de 11 genótipos (11,22%) apresentou sintomas intermediários da doença (2,1 – 3,0). Finalmente, os restantes quatro genótipos (4,08%) mostrou sintomas severos (3,1 – 4,0), sendo mais visíveis a partir do undécimo mês após plantio (abril, 2018) (Figura 7). A cultivar SP71-6163,

utilizada como fonte de inóculo, apresentou os níveis mais altos de sintomas, confirmando sua alta suscetibilidade. Os genótipos que não exibiram sintomas e os restantes com severidades intermediárias e altas são apresentados na Tabela 4, de acordo com o teste LSD (0.05). As correlações entre as folhas TVD0 a TVD3 foram positivas e altas ($p < 0,0001$), sendo ligeiramente maiores entre TVD0 e TVD1, constituindo o mês de junho de 2018 (13 meses após plantio) o de maior expressão dos sintomas da doença.

A escala de notas de 1 até 4, foi útil para discriminar os genótipos segundo sua resistência ou susceptibilidade ao SCYLV, tanto em condições de viveiro, como no ensaio em DBCA, constituindo-se em uma boa alternativa às escalas de notas de 0 até 5, utilizadas por Viswanathan et al. (2016) para avaliar genótipos da coleção mantida no Instituto de Coimbatore, Índia; e daquela constituída de notas de severidade de 0 até 6, elaborada por Lehrer e Komor (2008), utilizadas para avaliar variedades Havaianas.

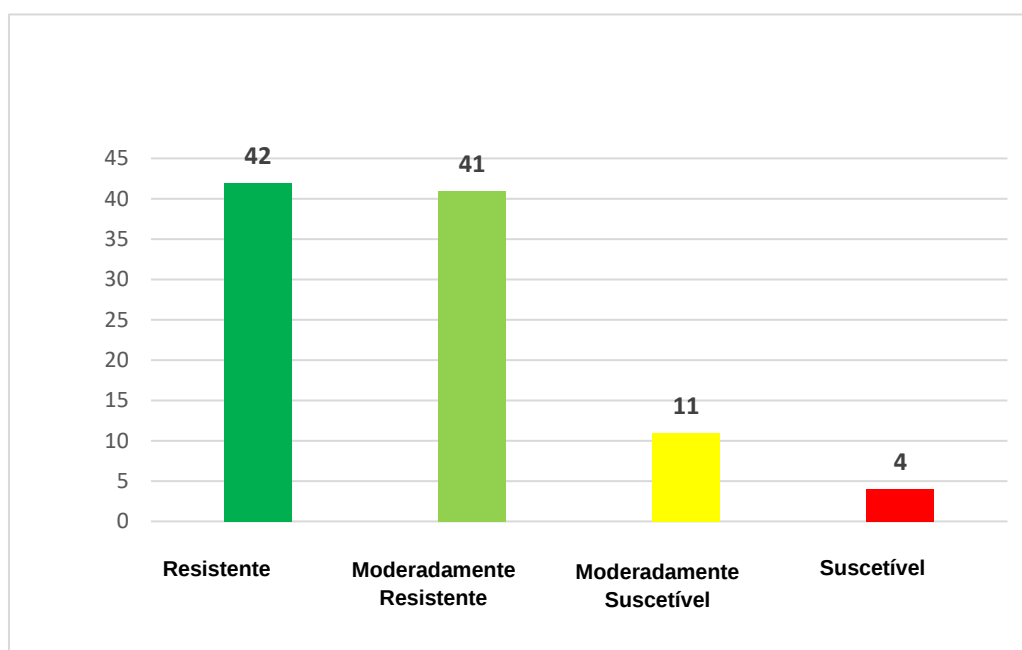


Figura 7. Distribuição da resposta de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. à infecção do SCYLV em ensaio a campo em DBCA, avaliados mediante escala de notas de severidade de sintomas.

Tabela 4. Média da intensidade de sintomas em genótipos do gênero *Saccharum* spp. apresentadas em ensaio a campo em DBCA para avaliação da resistência ao SCYLV, medida pela escala de notas no mês de junho/2018 (13 meses após plantio).

Genótipo	Média TVD0	ln (MédTVD0+5)	Categoria de resistência	Teste t (LSD)
CANA ALHO	1,00	1,79	R	0
IACSP01-2410	1,00	1,79	R	0
KRAKATAU	1,00	1,79	R	0
IN84-82	1,00	1,79	R	0
IACSP04-6053	1,00	1,79	R	0
IACSP98-5046	1,00	1,79	R	0
IACSP01-8034	1,00	1,79	R	0
IACSP99-3357	1,00	1,79	R	0
IACCTC05-9578	1,00	1,79	R	0
IACSP97-6628	1,00	1,79	R	0
CTC15	1,00	1,79	R	0
IACBIO232	1,00	1,79	R	0
IACBIO241	1,00	1,79	R	0
IACBIO257	1,00	1,79	R	0
IACBIO266	1,00	1,79	R	0
IACBIO270	1,00	1,79	R	0
IACBIO271	1,00	1,79	R	0
IACBIO273	1,00	1,79	R	0
IACBIO275	1,00	1,79	R	0
IACBIO277	1,00	1,79	R	0
IACBIO279	1,00	1,79	R	0
IACCTC05-9552	1,00	1,79	R	0
IACCTC06-9708	1,00	1,79	R	0
IACCTC06-9741	1,00	1,79	R	0
IACSP01-5519	1,00	1,79	R	0
IACSP02-2067	1,00	1,79	R	0
IACSP02-3168	1,00	1,79	R	0
IACSP04-2504	1,00	1,79	R	0
IACSP04-2510	1,00	1,79	R	0
IACSP04-6035	1,00	1,79	R	0
IACSP04-6073	1,00	1,79	R	0
IACSP04-6152	1,00	1,79	R	0
IACSP95-3018	1,00	1,79	R	0
IACSP96-2008	1,00	1,79	R	0
IACSP96-3076	1,00	1,79	R	0
IACSP97-4048	1,00	1,79	R	0
IACSP99-4011	1,00	1,79	R	0
IJ76-293	1,00	1,79	R	0

IN84-88	1,00	1,79	R	o
RB93-5744	1,00	1,79	R	o
SP83-2847	1,00	1,79	R	o
IACSP04-6007	1,01	1,79	R	no
IACSP01-2421	1,11	1,81	MR	no
IACSP04-6058	1,11	1,81	MR	no
IACCTC06-9767	1,11	1,81	MR	no
IACSP04-2509	1,11	1,81	MR	no
IACSP04-6077	1,11	1,81	MR	no
NG57-213	1,11	1,81	MR	no
IAC91-4168	1,22	1,83	MR	m-o
IACSP02-2125	1,22	1,83	MR	m-o
IACSP04-6032	1,22	1,83	MR	m-o
IN84-58	1,22	1,83	MR	m-o
IACSP01-8158	1,22	1,83	MR	m-o
IS76-155	1,33	1,84	MR	l-o
IACSP04-3148	1,33	1,84	MR	l-o
IACSP04-3259	1,33	1,84	MR	l-o
IACSP95-6114	1,33	1,84	MR	l-o
IACSP01-2417	1,44	1,86	MR	k-o
IACSP01-5501	1,44	1,86	MR	k-o
NG57-12	1,44	1,86	MR	j-o
IACSP93-3046	1,44	1,86	MR	j-o
IACSP97-3384	1,44	1,86	MR	j-o
US57-1415	1,44	1,86	MR	j-o
IACSP04-2516	1,51	1,87	MR	i-o
IACCTC05-9534	1,51	1,87	MR	i-o
IACSP98-2053	1,56	1,88	MR	i-o
IACSP95-3028	1,56	1,88	MR	h-o
IACSP95-5037	1,60	1,89	MR	g-o
IACCTC05-9630	1,60	1,89	MR	g-o
IACCTC05-9634	1,60	1,89	MR	g-o
IACSP01-2430	1,60	1,89	MR	g-o
IACCTC05-9607	1,60	1,89	MR	g-o
IACSP97-2084	1,66	1,90	MR	g-o
IACSP99-3369	1,66	1,90	MR	g-o
IACSP04-5065	1,72	1,91	MR	g-o
IACSP04-3123	1,72	1,91	MR	g-o
IACSP97-4039	1,72	1,91	MR	g-o
IACSP04-3150	1,91	1,93	MR	f-n
IACSP98-3011	1,95	1,94	MR	f-m
IACSP04-2503	1,95	1,94	MR	f-m
IACSP97-6680	1,95	1,94	MR	f-m
IACSP04-5081	1,95	1,94	MR	f-m

IACSP96-3056	2,00	1,95	MR	f-m
IACCTC06-9713	2,11	1,96	MS	e-l
IACCTC06-1050	2,18	1,97	MS	e-k
IACCTC05-3616	2,22	1,98	MS	d-j
IACSP02-3025	2,22	1,98	MS	d-j
IACSP04-6059	2,33	1,99	MS	d-i
IACCTC05-5580	2,33	1,99	MS	d-i
IACSP04-2508	2,56	2,00	MS	c-h
IACSP99-1020	2,56	2,01	MS	b-g
IACSP04-2521	2,70	2,04	MS	b-f
IACSP99-3009	2,76	2,05	MS	b-f
IACSP96-3069	2,98	2,08	MS	a-e
IACSP01-8082	3,22	2,11	S	a-d
IACCTC05-6518	3,33	2,12	S	a-c
IACSP01-8046	3,44	2,13	S	ab
SP71-6163 ^a	4,00	2,20	S	a

Média TVD0=Média de notas de severidade de sintomas da folha TVD0. $\ln (\text{MédTVD0}+5)$ = transformação da média TVD0 para $\ln (x+5)$. ^aCultivar utilizado como controle positivo. DBCA=Delineamento em blocos completos ao acaso. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p<0,05$). Classe de resistência: R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente suscetível) e S (suscetível).

Cinquenta e quatro dos 98 genótipos compartilharam a mesma categoria de resistência tanto no viveiro como no ensaio em DBCA, produzindo uma correlação relativamente baixa ($r = 0,44$) entre as notas de severidade registrados nos dois ensaios. Dos cinquenta e quatro genótipos, vintinove compartilharam a categoria resistente; vinti e três moderadamente resistentes; um moderadamente suscetível e um suscetível (Tabela 5).

Tabela 5. Genótipos que compartilham a mesma categoria de resistência no viveiro e no ensaio em DBCA.

Classe de resistência	Genótipos			
	Resistente	Moderadamente resistente	Moderadamente suscetível	Suscetível
	IACBIO266	IACSP04-2509	IACSP02-3025	SP71-6163
	IACBIO277	IACSP04-6058		
	IACBIO257	NG57-213		
	IACBIO273	IACSP01-2421		
	IACBIO241	IS76-155		
	CTC15	IACSP01-2417		
	IN84-88	IACSP97-3384		
	IACBIO270	IACSP04-6077		
	IACBIO271	IACSP04-6032		
	IJ76-293	IACSP01-5501		
	IACBIO232	IACSP04-2516		
	IACBIO275	IACSP97-4039		
	KRAKATAU	IACCTC05-9607		
	IACBIO279	IACSP99-3369		
	IACSP96-3076	IACSP01-2430		
	IACSP96-2008	IACSP98-3011		
	IACSP01-5519	IACSP96-3056		
	IACSP01-8034	IACSP04-3259		
	IACSP99-3357	IACSP97-2084		
	IACSP01-2410	IACSP04-5065		
	IACSP04-2504	IACCTC05-9634		
	IACCTC05-9578	IACSP04-3150		
	RB93-5744	IACSP97-6680		
	CANA ALHO			
	IACSP02-2067			
	IACSP95-3018			
	IACSP97-6628			
	IACCTC05-9552			
	IACSP04-6007			

3.3. Quantificação do SCYLV por RT-qPCR

A presença do fragmento de 181 pb amplificado por RT-PCR na diluição seriada do plasmídeo foi confirmada em eletroforese em gel de agarose (1,2%). A Figura 4.a apresenta as bandas com intensidade decrescente das cinco diluições junto com os controles positivo (SP71-6163) e negativo (IACSP96-2042, indexada mediante cultura de tecidos).

A curva padrão foi otimizada a partir de 1×10^{-1} ng de DNA do plasmídeo (1:10 vezes), seguidas de 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} e 1×10^{-5} ng, alcançando seus respectivos valores de C_t de 9,94; 13,73; 17,93; 21,21 e 24,33 (Tabela 6) na RT-qPCR. Esses valores foram plotados em um gráfico, no qual, o eixo y corresponde aos valores médios dos C_t s e x à concentração logarítmica (1:10 vezes) do plasmídeo, obtendo-se a equação da reta, $y = -3,626x + 6,55$, com um coeficiente de determinação de $R^2=0,996$ (Figura 8.b).

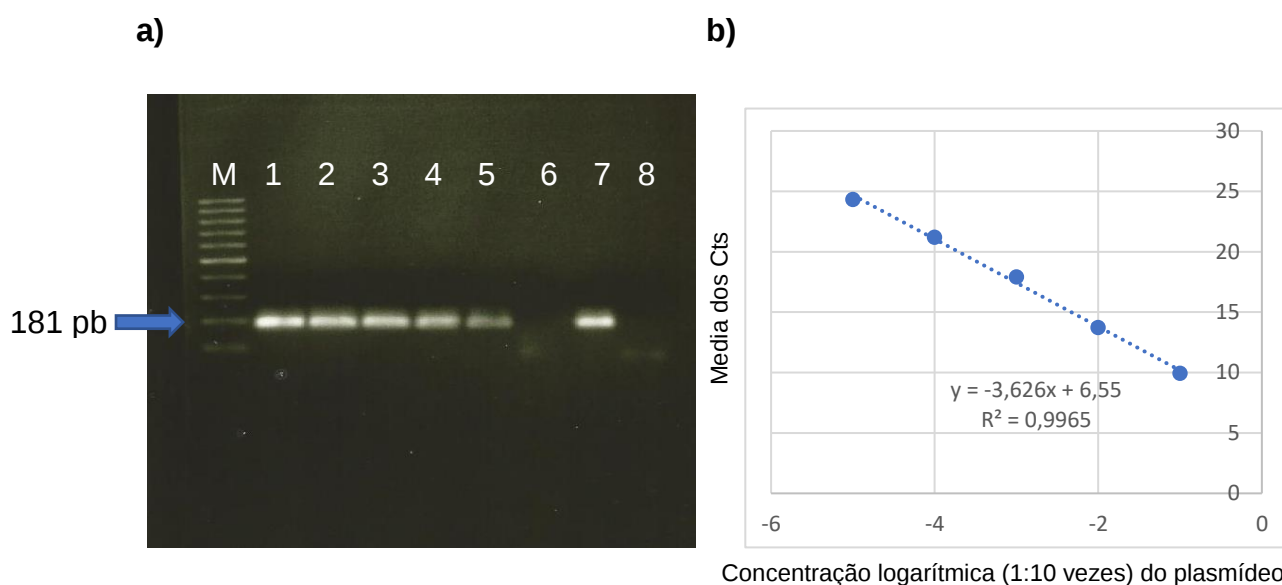


Figura 8. Quantificação do SCYLV por RT-qPCR. **a)** Gel de agarose a 1,2% mostrando a presença do inserto amplificado de 181 pb na diluição padrão do plasmídeo. M, marcador de 100 pb; coluna 1-5, diluições em série: 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} e 1×10^{-5} ng dos padrões de plasmídeo; colunas 6, 7 e 8: Água, cultivar SP71-6163 (C+) e cultivar IACSP96-2042 (C-), respectivamente. **b)** Curva padrão gerada com base em cinco diluições seriadas (1:10 vezes) e seus respectivos valores de C_t . A equação de regressão e o coeficiente de determinação (R^2) são apresentados.

Tabela 6. Diluição padrão do plasmídeo (1:10 vezes).

Fator de diluição	[ng]	C_t	Número de cópias
-1	1×10^{-1}	9,94	$5,95 \times 10^8$
-2	1×10^{-2}	13,73	$5,36 \times 10^7$
-3	1×10^{-3}	17,93	$3,72 \times 10^6$
-4	1×10^{-4}	21,21	$4,64 \times 10^5$
-5	1×10^{-5}	24,33	$6,39 \times 10^4$

Os controles positivo e negativo absoluto foram analisados segundo a temperatura de melting e o número de cópias do fragmento de 181 pb obtido a partir da equação de regressão da curva padrão (quantificação absoluta). O número de cópias do inserto no controle negativo absoluto (IACSP96-2042) foi de 110,9 cópias e seu valor de C_t de 34,34, enquanto no controle positivo (SP71-6163), foi de 5991612,9 cópias e um valor de C_t de 17,18. Embora registrado 110,9 cópias do inserto no controle negativo absoluto, não houve presença da banda no gel de agarose (Figura 8.a) e nenhum pico na *curva de melting* a $82,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ (Figura 9), considerando então, que o número de cópias do controle foi não detectado (ND). Já no controle positivo, apresentou-se um pico simples na curva de *melting* a $82,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ nas três réplicas técnicas (Figura 9), mostrando consistência nos resultados. Chinnaraja et al. (2014) também registraram um número pequeno de cópias do inserto (378,21) em plantas com amplificação negativa (cultivar Co 86032); no entanto, não houve presença de picos na curva de *melting*, o que garante a coerência dos resultados.

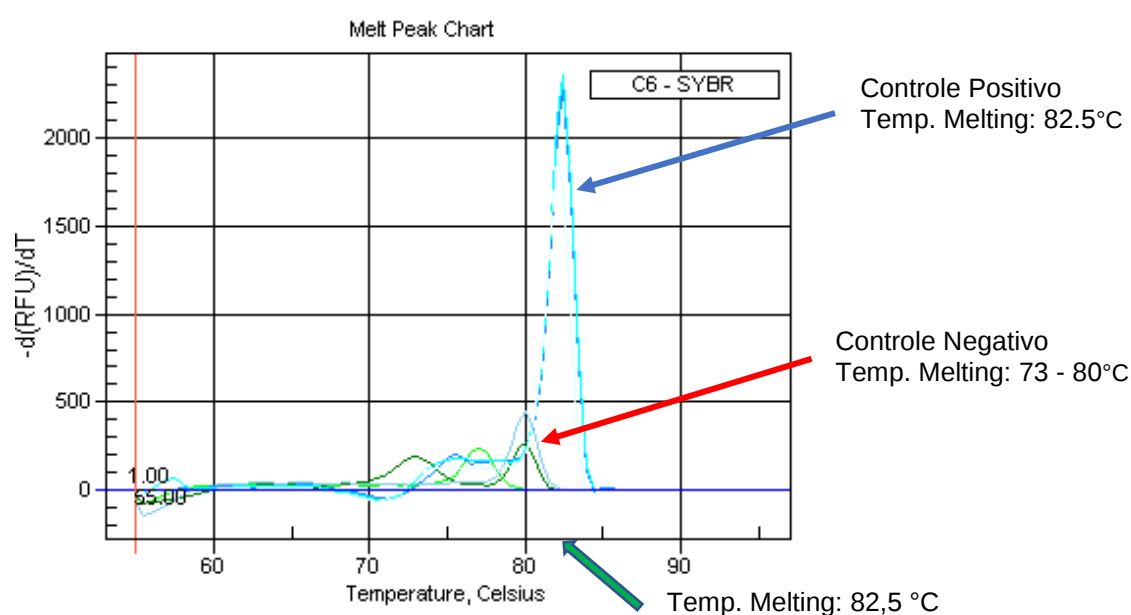


Figura 9. Curvas de Melting do controle negativo absoluto (cultivar IACSP96-2042) e controle positivo (cultivar SP71-6163). Observa-se uma curva simples a 82,5 °C no controle positivo e nenhuma no controle negativo para a mesma temperatura.

Embora neste trabalho foram estimados tanto o número de cópias mediante a metodologia de quantificação absoluta, assim como os valores de quantificação relativa (QR) na RT-qPCR, somente essa última metodologia foi considerada para as discussões dos resultados, tendo em conta que essa metodologia elimina possíveis vieses por usar um controle interno de uma região conservada do RNA ribossomal.

Foi constatado baixa correlação (Coeficiente de correlação de Pearson= 0,081) entre os dados de quantificação relativa da expressão da sequência parcial do DNA codificante para a capa protéica do vírus (QR) e a severidade de sintomas medida na folha TVD0, confirmando a baixa correlação encontrada entre os dados do teste DAS-ELISA e as notas de severidade avaliadas na etapa de viveiro dos mesmos 98 genótipos estudados. Correlações baixas entre os dados de severidade e a concentração do vírus nas plantas tem sido encontradas em outros vírus infectando outras culturas, tal o caso relatado por Hajano et al. (2016) quando mediram a severidade em campo do *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) numa população de cultivares de arroz (*Oriza sativa*) e sua concentração viral mediante RT-qPCR. Resultados similares foram encontrados por Pallet et al. (2008), relatando que não houve correlação entre a severidade dos sintomas e a quantidade do *Turnip mosaic virus* nos tecidos de plantas infectadas de *Brassica rapa*.

A categoria de resistência dos genótipos, juntamente com as faixas de concentração viral obtida mediante RT-qPCR, bem como as correlações entre as notas de severidade e a quantidade de patógeno estimada são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Classificação da resistência de 91 genótipos do gênero *Saccharum* spp. ao SCYLV, de acordo com os resultados analisados mediante escala de notas de severidade de sintomas e concentração viral estimada por RT-qPCR.

Categoria de resistência	Faixa de Nota TVD0	QR do vírus	Média QR	r (X,Y)	p-valor
Resistente	1,0	1,00 – 421.010,94	53.568,38	-	-
Moderadamente resistente	1,1 -2,0	1.144,25 – 1.818.712,69	96.393,43	0,14	0,39 ^{ns}
Moderadamente suscetível	2,1 – 3,0	518,28 – 133.138,89	44.604,75	0,58	0,062 ^{ns}
Suscetível	3,1 – 4,0	354,65 – 234.430,48	81.763,13	0,98	0,020*

Folha TVD0= *Top Visible dewlap* 0. QR=Quantificação relativa da expressão da sequência parcial do DNA codificante para a capa protéica do SCYLV. r= coeficiente de correlação de Pearson; X: Nota TVD0; Y: concentração viral; *significativo ao nível de p<0,05. ns=não significativo. -: não estimado.

Foram registrados valores de QR para 91 genótipos com uma temperatura de melting de $82,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Nos restantes sete genótipos, embora foi registrado valores de *Ct* (e consequentemente, valores de QR), não foi observado picos na temperatura de melting, sendo catalogados como não detectados (ND) para SCYLV. Os genótipos com essas características foram: IACBIO266, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IN84-88, IACSP98-5046 and IACSP04-6007. Adicionalmente, esses genótipos não apresentaram sintomas da doença (nota 1,0 de severidade), sendo categorizados como resistentes.

Os genótipos IACBIO279, IACBIO275, IACBIO241, IACSP04-2510, IN84-82, IACSP04-6035, KRAKATAU, IACSP02-3168, CTC15, IACSP01-5519, IACSP96-3076, IACBIO257, IACSP04-2504, IACCTC05-9578, IACCTC06-9741, IACBIO232, IACSP97-4048, IACSP96-2008, CANA ALHO, IACCTC06-9708, IACSP04-6152, IACBIO277, IACSP04-6053, IACSP01-8034, IACCTC05-9552, IACSP02-2067, IJ76-293, IACSP99-3357, IACSP01-2410, IACSP99-4011, IACSP04-6073, IACSP97-6628, IACSP95-3018, SP83-2847 e RB93-5744 apresentaram valores de QR entre 1,0 e 421.010,94 e ausência de sintomas no campo (nota 1,0), sendo categorizados como resistentes. O número de cópias e os valores de QR do vírus em cada um dos genótipos estudados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Dados relativos à quantificação do SCYLV em 98 genótipos do género *Saccharum* spp. de doce meses de idade no ensaio a campo em DBCA, estimados mediante RT-qPCR.

Genótipo	Ct amos	Ct Norm	ΔCt	[ng] do vírus	^a Num de copias	^b $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$ (QR)
IACSP046-007	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACSP98-5046	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACBIO266	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACBIO270	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACBIO271	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACBIO273	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IN84-88	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IACBIO241 ^c	34,74	9,24	25,50	0,000002	8321,56 ^e	1,00 ^e
IACBIO275	33,80	9,05	24,76	0,000001	3615,98 ^e	1,68 ^e
IACBIO279	33,80	10,07	23,73	0,000001	3619,11 ^e	3,40 ^e
IACSP04-2510	33,21	10,23	22,98	0,000002	11479,20	5,72
IACCTC05-6518	20,88	3,85	17,03	0,000326	1666959,74	354,65
IACCTC05-3616	26,35	9,87	16,48	0,000044	224145,48	518,28
IACBIO257	25,25	9,78	15,47	0,000293	1501146,16	1046,56

IACCTC05-9634	19,58	4,24	15,34	0,000615	3148173,87	1144,25
CTC15	24,39	9,23	15,16	0,000132	673459,28	1299,15
IACCTC05-9607	19,21	4,35	14,86	0,000738	3776698,85	1592,08
CANA ALHO	23,65	9,17	14,48	0,000822	4209175,71	2072,66
IACCTC05-9552	18,35	3,96	14,39	0,001126	5761793,61	2205,17
IACCTC05-9534	23,32	9,39	13,92	0,000248	1271387,64	3055,11
IACSP01-2410	22,60	9,03	13,58	0,001505	7703300,59 ^e	3885,71 ^e
IACSP97-6680	22,43	9,23	13,19	0,000421	2155584,50	5069,82
IACSP04-3259	23,57	10,67	12,90	0,000131	668760,51	6217,27
IACBIO232	23,77	10,97	12,81	0,000657	3364490,51	6625,37
IACSP99-3009	22,22	9,47	12,75	0,002373	12148149,04	6893,82
SP83-2847	22,62	9,89	12,74	0,015553	79609351,22	6955,25
IACSP01-8082	22,28	9,59	12,69	0,000521	2665794,87	7204,72
IACSP96-3076	22,17	9,57	12,60	0,000280	1435013,47	7652,19
IAC91-4168	23,38	10,85	12,53	0,000815	4169485,20	8015,47
KRAKATAU	26,54	14,11	12,43	0,000073	371138,35	8611,63
IACSP04-2503	22,21	9,98	12,24	0,000256	1308351,61	9840,93
NG57-213	22,36	10,14	12,21	0,001349	6906682,58	10006,43
IACCTC05-5580	23,91	11,86	12,05	0,000079	403223,95	11214,12
IACSP02-3168	23,33	11,31	12,02	0,000114	581298,14	11434,66
IACSP01-2421	21,41	9,55	11,87	0,003846	19687398,88	12707,21
IJ76-293	22,37	10,80	11,56	0,001339	6853256,74	15687,12
IACSP99-4011	20,66	9,13	11,54	0,001789	9156276,44	15945,91
IN84-58	20,90	9,37	11,53	0,003697	18923954,67	15996,92
IACSP96-3056	22,75	11,25	11,49	0,001726	8836831,40	16456,36
IACSP04-2516	23,28	11,80	11,48	0,000460	2357058,34	16582,19
IACSP98-2053	21,09	9,64	11,45	0,001340	6859629,13	16947,03
IACSP01-2417	21,65	10,26	11,39	0,000197	1005803,81	17724,86
IACSP01-5519	21,45	10,10	11,35	0,000220	1123878,38	18129,16
IACSP95-3028	20,93	9,59	11,34	0,001757	8992532,11	18324,54
IACSP97-2084	22,39	11,08	11,31	0,000429	2197833,82	18632,98
IACCTC05-9578	21,00	9,76	11,24	0,000457	2339296,89	19642,62
IACSP04-6152	20,71	9,55	11,16	0,000877	4490608,46	20699,87
IACCTC06-1050	21,20	10,06	11,14	0,000150	767908,13	21084,28
IACBIO277	20,72	9,77	10,95	0,000992	5078639,42	23919,07
IACSP97-4048	20,24	9,38	10,86	0,000668	3418280,49	25511,62
IACSP04-6059	21,60	10,83	10,77	0,002679	13712238,75	27103,22
IACSP97-4039	20,72	9,96	10,77	0,000537	2750187,98	27200,27
IACSP04-6077	20,31	9,55	10,75	0,001059	5422358,62	27509,77
IACSP99-1020	21,03	10,29	10,74	0,000003	12824,09	27659,15
IACSP02-3025	20,19	9,54	10,65	0,000760	3888038,92	29516,41
US57-1415	20,91	10,33	10,58	0,005213	26680826,03	30921,49
IACSP04-6053	19,77	9,23	10,54	0,001002	5129715,90	31896,66
IACSP04-6035	20,22	9,69	10,53	0,000865	4429709,00 ^e	32078,51 ^e

IACSP02-2067	20,53	10,16	10,38	0,001294	6625830,11	35715,59
IACSP04-6032	19,28	8,94	10,34	0,001471	7527194,47	36607,96
IN84-82	26,12	15,79	10,33	0,000007	35870,63 ^e	36859,13 ^e
IS76-155	19,07	8,77	10,30	0,000031	156318,66	37568,65
IACSP04-2509	19,45	9,40	10,05	0,001185	6065765,86	44777,84
IACSP04-5081	19,72	9,68	10,04	0,001149	5881215,61	45034,20
IACSP04-2504	21,56	11,54	10,01	0,000332	1700206,93	45884,66
IACSP98-3011	24,68	14,75	9,94	0,000120	616381,51	48440,01
IACSP04-3150	19,10	9,21	9,89	0,002261	11572626,64	50121,25
NG57-12	18,00	8,15	9,85	0,009244	47315129,84	51245,40
IACSP01-8158	20,03	10,20	9,83	0,000874	4472278,30	52069,48
IACCTC06-9767	20,26	10,50	9,76	0,000626	3204373,72	54819,33
IACSP04-2508	21,49	11,75	9,74	0,000067	344478,34	55433,28
IACSP96-2008	20,62	10,89	9,74	0,000706	3611859,15	55650,05
IACSP99-3369	19,71	10,01	9,70	0,003404	17421767,67	57191,29
IACSP01-5501	19,60	9,92	9,67	0,000613	3137693,43	58081,11
IACSP04-3148	18,76	9,10	9,66	0,002665	13641120,60	58779,94
IACCTC06-9713	20,03	10,46	9,58	0,000293	1500450,64	62100,84
IACSP93-3046	18,52	8,96	9,56	0,002450	12542196,38	62913,82
IACSP01-8034	19,47	10,02	9,45	0,001021	5226026,29	67625,15
IACSP02-2125	18,86	9,44	9,42	0,003091	15820727,01	69118,54
IACSP04-6073	19,17	9,78	9,39	0,001805	9239822,29	70922,69
IACSP01-8046	21,38	12,25	9,12	0,000833	4262962,33	85062,66
IACSP043123	18,15	9,03	9,12	0,003602	18438547,29	85542,00
IACSP97-3384	17,70	8,67	9,03	0,002105	10774763,69	90765,61
IACSP01-2430	22,50	13,67	8,83	0,000122	625754,36	104068,37
IACSP99-3357	19,13	10,45	8,68	0,001410	7217594,75	115310,59
IACSP04-2521	19,33	10,65	8,68	0,000022	113771,81	115989,97
IACSP96-3069	18,66	10,18	8,48	0,002383	12197170,54	133138,89
IACSP97-6628	17,96	9,54	8,42	0,002869	14685530,77	138735,77
IACSP04-6058	16,93	8,69	8,24	0,000474	2425344,75	156669,63
RB93-5744	17,83	9,75	8,08	0,169517	867684064,70	175192,45
IACCTC06-9708	18,24	10,33	7,91	0,000823	4214855,65	197591,93
IACCTC05-9630	22,31	14,47	7,84	0,000045	230879,15	207585,98
IACSP95-6114	17,67	9,93	7,74	0,004388	22458187,20	221930,74
SP71-6163 ^d	19,37	11,71	7,66	0,001266	6478393,00	234430,49
IACCTC06-9741	18,76	11,25	7,52	0,000609	3114927,11	259083,63
IACSP95-5037	18,12	10,69	7,42	0,000350	1793251,47	276141,61
IACSP95-3018	16,91	10,09	6,82	0,007027	35970106,88	421010,94
IACSP04-5065	14,61	9,90	4,71	0,021155	108282272,26	1818712,69

A quantificação do SCYLV é expressada como o ^anúmero de cópias e ^bquantificação relativa (QR) do genoma parcial que codifica para a capa proteica do vírus. ^cGenótipo usado como controle negativo dentro do painel. ^dGenótipo usado como controle positivo dentro do painel. ^eValores estimados a partir de somente duas réplicas biológicas. ND= não detectado (livre do SCYLV).

A resistência apresentada pelos genótipos da série IACBIO faz - se evidente tanto nas quantificações virais feitas nas plantas do viveiro, mediante DAS-ELISA, como nas quantificações das plantas do campo, por RT-qPCR. Essa resistência pode estar estreitamente relacionada à presença de parte do genoma do clone genitor feminino SES069, que tem sua origem na espécie *S. spontaneum*, conhecida por apresentar maior robustez e consequentemente maior resistência a fatores bióticos e abióticos.

Comstock et al. (2001) confirmaram a baixa taxa de incidência (7%) do SCYLV em acessos de *S. spontaneum* da coleção mundial de cana-de-açúcar em Miami, Florida, em contraste com 75,8% nos acessos de *S. officinarum*, 62,5 % para *S. robustum*, e 46,2 e 13,6% para os acessos de *S. sinense* e *S. barberi*, respectivamente. Segundo esses mesmos autores, progênies oriundas do cruzamento entre *S. officinarum*, suscetível ao SCYLV e *S. spontaneum* (resistente), apresentaram-se como resistentes ao vírus. Resultados similares foram registrados em uma coleção de variedades no Havaí (Schenck e Lehrer, 2000). Os autores utilizaram a técnica TBIA para quantificar o vírus, encontrando um maior número de clones positivos de *S. officinarum* e *S. sinense*, quando comparadas a um menor número em *S. spontaneum* e *S. robustum*.

Um grupo de 41 genótipos apresentaram notas de severidade entre 1,1 e 2,0; conformando o grupo de genótipos moderadamente resistentes. A variação da QR destes genótipos foi entre 1.144,25 – 1.818.712,69 com média de 96.393,43. Os genótipos dentro desta categoria são: IACSP04-6058, IACCTC06-9767, IACSP04-6077, IACSP04-2509, NG57-213, IACSP01-2421, IAC91-4168, IACSP01-8158, IACSP04-6032, IACSP02-2125, IN84-58, IS76-155, IACSP04-3259, IACSP04-3148, IACSP95-6114, IACSP01-2417, IACSP01-5501, IACSP97-3384, IACSP93-3046, US57-1415, NG57-12, IACCTC05-9534, IACSP04-2516, IACSP95-3028, IACCTC05-9630, IACSP95-5037, IACSP97-2084, IACCTC05-9634, IACCTC05-9607, IACSP99-3369, IACSP01-2430, IACSP97-4039, IACSP04-3123, IACSP04-5065, IACSP98-3011, IACSP04-2503, IACSP97-6680, IACSP04-5081, IACSP98-2053, IACSP96-3056 e IACSP04-3150. O coeficiente de correlação entre as notas de severidade e a concentração do vírus neste grupo é baixa ($r=0,14$), explicada por

genótipos com altos valores de QR e notas baixas de severidade. No entanto, o p-valor < 0,05 foi não significativa.

É importante notar que existiram genótipos com alta carga viral, mas com pouca expressão de sintomas. Isso sugere a existência de um mecanismo que impede a ação do patógeno dentro da planta, permitindo a coexistência da mesma junto com o vírus sem ser afetados os processos metabólicos. Sendo estes genótipos fontes de resistência, recomenda-se avaliá-los novamente em ambientes controlados como casas de vegetação, para serem examinados com mais detalhe nas diferentes etapas fenológicas da planta.

Os genótipos IACCTC06-9713, IACCTC06-1050, IACCTC05-3616, IACCTC05-5580, IACSP02-3025, IACSP04-6059, IACSP04-2508, IACSP99-1020, IACSP04-2521, IACSP99-3009 e IACSP96-3069 apresentaram sintomas com notas entre 2,1 e 3,0; junto com valores de QRs do vírus entre 518,28 – 133.138,89; sendo agrupados como genótipos moderadamente susceptíveis. Finalmente, os genótipos IACSP01-8082, IACCTC05-6518, IACSP01-8046 e SP71-6163 foram categorizados como susceptíveis por apresentar notas entre 3,1 e 4,0. Os valores de QR para estes genótipos variou entre 354,65 – 234.430,48, com uma média de 81.763,13 (Tabela 7). O coeficiente de correlação deste grupo de genótipos foi alto ($r=0,98$) e significativo (p-valor < 0,05).

A liberação de afídeos virulíferos da espécie *M. sacchari*, tanto no viveiro como no ensaio a campo em DBCA, junto com a presença de parcelas plantadas com a cultivar SP71-6163, contribuíram para gerar maior pressão do inóculo do vírus do amarelinho. Através de quantificação por RT-qPCR, Chinnaraja e Viswanathan (2015) observaram que em plantas sadias a concentração do vírus incrementa-se após 7 a 300 dias depois de ter sido inoculado pelos afídeos virulíferos. Segundo estes autores, o número de cópias de DNA codificante da capa proteica do SCYLV aos sete dias foi de $22,3 \times 10^3$ sofrendo importantes incrementos até chegar a $4,78 \times 10^6$ cópias aos 300 dias. No nosso estudo, a liberação de afídeos nas primeiras etapas de desenvolvimento das plantas, foi importante para gerar uma boa concentração do vírus, o que permitiu detectar diferenças significativas entre os genótipos avaliados.

A aplicação da RT-qPCR para estimar os valores de QR do vírus SCYLV foi utilizada com sucesso, e conforme relatado por Chinnaraja et al. (2014), esta metodologia forneceu uma maior acurácia da quantificação do vírus quando comparada com as técnicas sorológicas. Além disso, apresenta a vantagem de não precisar de antissoro requerido por esses métodos.

Com base nos resultados ora obtidos, a metodologia da curva padrão detectou com alta acurácia o número de cópias de DNA codificantes para a capa protéica do vírus nas amostras dos genótipos avaliados. A aplicação desta ferramenta permitiu a identificação e discriminação dos genótipos suscetíveis e dos resistentes, os quais poderão ser utilizados como possíveis parentais nos programas de melhoramento como fontes de resistência ao amarelinho.

3.4. Componentes da variância e herdabilidade

Os componentes da variância estimados a partir das notas da expressão dos sintomas de amarelinho em condições de ensaio de campo em blocos ao acaso são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da análise de variância e seus componentes quanto à severidade dos sintomas da infecção pelo SCYLV em genótipos do género *Saccharum* spp.

Fonte de variação	GL	QM	Variância Genética (σ_G^2)	Variância Ambiental (σ_E^2)	Herdabilidade em nível de parcela h^2
Blocos	2	0,020368 ^{ns}	0,006576	0,005920	52,62%
Genótipos	97	0,025647**			
Resíduos	194	0,005920			
CV (%)	4,13				

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; CV: coeficiente de variação. **p<0,01. Dados estimados a partir das médias de três avaliadores no mês de junho/2018 na folha TVD0. ns: não significativo.

A herança da resistência ao SCYLV apresentou herdabilidade (h^2) em sentido amplo em nível de parcela, de 52,62%, indicando que uma parte importante da variância fenotípica é causada por variância genotípica para esse caráter. Essa herdabilidade é mais baixa do que 75% e 84%, reportada por Debibakas et al.

(2014), estimada a partir de avaliações feitas em folhas e colmos, utilizando o teste serológico TBIA em um painel conformado por 189 acessos entre híbridos comerciais e híbridos interespecíficos de geração inicial, procedentes de 26 programas de melhoramento genético. De acordo com Resende (2002), a herdabilidade é considerada alta quando é superior a 50%. Embora a herdabilidade obtida é específica para o painel baixo estudo, sugere-se que a seleção por famílias para resistência ao SCYLV poderia ser eficiente, mesmo em etapas tempranas de seleção nos programas de melhoramento genético.

Costet et al. (2012) demonstraram que 32% da variância fenotípica à resistência ao SCYLV foi explicada por um único alelo quantitativo (*QTL*, *Quantitative Trait Loci*) identificado como *Ryl1*, enquanto que Islam et al. (2018), encontraram o QTL denominado *qSCYLVR79*, responsável por 28% da variação fenotípica, a partir de uma população F₁ derivada do cruzamento entre as cultivares CP95-1039 × CP88-1762. Esses QTLs explicando uma grande parte da variação fenotípica, indica que a resistência ao amarelinho seja provavelmente governada por poucos genes, o que pode explicar a herdabilidade relativamente alta desta característica nos genótipos estudados.

Os resultados deste estudo sugerem que parte da resistência genética ao SCYLV poderia ser explicada por *resistência parcial* governada por genes menores (Koch e Parlevliet, 1991), principalmente observada nos genótipos moderadamente resistentes, onde frequentemente a resistência parcial esta oculta e aparece só quando genes maiores falham, chegando a ser um tipo de resistência duradeira.

Nos canaviais brasileiros não foi estudada a presença de estirpes do vírus de amarelinho. A possível presença de diferentes isolados do mesmo vírus leva à necessidade de identificar as estirpes na população de seleção e realizar os estudos de herança da resistência e a seleção de genótipos resistentes, segundo os diferentes isolados incidentes.

Farghama et al. (2018) sugerem gerar resistência a várias estirpes do vírus ao mesmo tempo. Uma alternativa sugerida pelos autores é a estratégia *multi-target*, obtendo plantas transgênicas portando RNA de interferência (RNAi), que impede a multiplicação do RNA viral dentro da planta. Os autores sugerem combinar diferentes sequências consenso do SCYLV para construir o plasmídeo de expressão

de RNAi, obtendo resistência para várias estirpes do vírus em um mesmo clone modificado geneticamente.

Finalmente, os vinte e nove genótipos que expressaram resistência ao SCYLV nos dois ensaios (viveiro de campo e ensaio a campo em DBCA) provavelmente representam fontes de resistência ao vírus, destacando a necessidade de uma avaliação mais detalhada em diferentes locais, ciclos de produção (primeira e segunda soca), mas também em diferentes fases fenológicas.

4. Conclusões

Foi possível identificar fontes de resistentes ao SCYLV no grupo de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. no viveiro de campo e no ensaio em DBCA, utilizando escala de notas para avaliar a severidade do vírus. Foi constatada correspondência entre a nota de severidade registrada no campo e a concentração do vírus quantificada mediante DAS-ELISA e RT-qPCR nos genótipos resistentes e suscetíveis, mas não nos genótipos moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, constituindo estas duas ferramentas eficientes e sensíveis na quantificação do patógeno para genótipos categorizados dentro desses dois grupos de resistencia/susceptibilidade. Foram detectados 29 genótipos expressando resistência ao SCYLV nos dois ensaios avaliados, sendo que a fonte de resistência provavelmente é vinda principalmente do genoma de *Saccharum spontaneum*.

5. Referências.

Aitken K, McNeil M (2010) Diversity Analysis. In.: Henry RJ, Kole Ch (Eds.) **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. Science Publishers p. 19-42.

Bailey RA, Bechet GR, Cronje, CPR (1996) Notes on the occurrence of yellow leaf syndrome of sugarcane in southern Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association** 70: 3 - 6.

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

Chatenet M, Delage C, Ripolles M, Irey M, Lockhart BEL, Rott P (2001) Detection of *Sugarcane yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Dis** 85:1177-1180.

Chinnaraja C, Viswanathan R, Sathyabhama M, Parameswari B, Bagyalakshmi K, Malathi P, Neelamathi D (2014) Quantification of *Sugarcane yellow leaf virus* in vitro plantlets and asymptomatic plants of sugarcane by RT-qPCR. **Current Science** 106(5): 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.

Clark MF, Adams AM (1977) Characteristics of the 8 16 2microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. **Gen. Virol** 34: 475-483.

Comstock JC, Irvine JE, Miller JD (1994) Yellow leaf syndrome appears on the United States Mainland. **Sugar Journal** 56: 33-35.

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.

Comstock JC, Miller JD, Schnell RJ (2001) Incidence of *Sugarcane yellow leaf virus* in clones maintained in the world collection of sugarcane and related grasses at the United States National Repository in Miami, Florida. **Sugar Tech** 3: 128-133.

Costet L, Raboin L-M, Payet M, D'Hont A, Nibouche S (2012) A major quantitative trait allele for resistance to the *Sugarcane yellow leaf virus* (*Luteoviridae*). **Plant Breeding** 131(5): 637 – 640.

Coutinho AE (2017) **Parâmetros genéticos e mapeamento associativo de características tecnológicas de cana de açúcar em três épocas de colheita**. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Unesp, Jaboticabal.

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. **Proc S Afr Sug Technol Ass** 72: 81-84.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz DJ (Eds.). **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam, p.7-84.

Debibakas S, Rocher S, Garsmeur O, Toubi L, Roques D, D'Hont A, Hoarau J-Y, Daugrois JH (2014) Prospecting sugarcane resistance to *Sugarcane yellow leaf virus* by genome-wide association. **Theor Appl Genet** 127: 1719 –1732.

Farghama K, Xu Y, Xiao N, Liu D, Muhammad T, Wang H, Waqar I, Saeed R, Chen P (2018) Genome characterization of *Sugarcane yellow leaf virus* with special reference to RNAi based molecular breeding. **Microbial Pathogenesis** 120: 187–197

Fernandes AC (2011). Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar. 3^{ra} Ed. Piracicaba, Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil (STAB), 416 p.

Fitch MMM, Lehrer AT, Komor E, Moore PH (2001) Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. **Plant Pathology** 50: 676 – 680.

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** 30:10-16.

Gonçalves MC, Pinto LC, Souza SC, Landell MG (2012) Virus diseases in sugar cane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology** 2: 108-116.

Hajano JUD, Zhang HB, Ren YD, Lu CT, Wang XF (2016) Screening of rice (*Oryza sativa*) cultivars for resistance to *Rice black streaked dwarf virus* using quantitative PCR and visual disease assessment. **Plant Pathology** 65(9): 1509-1517.

Irvine JE (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor Appl Genet** 98: 186–194.

Islam MS, Yang X, Sood S, Comstock JC, Wang J (2018) Molecular characterization of genetic basis of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) resistance in *Saccharum* spp. hybrid. **Plant Breed** 137: 598–604.

Koch MF, Parlevliet JE (1991) Genetic analysis of, and selection for, factors affecting quantitative resistance to *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* in rice. **Euphytica** 53: 235-245.

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.

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(2): 109-120.

Landell MGA, Silva DN, Anjos AI, Mendonça JR, Bidoia MAP, Campana, MP, Xavier, MA, Figueiredo P (2007) Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil. Boletim Técnico IAC 201, Campinas. pp.37.

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** 5(6): 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.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. **Methods** 25(4):402–408.

Lopes DOP (2016) Categorias de resistência de genótipos de *Saccharum* spp. à cigarrinha (*Hemiptera: Cercopidae*) da raiz. 54 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – UNESP, Jaboticabal.

Maia IG, Gonçalves MC, Arruda P, Vega J (2000) Molecular evidence that *Sugarcane yellow leaf virus* (ScYLV) is a member of the *Luteoviridae* family. **Archives of Virology** 145(5): 1009-1019.

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(1): 156-71.

Pallett DW, Cooper JI, Wang H, Reeves J, Luo Z, Machado R, Obermeier C, Walash JA, Kearsy MJ (2008) Variation in the pathogenicity of two *Turnip mosaic virus* isolates in wild UK *Brassica rapa* provenances. **Plant Pathology** 57: 401-407.

Rassaby L, Girard J, Lemaire O, Costet L, Irey MS, Kodja H, Lockhart B, Rott P (2004) Spread of *Sugarcane yellow leaf virus* in sugarcane plants and fields on the island of Réunion. **Plant Pathology** 53: 117-125.

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. **Proc S Afr Sug Technol Ass** 86: 244 – 254.

Resende MDV (2002) Genética, biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 975 p.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Anal Biochem** 245: 154-60.

Rutherford RS, Brune AE, Nuss KJ (2004) Current status of research on sugarcane yellow leaf syndrome in Southern Africa. **Proc S Afr Sug Technol Ass** 78: 173 – 180.

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

Scagliusi SM, Lockhart BEL (2000) Transmission, Characterization, and Serology of a *Luteovirus* Associated with Yellow Leaf Syndrome of Sugarcane. **Phytopathology** 90 (2): 120-124.

Scagliusi SM, Basu SK, De Gouvea JA, Vega J (2009) Comparison of two diagnosis methods for evaluation of *Sugarcane yellow leaf virus* concentration in Brazilian sugarcane cultivars. **Functional Plant Science and Biotechnology** 3(1): 26-30.

Schenck S, Lehrer AT (2000) Factors affecting the transmission and spread of *Sugarcane yellow leaf virus*. **Plant Dis** 84: 1085–1088.

Schenk S (1990) Yellow leaf syndrome. A new sugarcane disease. p 38 In: Hawaiian Sugar Planters. Association Annual Report.

Schenk 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. Enfield, USA: Science Publishers Inc. p. 25–35.

Vega J, Scagliusi SMM, Ulian EC (1997) Sugarcane yellow leaf disease in Brazil: evidence of association with a *luteovirus*. **Plant Dis** 81: 21–6.

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(1405): 60-71.

CAPITULO 3 - Avaliação da resistência ao vírus do mosaico (*Sugarcane mosaic virus*, *SCMV*) em um painel de genótipos do género *Saccharum* spp.

Resumo - Um grupo de 98 genótipos compostos de cultivares e clones elites do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Instituto Agronômico (IAC) do Brasil e acessos de germoplasma básico de cana-de-açúcar foram estudados em um ensaio a campo utilizando um delineamento experimental em blocos completos ao acaso (DBCA) para avaliar a resistência ao *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) em condições naturais de infecção. A severidade foi avaliada usando uma escala diagramática de notas de 1 a 4 e a estirpe do vírus presente na população foi estudada mediante RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) e sequenciamento, sendo a estirpe SCMV-RIB-1 a possível causadora dos sintomas no painel de genótipos. Dos 98 genótipos avaliados, 26 (26,53%) apresentaram sintomas de mosaico, sendo 5,1% categorizados como suscetíveis, 8,16% como moderadamente suscetíveis e 13,26% em moderadamente resistentes. Os 72 genótipos restantes (73,47%) foram considerados resistentes ao SCMV pela ausência de sintomas. A herdabilidade em sentido amplo para o painel foi de 62,49%. A principal fonte de resistência ao SCMV é vinda provavelmente dos acessos de *Saccharum spontaneum* empregados como parentais dos genótipos avaliados.

Palavras chave: Cana-de- açúcar, estirpe SCMV-RIB-1, escala diagramática de notas.

1. Introdução

O mosaico é uma das doenças causadas por vírus mais amplamente distribuídas no mundo inteiro, afetando cana-de-açúcar, milho, sorgo e outras espécies de *Poaceas* (Yang e Mirkov, 1997). O mosaico da cana-de-açúcar é causado pelo *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), que pertence ao subgrupo do gênero *Potyvirus* e à família *Potyviridae* (Fauquet et al., 2005). Na atualidade, os sintomas de mosaico da cana-de-açúcar estão associados com quatro doenças causadas por vários vírus: (1) Mosaico leve, causado por *Sugarcane mild mosaic virus* (SCMMV); (2) Mosaico da raia, causado por *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) (Xu et al., 2010); (3) Mosaico estriado, causado por *Sugarcane striate mosaic-associated virus* (SCSMaV); (4) Mosaico, causado por *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e *Sorghum mosaic virus* (SrMV) (Rott et al., 2008). Outros vírus, como o *Zea mosaic virus* (ZeMV), isolado de milho (Seifers et al., 2000), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) e *Johnson grass mosaic virus* (JGMV) (Shukla et al., 1994), têm sido incluídos como membros do subgrupo (McKern et al., 1991; Lesemann et al., 1992; Shukla et al., 1992). No entanto, somente os vírus, SCMV e SrMV, que causam sintomas individualmente, poderiam ser considerados como duas doenças diferentes, são referidos como *mosaico da cana-de-açúcar* (Grisham, 2000; Rott et al., 2002).

SCMV possui uma partícula flexuosa e filamentosa não empacotada de aproximadamente 700 – 760 nm de comprimento e 13-14 nm de largura. O genoma está composto por RNA de 10 Kb excluindo a calda de poly A, sendo transmitidos de forma não persistente e não circulativa pelos afídeos *Rhopalosiphum paidi*, *Rhopalosiphum maidis* (Zhang et al., 2008) e *Schizaphis graminum* (Teakle et al., 1989), frequentemente encontrados em diversas culturas no Brasil.

A capa proteica (CP) do vírus se compõe de fileiras multiplex de proteínas rodeando o genoma, adotando uma forma helicoidal (Shukla e Ward, 1989). A CP tem uma função múltipla no movimento local de uma célula para outra, na movimentação sistêmica dentro do hospedeiro, empacotamento e multiplicação do genoma do vírus (Urcuqui-Inchima et al., 2001). A CP é também importante na classificação de estirpes e espécies (Adam et al., 2011).

Os principais sintomas do mosaico são apresentados nas folhas, variando sua intensidade segundo a susceptibilidade do cultivar e as condições de clima, solo e a estirpe do vírus envolvida. Plantas jovens e em ativo crescimento são as que apresentam maior susceptibilidade (Comstock e Lentini, 2005). O sintoma característico se apresenta como um padrão de contrastantes sombras verdes, apresentando ilhas de cor verde normal sob uma base verde pálido ou áreas cloróticas ou amareladas no limbo da folha. Na maioria dos casos, as áreas cloróticas são difusas, mas podem ser intensamente definidas quando a planta é infectada por determinadas estirpes do vírus (Perera et al., 2012).

Dentro da diversidade genética do SCMV, tem sido relatada 14 estirpes do vírus, identificadas e designadas pelas letras "A" até "N" (Zhang et al., 2008). Na Argentina, foram encontrados os isolados "A", "B" e "F" e, recentemente, o isolado "I" do SrMV também foi detectado. Adicionalmente, em 2005 foi detectada a presença predominante do isolado "E", em Tucumán, cuja caracterização deu-se mediante as técnicas de RT-PCR (*Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Perera et al., 2009).

Nos Estados Unidos da América, no Estado da Florida, o mosaico da cana foi atribuído às estirpes A, B, D e E do vírus SCMV (Rott et al., 2002). Segundo Gonçalves et al. (2007), o isolado de SCMV denominado RIB1, é a estirpe predominante que afeta os canaviais do Estado de São Paulo, no Brasil, causando severos sintomas em clones e cultivares comerciais. A estirpe SCMV-RIB1 tem sido considerada como uma nova estirpe, sendo agrupada junto com outros isolados identificados no Brasil, como JAU1 e PIR2.

Os vírus apresentam capacidade extrema para evoluir, adaptando-se a todos os grupos de organismos conhecidos, bem como de moldar-se de forma rápida a numerosas espécies dentro de um mesmo reino (Schneider e Roossinck, 2001). Essas características também valem para o vírus do mosaico da cana-de-açúcar, que apresenta grande capacidade de gerar novas estirpes de vírus e infectar novos clones de cana-de-açúcar que anteriormente foram consideradas como tolerantes. No Brasil, a cultivar RB72-454, uma das mais amplamente cultivadas neste território, e tida como resistente, apresentou sintomas que foram atribuídos à nova

estirpe do vírus, RIB-1 (Gonçalves et al., 2007). Outras variedades que foram consideradas como tolerantes para mosaico, como IAC91-2218 e IAC93-6006, também foram confirmadas infectadas no campo pelo isolado SCMV-RIB-1 (Gonçalves et al., 2004).

O mosaico da cana-de-açúcar tem sido controlado com a implementação de programas de melhoramento genético e práticas culturais, tais como o uso de semente vegetativa sadia, o "*rouguing*" em viveiros e o monitoramento constante de lavouras comerciais (Gonçalves et al., 2012; Medeiros et al., 2014). No entanto, a proximidade de canaviais com lavouras de milho é um fator que incrementa as fontes de inóculo do vírus e da população do seu inseto vetor *Rhopalosiphum maidis* (Fernandes e Oliveira, 1997), agravando a importância da doença.

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, composto pelas espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*, e quatro espécies cultivadas (*S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*) (Daniels e Roach, 1987). As cultivares atuais de cana-de-açúcar derivaram de cruzamentos interespecíficos, utilizados no passado, entre duas espécies principais, *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Landell et al., 2007), realizados com a finalidade de introgradir genes que conferem resistência a pragas e doenças herdados, em geral, dos acessos de *S. spontaneum*; uma espécie considerada como selvagem (Daniels e Roach, 1987).

Silva et al. (2015a), em 43 acessos de cana-de-açúcar avaliados quanto a severidade de SCMV, encontraram que acessos de *S. barberi* e *S. spontaneum* foram os mais resistentes quando comparados com aqueles pertencentes a *S. officinarum* e *S. robustum*, considerados como os mais suscetíveis. Os acessos foram avaliados mediante escala diagramática de notas associada com diagnóstico serológico PTA-ELISA (*Plate-Trapped Antigen-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Segundo Koike e Gillaspie (1989), os clones de *S. barberi* e *S. robustum* são considerados moderadamente suscetíveis, enquanto *S. sinense* e *S. spontaneum*, são resistentes.

A caracterização de genótipos quanto à resistência às doenças constitui uma etapa de extrema importância para os programas de melhoramento genético, em especial para os de culturas poliplóides e de alta complexidade genética como a cana-de-açúcar, cujo desenvolvimento de linhagens endogâmicas é praticamente

inviável (Creste et al., 2014). Desta forma, a utilização de genitores sabidamente resistentes ou parcialmente resistentes, pode proporcionar o aumento na frequência de genótipos com alelos favoráveis nas famílias, uma vez que em cana-de-açúcar, a segregação para os caracteres desejados pode ser observada na primeira geração de cruzamento (Moura, 2004). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a resposta de um grupo de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. quanto à resistência ao SCMV, além de identificar a possível estirpe do vírus envolvida no processo de infecção dos genótipos avaliados.

2. Metodologia

2.1. Genótipos do género *Saccharum* spp.

Utilizou-se um grupo de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. composto por acessos de germoplasma básico de *Saccharum robustum*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*, clones e cultivares do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônômico (IAC), além de variedades procedentes dos Programas de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira - CTC e Rede Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético - RIDESA. Os genótipos apresentaram diferentes teores de Pol (%) e fibra (%), características que são importantes para o desenvolvimento de cultivares ricas em sacarose e cultivares de cana-energia, rica em fibras (Tabela 1).

2.2. Ensaio de campo

2.2.1. Estabelecimento de ensaio de campo

Em março de 2016, um viveiro de multiplicação foi instalado em uma área do Centro de Cana do Instituto Agrônômico (IAC), em Ribeirão Preto, São Paulo. Cada genótipo foi plantado em apenas uma linha de um metro de comprimento, intercalados com um metro de carreador entre cada genótipo. O espaçamento entre sulcos foi de 1,5 m.

A partir do viveiro de multiplicação foram produzidas mudas pré-brotadas (MPB) dos 98 genótipos para instalação do experimento a campo, em maio de 2017, localizado nas coordenadas geográficas: 47°52' 34,33" W e 21° 12'50,69" S e altitude 626 metros. Adotou-se o delineamento experimental em blocos completos ao acaso (DBCA) com três repetições, com parcela experimental constituída por três linhas de 1,0 m espaçadas 1,5 m. Cada linha da parcela recebeu duas MPB, espaçadas 0,5 m. O espaçamento entre parcelas diferentes foi de 2,0 m.

Tabela 1. Lista de genótipos, sua origem e genitores utilizados para o estudo da resposta à infecção pelo SCMV.

Id	Genótipo	A/B/C*	Genitor feminino	Genitor Masculino
1	US57-1415	C	<i>S. spontaneum</i>	-
2	CANA ALHO	A	<i>S. officinarum</i>	-
3	IACSP01-2410	A	R570	IAC87-3396
4	IACSP04-6007	A	PO88-62	CTC-9
5	IACSP04-6059	A	IACSP95-3018	SP96-3092
7	IACSP95-3028	B	IACSP95-3028	RB85-5156
8	NG57-12	A	<i>S. robustum</i>	-
9	IACSP042516	A	IAC91-2288	SP80-185
10	KRAKATAU	C	<i>S. spontaneum</i>	-
11	IN84-82	A	<i>S. spontaneum</i>	-
12	IACSP04-2508	A	SP91-3059	IACSP97-2077
13	IACSP95-5037	A	SP84-2066	IAC87-3396
14	IACCTC05-9630	A	IACSP97-2053	RB85-453
15	IACSP04-6053	A	IACSP95-6114	IACSP93-3046
16	IACSP99-3009	A	CP70-1133	SP83-2847
17	IS76-155	A	<i>S. officinarum</i>	-
18	IACSP01-2421	A	RB83-5486	SP77-5158
19	IACSP04-2521	A	IAC91-2288	SP96-3092
20	IACSP04-6058	A	IACSP95-3018	SP96-3092
21	IACSP99-1020	A	SP85-1682	SP80-185
22	IACSP04-5065	A	IACSP95-6114	IACSP95-3050
23	IACCTC06-9767	A	IACSP96-3069	IACSP95-2078
24	IACSP98-5046	A	SP81-3251	SP82-3697
25	IACSP01-8034	A	IAC91-3093	SP87-432
26	IACSP99-3357	A	SP92-1584	?
27	IACCTC05-9578	A	WHITETRANS	SP80-3280
28	IACCTC05-5580	A	CTC-4	IACSP93-3046
29	IACSP97-6628	A	RB83-5486	SELF
30	IACSP97-6680	A	SP84-2066	SP84-7017
31	IACCTC05-9534	A	IACSP95-3028	CT96-1414
32	IACSP97-2084	A	RB85-5035	SP80-185
33	CTC15	B	SP84-2025	?
34	IAC91-4168	A	SP81-3137	?
35	IACBIO232	A	RB85-5465	GLAGAH
36	IACBIO241	A	RB85-5465	GLAGAH
37	IACBIO257	A	NG26-011	?
38	IACBIO266	A	NG26-011	?
39	IACBIO-270	A	SES-069	?
40	IACBIO271	A	SES-069	?
41	IACBIO273	A	SES-069	?

42	IACBIO275	A	SES-069	?
43	IACBIO277	A	SES-069	?
44	IACBIO279	A	SES-069	?
45	IACCTC05-3616	A	IAC91-5155	CT96-1414
46	IACCTC05-6518	A	SP91-1049	CT93-1231
47	IACCTC05-9552	A	IACSP95-5011	CT96-1414
48	IACCTC05-9607	A	IACSP97-2053	SP88-721
49	IACCTC05-9634	A	IACSP97-2053	RB85-5453
50	IACCTC06-1050	A	CT94-3165	IAC91-1099
51	IACCTC06-9708	A	IACSP96-2042	CT01-4455
52	IACCTC06-9713	A	IACSP95-5000	CT96-1307
53	IACCTC06-9741	A	IACSP95-5000	RB72-454
54	IACSP01-2417	A	RB83-5486	SP77-5181
55	IACSP01-2430	A	IAC91-2195	SELF
56	IACSP01-5501	A	SP91-3059	CTC-957
57	IACSP01-5519	A	RB83-5486	SP77-5181
58	IACSP01-8046	A	R-570	IAC87-3396
59	IACSP01-8082	A	IAC91-3093	SP87-365
60	IACSP01-8158	A	RB83-5486	SP77-5181
61	IACSP02-2067	A	SP97-3060	SP70-1143
62	IACSP02-2125	A	SP90-1161	SP90-1644
63	IACSP02-3025	A	SP92-4230	SP88-813
64	IACSP02-3168	A	IAC91-4216	SP80-3280
65	IACSP04-2503	A	PO88-62	CTC-9
66	IACSP04-2504	A	IACSP95-5037	?
67	IACSP04-2509	A	SP91-3059	IACSP97-3391
68	IACSP04-2510	A	IAC91-3093	CTC-9638
69	IACSP04-3123	A	IACSP95-3028	SP83-2847
70	IACSP04-3148	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
71	IACSP04-3150	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
72	IACSP04-3259	A	IACSP96-6026	RB85-5453
73	IACSP04-5081	A	IACSP96-6026	RB85-5453
74	IACSP04-6032	A	IACSP95-3028	SP77-5181
75	IACSP04-6035	A	SP91-3059	IACSP96-6026
76	IACSP04-6073	A	IACSP95-3028	SP92-4221
77	IACSP04-6077	A	IACSP97-2109	IACSP95-6114
78	IACSP04-6152	A	IAC91-1099	SP93-1124
79	IACSP93-3046	B	SP79-1011	?
80	IACSP95-3018	A	SP84-2189	SP80-1842
81	IACSP95-6114	A	IAC87-3187	CTC-9019
82	IACSP96-2008	A	SP80-144	?
83	IACSP96-3056	A	SP82-6108	?
84	IACSP96-3069	A	SP80-3280	?
85	IACSP96-3076	A	SP84-7017	?

86	IACSP97-3384	A	RB85-5113	RB85-5453
87	IACSP97-4039	A	RB83-5486	RB85-5453
88	IACSP97-4048	A	SP84-2066	IAC86-3154
89	IACSP98-2053	A	SP84-7017	SP80-1842
90	IACSP98-3011	A	IAC91-3093	SP82-3530
91	IACSP99-3369	A	SP90-1616	?
92	IACSP99-4011	A	SP84-2025	RB85-5113
93	IJ76-293	A	<i>S. robustum</i>	-
94	IN84-58	A	<i>S. spontaneum</i>	-
95	IN84-88	A	<i>S. spontaneum</i>	-
96	NG57-213	A	?	?
98	RB93-5744	B	RB83-5089	RB76-5418
100	SP83-2847	B	HJ57-41	SP70-1143
101	SP71-6163	B		

?=Policruzamento. *A= clone IAC; B= Cultivar comercial, C=especie.

2.2.2. Avaliação da severidade do SCMV

A severidade do mosaico da cana de açúcar foi avaliada utilizando uma escala de notas elaborada a partir de folhas coletadas dos genótipos do mesmo ensaio a campo em DBCA, cobrindo toda a amplitude de sintomas presente no ensaio, desde folhas sem sintomas até folhas com sintomas muito expressos (Figura 1). As folhas avaliadas foram as chamadas TVD0 (*Top Visible Dewlap 0*) TVD1, TVD2 e TVD3, sendo que TVD1, refere-se à primeira folha com o "*dewlap*" visível. As leituras dos sintomas foram feitas mensalmente, a partir do mês de dezembro de 2017, aos sete meses após o plantio, realizando um total de três avaliações. Em cada uma das avaliações, participaram três avaliadores diferentes com o intuito de reduzir o erro experimental nas leituras.

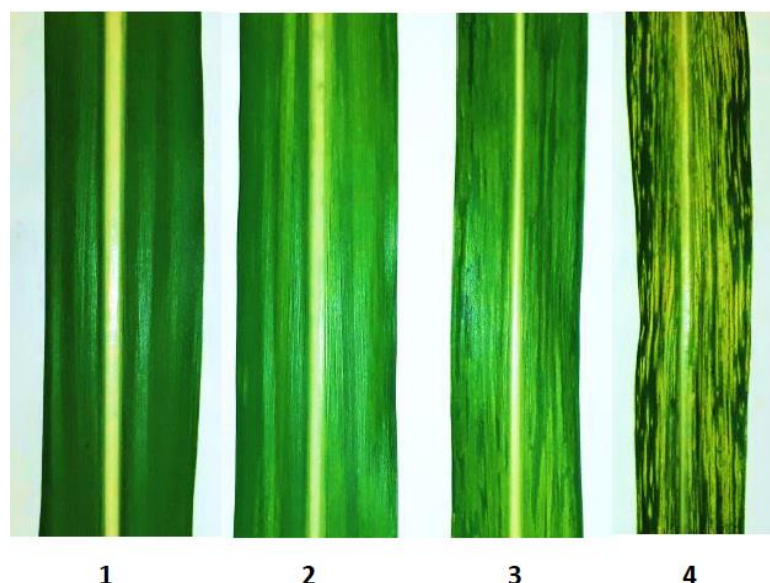


Figura 1. Escala diagramática de notas para avaliação de SCMV em condições de campo. (1) folha verde sem sintomas; (2) poucas áreas com alternância de cor verde claro e de verde normal; (3) acentuada expressão verde claro amarelado com verde normal; e (4) extensa área com verde claro-amarelado e áreas verde escuras acompanhadas de distorção das folhas.

2.2.3. Análise de dados

Os dados de severidade do SCMV foram submetidos a análise de variância (teste F) usando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013) mediante o procedimento Proc GLM, e a comparação de medias feita utilizando o teste LSD ($p < 0,05$) segundo o modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + B_j + G_i + E_{ij}$, onde Y_{ij} = observação de i ésimo genótipo no j ésimo bloco, μ = media geral, B_j = efeito do j ésimo bloco, G_i = efeito do i ésimo genótipo, e E_{ij} = erro médio experimental. Os dados são apresentados como médias das notas dos sintomas e foram transformados mediante $\ln(x + 5)$.

A partir dos dados e assumindo o efeito aleatório dos genótipos no modelo misto, estimou-se a variância genética (σ_G^2) e a variância ambiental (σ_E^2). A herdabilidade em sentido amplo (h^2) foi estimada utilizando os componentes da variância, segundo a equação: $h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_E^2)$. Adicionalmente, os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para determinar a correspondência entre as folhas avaliadas TVD0, TVD1, TVD2 e TVD3.

2.3. Identificação da estirpe de SCMV predominante no grupo de genótipos avaliados

O tecido foliar de plantas apresentando diferentes sintomas de severidade ao mosaico, incluindo as coletadas para avaliação da severidade dos sintomas, foi utilizada para determinar a estirpe predominante do vírus. Para tanto, um fragmento de 888 pares de bases (pb), obtido pela amplificação da sequência de DNA que codifica para a CP do SCMV, foi avaliada quanto ao polimorfismo, obtido após digestão com enzima de restrição e sequenciamento conforme descrito a seguir.

2.3.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA da folha TVD0 foi feita utilizando o reagente Trizol conforme instruções do fabricante, seguida de limpeza com clorofórmio e etanol. O pellet obtido foi resuspendido em 25 µL de água DEPC (Diethyl Pirocarbonato) e sua concentração foi obtida via NanoDrop.

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o Kit *GoScript™ Reverse Transcription System* da PROMEGA, a partir de 1 µg de RNA em um volume final de 11 µL contendo 0,5 µg do primer Oligo (dT)₁₅. A reação foi mantida a 70°C por 5 minutos e resfriada em gelo por mais 5 minutos.

A seguir foram adicionados 9,0 µL do mix de transcrição reversa composto pelo tampão *GoScript* 5X, 2,5mM MgCl₂; 0,5 mM dNTPs, 20 U de inibidor de ribonucleases e 1 µL de *GoScript™ Reverse Transcriptase* completando um volume final de 20,0 µL. As amostras foram levadas para o termociclador e mantidas a 25°C por 5 minutos, seguido de 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C.

2.3.2. Amplificação por RT-PCR da sequência que codifica para a CP do SCMV

A PCR foi conduzida em um volume final de 20 µL, contendo 1 mM de dNTPs; 0,2 U de Taq DNA Polimerase; tampão 1,0X (20 mM Tris e 50 mM KCl₂); 1,25 mM de MgCl₂, 2,5 µL de cDNA (1:1) e 2,0 µM dos oligonucleotídeos SMVF4 (GTTTTYCACCAAGCTGGAACAGTC) e SMVR3

(AGCTGTGTGTCTCTCTGTATTCTC). As condições de amplificação em termociclador foram: um passo de desnaturação à temperatura inicial de 94° C por 3 min seguida de 35 ciclos composto por uma desnaturação a 94° C por 1 min, temperatura de anelamento a 54° C por 2 min e extensão a 72° C por 3 min, seguido de um ciclo de extensão final a 72° C por 10 min. Alíquotas de 10 µL dos produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio.

O produto referente ao fragmento amplificado de 888 pb foi purificado utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) segundo instruções do fabricante. Um volume total de 40 µL do fragmento foi obtido após limpeza e sua concentração foi estimada via NanoDrop.

2.3.3. Digestão e sequenciamento do fragmento amplificado de 888pb referente à sequência que codifica para a CP do SCMV

Após a purificação, o fragmento amplificado por RT-PCR foi submetido a digestão separadamente com as enzimas de restrição HpaI e DraI. As reações de digestão foram conduzidas em um volume final de 25 µL contendo 10 µL do produto amplificado e 0,2 U das enzimas de restrição em dois tubos de reação diferentes (um tubo para cada enzima). Para permitir a atividade das enzimas, a reação foi mantida a 37°C por duas horas em termociclador e os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

O fragmento de 888 pb purificado pelo kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* foi submetido a sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), mediante o uso do sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, California) pelo método de Sanger. As sequências corresponderam às amostras extraídas de plantas dos genótipos de cana-de-açúcar identificados como: IACSP93-3046 (amost_17), IACSP98-3011 (amost_9), IS76-155 (amost_1) e IACSP96-3076 (amost_8).

Cada uma das sequências de nucleotídeos foram analisadas com o software “Bio Edit - Sequence Alignment Editor” (Hall, 1999), sendo alinhadas com as sequências do capsídeo das estirpes argentinas SGC, JUJ-4A, JUJ-AB, TUC-1,

SAL-9A, ARG-345, SAL-1N e SAL-1O e as estirpes identificadas no Brasil: RIB-1, JAU1 e PIR-2; utilizando o software MEGA 6, o qual também foi utilizado para a construção do árvore filogenética. As sequências das estirpes foram obtidas a partir do GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências de DNA que codificam para a CP do SCMV das estirpes denominadas RIB1, PIR2 e JAU1 encontram-se depositadas no "GenBank" respectivamente, sob os números de acesso AY819716, AY819718 e AY819717 (Gonçalves et al., 2007).

3. Resultados e discussão

3.1. Componentes da variância

Os componentes da variância estimados a partir das notas dos sintomas de mosaico em condições de campo são apresentados na Tabela 2. A herdabilidade (h^2) da resistência ao SCMV em sentido amplo para o painel de 98 genótipos foi de 62,49 %. De acordo com tais dados, constata-se que grande parte da variância fenotípica é causada pela uma variância genética (σ_G^2), sendo pouco afetados pela variância ambiental (σ_E^2). Os parâmetros genéticos foram estimados a partir da avaliação feita no mês de janeiro de 2018 (oito meses após o plantio) com os dados obtidos a partir da avaliação da folha TVD0, quando os sintomas de mosaico foram muito expressivos.

Os resultados da análise de variância evidenciam diferenças significativas entre os genótipos quanto a resposta ao SCMV, demonstrando que existe variabilidade genética para esta característica no painel estudado. Essa diversidade pode ser causada pela presença de genomas diversos dos parentais dos genótipos do painel, provenientes das espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum*.

Tabela 2. Resultados da análise de variância (ANOVA) procedente de avaliações quanto à severidade da infecção do *Sugarcane mosaic virus*, SCMV em genótipos de cana-de-açúcar, feita oito meses após plantio (janeiro de 2018).

Fuente de variação	GL	QM	Variância Genética σ_G^2	Variância Ambiental σ_E^2	Herdabilidade ao nível de parcela h^2
Blocos	2	0,004592 ^{ns}	0,009296	0,005579	62,49%
Genótipos	97	0,033466**			
Resíduos	194	0,005579			
CV (%)	4,05				

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; CV: coeficiente de variação. **p<0,01. Os resultados apresentados foram calculados a partir de dados transformados em $\ln(x+5)$. ns: não significativo.

Estes resultados são similares aos obtidos por Silva et al. (2015b); relatando herdabilidade em sentido amplo, na ordem de 62,17% ao nível de médias, a partir de dados de análises de variância em estudos de resistência a SCMV em genótipos brasileiros de cana-de-açúcar. Em estudos preliminares realizados por Pinto et al.

(2013) em uma população derivada de um cruzamento bi-parental foi observado herdabilidade em sentido amplo de 85%. Os autores sugerem que valores altos de herdabilidade permitem realizar seleção visual com sucesso de clones resistentes, dada à baixa influência ambiental para esse caráter.

Em estudos realizados por Xia et al. (1999), foi constatado uma alta herdabilidade, de 77 a 94%, obtidos a partir de notas de severidade em populações de milho, avaliadas para resistência a SCMV. Dos 15 QTL (*Quantitative Trait Loci*) encontrados, somente dois foram considerados como principais, gerando a maior variância fenotípica observada, 70 a 77%, o que poderia se considerar que a resistência ao mosaico é do tipo oligogênica.

A herança qualitativa sugere que as cultivares categorizadas como resistentes possuam os mecanismos para evitar as infecções do isolado SCMV-RIB-1, aparentemente a única estirpe de SCMV que prevalece na região canavieira do estado de São Paulo, Brasil (Gonçalves et al., 2007). No entanto, essa resistência pode ser quebrada facilmente ante a presença de novas estirpes do vírus, gerando a necessidade de novas fontes de resistência.

3.2. Severidade do SCMV em condições de ensaio de campo

Em condições de campo, de um total de 98 genótipos avaliados, 26 (26,53 % de incidência) apresentaram sintomas de SCMV (Figura 2), sendo agrupados em genótipos moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis. Os restantes 72 genótipos não registraram sintoma, sendo categorizados como resistentes (Figura 3). A mais alta incidência e severidade de sintomas do vírus do mosaico foram registradas no oitavo e nono mês (janeiro e fevereiro de 2018) após o plantio, e a folha que apresentou sintomas mais expressos foi a TVD0. Considerando o mês de janeiro o de maior expressividade dos sintomas, foram utilizados os dados de severidade registrados nesse mês para realizar as análises estatísticas. As correlações entre as folhas TVD0, TVD1, TVD2 e TVD3 foram positivas e altas ($p < 0,0001$), sendo levemente maiores entre TVD1 e TVD2 ($r = 0,99$).

A escala de notas utilizada permitiu medir a severidade do SCMV nos genótipos estudados e categorizá-los segundo seu grau de resistência ou

susceptibilidade. A escala de notas foi similar à utilizada com sucesso por Pinto et al. (2013) para avaliar 55 genótipos procedentes do cruzamento bi-parental entre IACSP93-3046 x IACSP95-3018. A escala usada pelos pesquisadores estava composta por notas de 0 até 3.

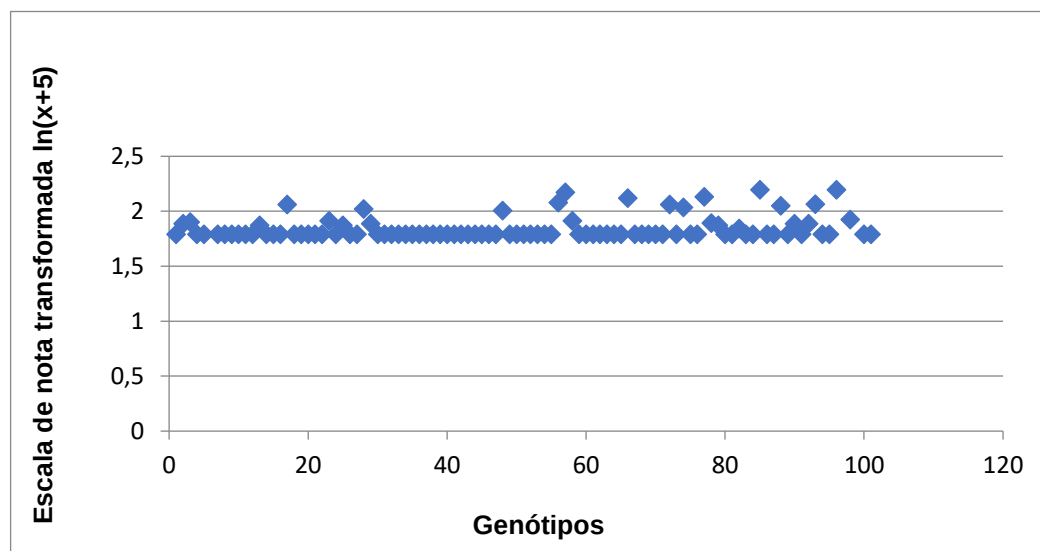


Figura 2. Dados relativos à incidência de SCMV em 98 genótipos do género *Saccharum* spp. no ensaio a campo em DBCA, avaliados no mês de janeiro/2018 (oito meses após plantio), tomando-se como referência a folha TVD0. A abscissa representa o número do genótipo (1 a 98) e a ordenada $\ln$ (nota de severidade+5). A ordenada $1,79176 = \ln(1+5)$ corresponde à ausência de sintomas.

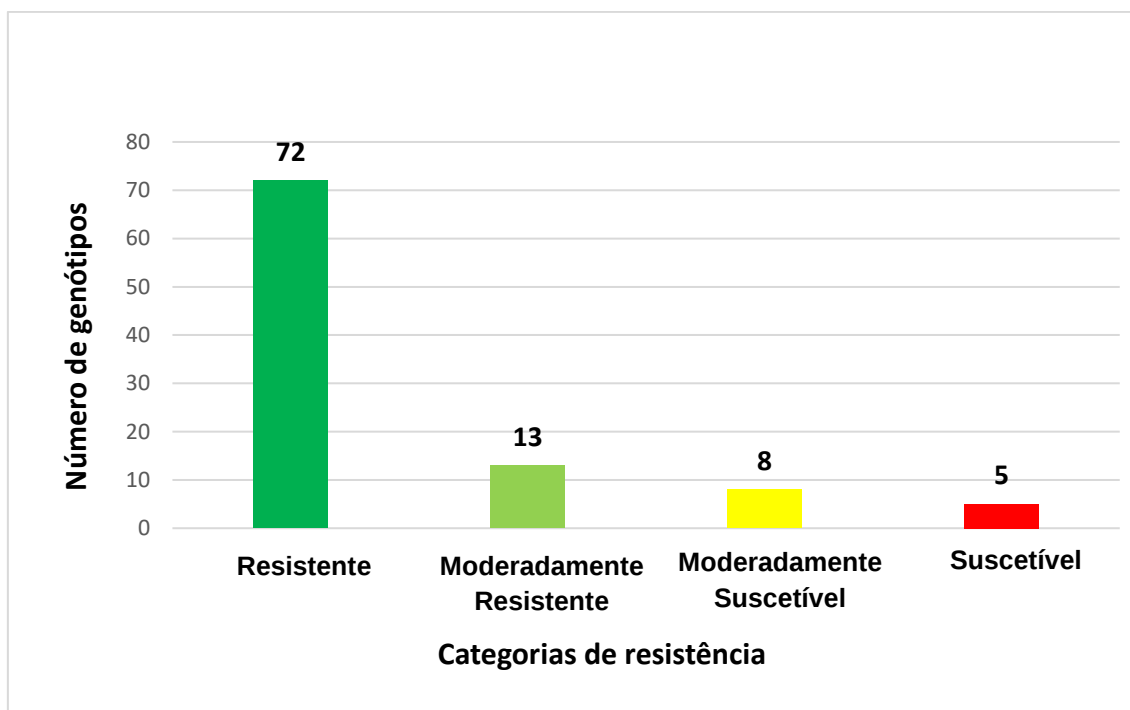


Figura 3. Distribuição da resposta de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. à infecção do SCMV em ensaio a campo em DBCA, avaliados na folha TVD0 mediante escala de notas aos oito meses após plantio.

Os genótipos considerados suscetíveis por apresentar média de notas alta (nota 3,1 – 4,0) foram os genótipos IACSP04-2504, IACSP04-6077, IACSP01-5519, IACSP96-3076 e NG57-213 (Tabela 3).

Os genótipos IACCTC05-9607, IACCTC05-5580, IACSP04-6032, IACSP97-4048, IS76-155, IACSP04-3259, IJ76-293 e IACSP01-5501 foram definidos como moderadamente suscetíveis para a doença por apresentar notas entre 2,1 até 3,0. Segundo o teste LSD (<0.05), outros 13 genótipos que apresentaram notas entre 1,1 e 2,0 foram considerados como moderadamente resistentes: IACSP96-2008, IACSP95-5037, IACSP01-8034, IACSP93-3046, CANA ALHO, IACSP97-6628, IACSP98-3011, IACSP99-4011, IACSP04-6152, IACSP01-2410, IACCTC06-9767, IACSP01-8046 e RB93-5744 (Tabela 3).

Os demais 72 genótipos, apresentaram-se como resistentes ao SCMV, sem sintomas (nota 1,0). Os genótipos que apresentaram essas condições foram os seguintes: US57-1415, IACSP04-6007, IACSP04-6059, IACSP95-3028, NG57-12, IACSP04-2516, KRAKATAU, IN84-82, IACSP04-2508, IACCTC05-9630, IACSP04-6053, IACSP99-3009, IACSP01-2421, IACSP04-2521, IACSP04-6058, IACSP99-

1020, IACSP04-5065, IACSP98-5046, IACSP99-3357, IACCTC05-9578, IACSP97-6680, IACCTC05-9534, IACSP97-2084, CTC15, IAC91-4168, IACBIO232, IACBIO241, IACBIO257, IACBIO266, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277, IACBIO279, IACCTC05-3616, IACCTC05-6518, IACCTC05-9552, IACCTC05-9634, IACCTC06-1050, IACCTC06-9708, IACCTC06-9713, IACCTC06-9741, IACSP01-2417, IACSP01-2430, IACSP01-8082, IACSP01-8158, IACSP02-2067, IACSP02-2125, IACSP02-3025, IACSP02-3168, IACSP04-2503, IACSP04-2509, IACSP04-2510, IACSP04-3123, IACSP04-3148, IACSP04-3150, IACSP04-5081, IACSP04-6035, IACSP04-6073, IACSP95-3018, IACSP95-6114, IACSP96-3056, IACSP96-3069, IACSP97-3384, IACSP97-4039, IACSP98-2053, IACSP99-3369, IN84-58, IN84-88, SP83-2847 e SP71-6163 (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios da severidade do *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) apresentada no ensaio em DBCA, em genótipos do gênero *Saccharum* spp. avaliados no mês de janeiro de 2018 (oito meses após plantio) na folha TVD0.

Genótipo	Média TVD0	ln (Média TVD0+5)	Classe de resistência	Teste t (LSD)
US57-1415	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6007	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6059	1,00	1,79	R	i
IACSP95-3028	1,00	1,79	R	i
NG57-12	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2516	1,00	1,79	R	i
KRAKATAU	1,00	1,79	R	i
IN84-82	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2508	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-9630	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6053	1,00	1,79	R	i
IACSP99-3009	1,00	1,79	R	i
IACSP01-2421	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2521	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6058	1,00	1,79	R	i
IACSP99-1020	1,00	1,79	R	i
IACSP04-5065	1,00	1,79	R	i
IACSP98-5046	1,00	1,79	R	i
IACSP99-3357	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-9578	1,00	1,79	R	i
IACSP97-6680	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-9534	1,00	1,79	R	i
IACSP97-2084	1,00	1,79	R	i
CTC15	1,00	1,79	R	i
IAC91-4168	1,00	1,79	R	i
IACBIO232	1,00	1,79	R	i
IACBIO241	1,00	1,79	R	i
IACBIO257	1,00	1,79	R	i
IACBIO266	1,00	1,79	R	i
IACBIO270	1,00	1,79	R	i
IACBIO271	1,00	1,79	R	i
IACBIO273	1,00	1,79	R	i
IACBIO275	1,00	1,79	R	i
IACBIO277	1,00	1,79	R	i
IACBIO279	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-3616	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-6518	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-9552	1,00	1,79	R	i
IACCTC05-9634	1,00	1,79	R	i

IACCTC06-1050	1,00	1,79	R	i
IACCTC06-9708	1,00	1,79	R	i
IACCTC06-9713	1,00	1,79	R	i
IACCTC06-9741	1,00	1,79	R	i
IACSP01-2417	1,00	1,79	R	i
IACSP01-2430	1,00	1,79	R	i
IACSP01-8082	1,00	1,79	R	i
IACSP01-8158	1,00	1,79	R	i
IACSP02-2067	1,00	1,79	R	i
IACSP02-2125	1,00	1,79	R	i
IACSP02-3025	1,00	1,79	R	i
IACSP02-3168	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2503	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2509	1,00	1,79	R	i
IACSP04-2510	1,00	1,79	R	i
IACSP04-3123	1,00	1,79	R	i
IACSP04-3148	1,00	1,79	R	i
IACSP04-3150	1,00	1,79	R	i
IACSP04-5081	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6035	1,00	1,79	R	i
IACSP04-6073	1,00	1,79	R	i
IACSP95-3018	1,00	1,79	R	i
IACSP95-6114	1,00	1,79	R	i
IACSP96-3056	1,00	1,79	R	i
IACSP96-3069	1,00	1,79	R	i
IACSP97-3384	1,00	1,79	R	i
IACSP97-4039	1,00	1,79	R	i
IACSP98-2053	1,00	1,79	R	i
IACSP99-3369	1,00	1,79	R	i
IN84-58	1,00	1,79	R	i
IN84-88	1,00	1,79	R	i
SP83-2847	1,00	1,79	R	i
SP71-6163	1,00	1,79	R	i
IACSP96-2008	1,33	1,84	MR	hi
IACSP95-5037	1,56	1,87	MR	hi
IACSP01-8034	1,56	1,87	MR	hi
IACSP93-3046	1,56	1,87	MR	hi
CANA ALHO	1,67	1,89	MR	g-i
IACSP97-6628	1,67	1,89	MR	g-i
IACSP98-3011	1,67	1,89	MR	g-i
IACSP99-4011	1,67	1,89	MR	g-i
IACSP04-6152	1,67	1,89	MR	g-i
IACSP01-2410	1,78	1,90	MR	f-i
IACCTC069767	1,89	1,91	MR	f-h

IACSP01-8046	1,89	1,91	MR	f-h
RB93-5744	2,00	1,93	MR	e-h
IACCTC05-9607	2,44	2,01	MS	d-g
IACCTC05-5580	2,56	2,02	MS	c-f
IACSP04-6032	2,67	2,03	MS	c-e
IACSP97-4048	2,89	2,05	MS	cd
IS76-155	3,00	2,06	MS	b-d
IACSP04-3259	3,00	2,06	MS	b-d
IJ76-293	3,00	2,07	MS	b-d
IACSP01-5501	3,00	2,08	MS	a-d
IACSP04-2504	3,33	2,12	S	a-d
IACSP04-6077	3,44	2,13	S	a-c
IACSP01-5519	3,78	2,17	S	ab
IACSP96-3076	4,00	2,20	S	a
NG57-213	4,00	2,20	S	a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de $p < 0,05$. MédiaTVD0=Médias de notas de severidade avaliadas na folha TVD0. $\ln(\text{MédiaTVD0}+5)$ =dados transformados para $\ln(x+5)$. Classe de resistência: R (resistente), MR (moderadamente resistente), MS (moderadamente suscetível) e S (suscetível).

A cultivar IACSP93-3046, considerada como resistente por Pinto et al. (2013), exibiu leves sintomas da doença em alguns dos blocos do ensaio, sendo categorizada neste trabalho como moderadamente resistente, além de apresentar resultado positivo pelo RT-PCR, o que pode ser considerado como o início da quebra da resistência da cultivar. A mesma cultivar foi estudada por Silva et al. (2015b), reportando-a sem sintomas em condições de casa de vegetação e negativa para o teste PTA-ELISA, porém com sintomas permanentes em condições de campo, categorizando-a como suscetível para SCMV.

Trabalhos realizados por Silva et al. (2015a), evidenciaram com PTA-ELISA e avaliações em campo com escala diagramática de notas, a susceptibilidade dos acessos de *S. officinarum*, encontrando-se NG57-213, como um dos mais suscetíveis dentro dos genótipos avaliados. Por outro lado, os acessos US57-1415 de *S. robustum*; KRAKATAU, IN84-58, IN84-88 e IN84-82 de *S. spontaneum*; apresentaram-se livres do SCMV, podendo ser fontes de resistência ao vírus e confirmando os resultados obtidos neste trabalho para os genótipos KRAKATAU, IN84-58, IN84-88, também reportados como resistentes, e NG57-213 como suscetível.

Outros genótipos, como os do grupo IACBIO, foram reportados resistentes, sendo que os genitores foram os genótipos SES-069, NG26-011, RB85-5465 e GLAGAH, originários de *S. spontaneum* e inicialmente utilizados em cruzamentos para produção de cana com perfil de bioenergia (Alvim et al., 2015). Destaca-se também o genótipo IJ76-293, cujo genitor feminino é *S. robustum*, apresentando altas notas de severidade, confirmando a susceptibilidade dos clones de *S. robustum* reportada também por Koike e Gillaspie (1989).

É notória a contribuição do genoma de *S. spontaneum* nos genótipos reportados como resistentes neste trabalho, podendo ser a principal fonte de resistência ao SCMV. A partir dos resultados fornecidos, foi possível identificar genótipos que podem servir como fonte de resistência ao vírus do mosaico, tendo potencial para serem utilizados em cruzamentos com outros genótipos que apresentem boas características agronômicas.

3.3. Identificação da estirpe de SCMV

Os pares de primers SMVF4 e SMVR3 amplificaram o fragmento de 888 pb referente à região que codifica para a CP do SCMV nos genótipos apresentando diferentes sintomas de severidade ao mosaico, comprovando a presença do SCMV nas amostras avaliadas no gel de agarose a 1,2% (Figura 4). Em todas as amostras foi observado o produto de amplificação de 888 pb, mostrando-se positivas para o vírus do mosaico, exceto a amostra do controle negativo (coluna 6, Figura 4).

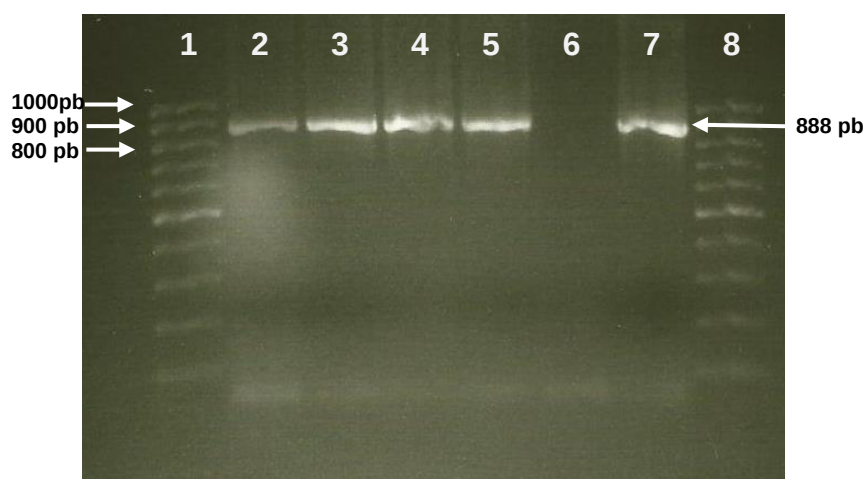


Figura 4. Gel de agarose a 1,2% dos produtos de RT-PCR para a detecção de SCMV. Observa-se o fragmento amplificado de 888 pb que corresponde à sequência de DNA que codifica para a síntese da CP do SCMV, utilizando os pares de primers SMVF4 e SMVR3. Colunas 1 e 8 representam o marcador de peso molecular de DNA de 100 pb, colunas 2-3 representam as amostras dos genótipos IACSP93-3046 e IACSP96-3076; colunas 4 e 5 representam isolados conhecidos de SCMV (RIB1 e PIR2); colunas 6 e 7, controle negativo e positivo.

A digestão do fragmento amplificado de 888 pb com a enzima de restrição HpaI revelou a presença de duas marcas, as quais não apresentaram polimorfismo entre as amostras avaliadas. Por outro lado, o tratamento com a enzima DraI não resultou em digestão do fragmento de 888pb (Figura 5). O padrão de digestão obtido corrobora com o observado por Gonçalves et al. (2011) em isolados de mosaico da cana-de-açúcar.

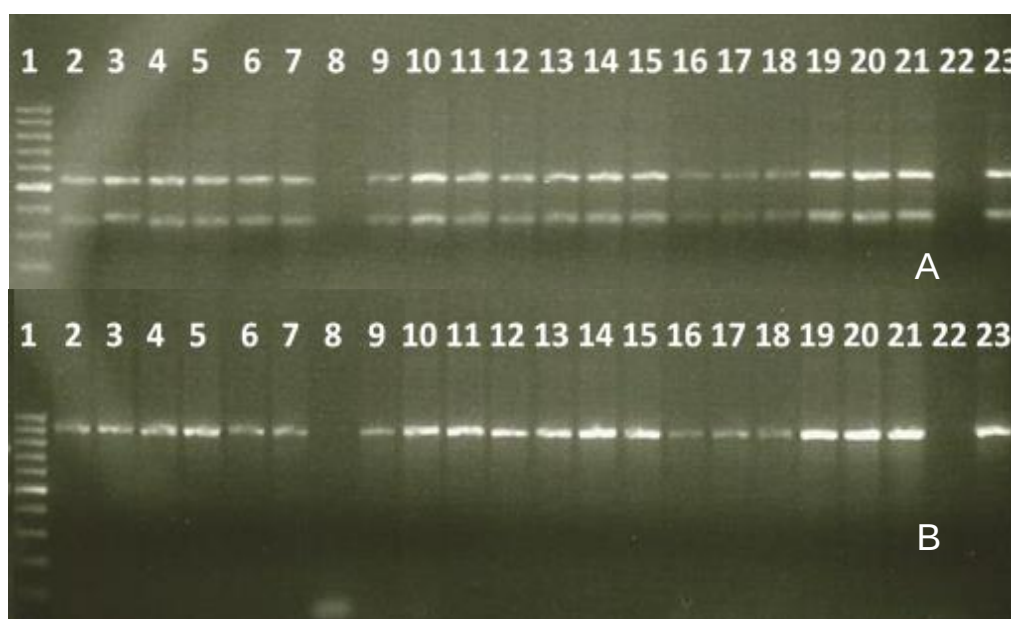


Figura 5. Gel de agarose a 1,5% obtido após digestão do fragmento de 888pb com as enzimas de restrição HpaI (A) e DraI (B). Coluna 1: marcador de peso molecular de DNA de 100bp, colunas 2 a 15, e 18 - 19: amostras de cana-de-açúcar com diferentes sintomas de SCMV, colunas 16, 17, 20 e 21: isolados conhecidos de SCMV (RIB1 e PIR2). Colunas 22 e 23: controles negativo e positivo.

O alinhamento das sequências do fragmento de 888 pb referente às respectivas escalas de sintoma de severidade do mosaico revelaram o agrupamento das sequências com os isolados já conhecidos RIB-1, PIR-2 e JAU-1, apresentando uma porcentagem de identidade entre 97 e 99%.

A árvore filogenética obtida com base nas sequências das estirpes brasileiras, bem como das sequências obtidas do NCBI de isolados de SCMV presentes em zonas canavieiras da Argentina (SGC, JUJ-4A, JUJ-AB, TUC-1, SAL-9A, ARG-345, SAL-1N e SAL-1O) é apresentada na Figura 6. O alinhamento das sequências das respectivas notas da escala de sintomas de mosaico junto com os isolados descritos acima, permitiu inferir qual estirpe predomina no ensaio avaliado, uma vez que, para o mosaico, as mudas utilizadas no ensaio não foram pré-inoculadas com nenhuma estirpe, sendo por tanto, a infecção, natural.

Pela alta porcentagem de identidade com o isolado RIB-1, poderia se tratar da mesma estirpe, confirmando que esta é uma das variantes do SCMV que predomina nos canaviais do estado de São Paulo (Gonçalves et al., 2012).

A expressão de sintomas diferenciais de mosaico dentro do grupo de genótipos para avaliar a resistência e susceptibilidade, poderia não ser atribuída a presença de estirpes diferentes do vírus, mas sim a respostas diferentes dos genótipos susceptíveis à mesma estirpe do SCMV.

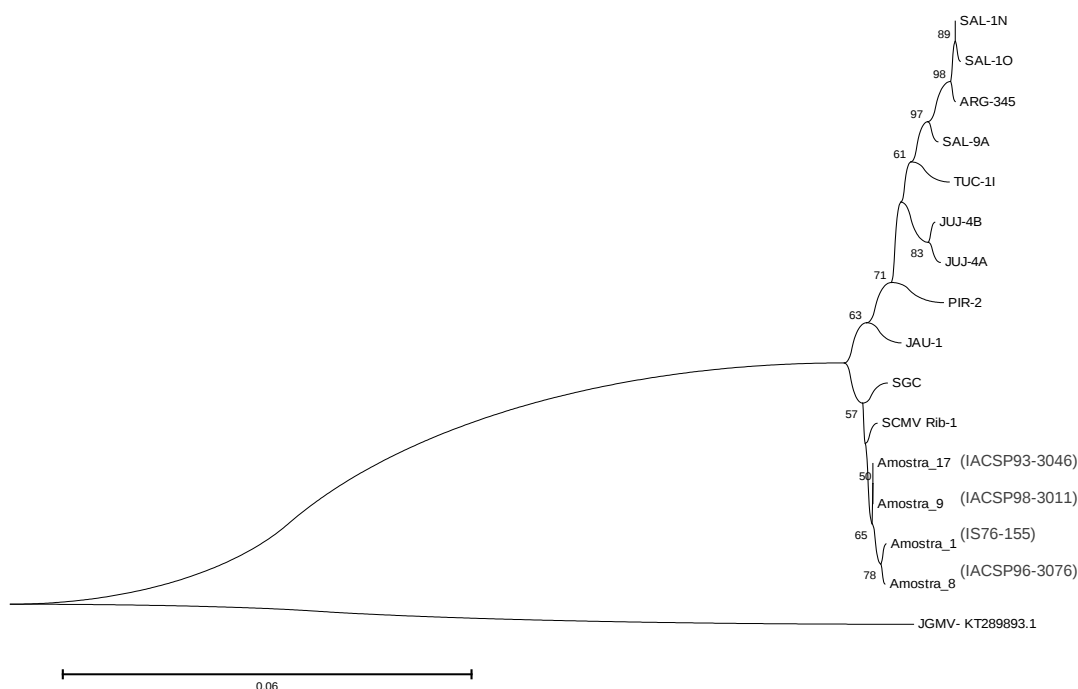


Figura 6. Análise filogenética por Neighborjoining construído em MEGA 6 de isolados brasileiros, isolados argentinos e quatro sequencias obtidas a partir de genótipos de cana-de-açúcar com expressão de sintomas diferenciais de SCMV. A otimização da árvore com a soma do comprimento do ramo = 0,31156964 é mostrada. A porcentagem de réplicas em que a taxa associada agrupada no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) é apresentada ao lado das ramificações. A árvore é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composta e estão nas unidades do número de substituições de base por sitio. O isolado brasileiro do *Johnson grass mosaic virus* (JGMV) (KT2893.1) foi usado como um grupo externo.

Os isolados de SCMV podem ser filogeneticamente agrupados tanto por sua origem geográfica ou hospedeiro de origem, sugerindo que o vírus evoluiu segundo seleção do hospedeiro e localidade geográfica (Alegria et al., 2003). Todavia, Gemechu et al. (2006), reportaram que a distribuição do SCMV parece ser mais relacionada ao hospedeiro do que à sua origem geográfica.

Xu et al. (2008), com base na sequência de nucleotídeos codificantes da CP encontraram identidade de 92% entre os isolados brasileiros. No entanto, a mesma pesquisa relatou uma identidade mais baixa (82%) quando foram comparadas as estirpes RIB-1 e JAU-1 com as estirpes classificadas pelos autores como brasileiras (*Brazilian Group*). Os isolados RIB-1 e JAU-1, ficaram dentro do grupo denominado *SCE* (estirpes isoladas de hospedeiros do gênero *Saccharum*), mas não dentro do *Brazilian Group*. Já a identidade dentro do mesmo grupo *SCE* foi de 95%. Perera et al. (2009), detectaram alta frequência de coinfeção por SCMV e SrMV em Tucumán, na Argentina e infecções mistas entre SCMV e o SCSMV foram reportadas por Akbar et al. (2017) em coleções de cana-de-açúcar do Paquistão. Entretanto, misturas de estirpes poderiam ser instáveis, chegando a ser uma delas dominante, sendo inabitual a infecção conjunta com vírus relacionados (Koike e Gillaspie, 1989). No entanto, pode ocorrer em algumas espécies de plantas propagadas vegetativamente (Chen et al., 2001). Essa alta coinfeção pode ser o resultado da presença de diferentes genótipos de cana-de-açúcar numa mesma área, similar às condições de nosso ensaio. Outras causas para a existência da coinfeção podem ser as condições agroecológicas e a incidência da população de vetores.

Novos trabalhos complementares devem ser desenvolvidos com o intuito de descobrir possíveis novas estirpes presentes nos canaviais brasileiros e as eventuais quebras de resistência geradas por essas novas estirpes. Como já foi discutido anteriormente, a herança da resistência ao SCMV é governada por poucos genes (qualitativa), o que pressupõe que esses possam mostrar-se ineficazes, uma vez que, existam mutações nas estirpes ou a introdução de novas estirpes nos canaviais locais.

A geração de cultivares resistentes continua sendo a alternativa mais adequada para o controle do SCMV, complementando com o *roguing* ainda que tal alternativa seja pouco prática em campos comerciais, dada a extensão dos campos da cultura (Gonçalves et al., 2007). Por outro lado, é importante destacar a importância do controle dos afídeos vetores *R. maidis*, que ocorrem não somente nos canaviais, mas também nos campos de milho em larga escala (Xu et al., 2008),

que na maioria dos casos, são plantados ao mesmo tempo com as culturas de cana-de-açúcar.

4. Conclusões

Neste trabalho foi possível a discriminação dos genótipos em resistentes e suscetíveis ao SCMV utilizando uma escala diagramática de notas para avaliar a severidade do vírus em condições de campo. Foi registrado um total de 72 genótipos como resistentes à doença, sendo que a principal fonte de resistência poderia estar presente no genoma de *Saccharum spontaneum*. Determinou-se que existe alta probabilidade de que a infecção causada nos materiais suscetíveis do painel é a estirpe SCMV-RIB1, a qual predomina nos canaviais da zona de Ribeirão Preto - São Paulo. Embora a herdabilidade calculada (62,49%) é particular para o grupo dos 98 genótipos estudados, estima-se que grande parte da variação fenotípica é devida a variância genotípica, o que permite uma boa acurácia nas observações de campo, especialmente na seleção de clones resistentes nos programas de melhoramento.

5. Referências.

Alvim KR de T (2015) Seleção de progênes de cruzamentos entre *Saccharum spontaneum* e cana-de-açúcar para produção de bioenergia. 55 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – UNESP, Jaboticabal.

Adams MJ, Zerbini FM, French R, Rabenstein F, Stenger DC, Valkonen JPT (2011) 9th Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses. In: King, AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ and Carstens EB (Eds.) **Virus Taxonomy**. Elsevier; Academic Press; San Diego, p. 1069–1089.

Akbar S, Tahir M, Afghan S (2017) Characterization of coat protein (CP) gene of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) from isolates of pakistan and its phylogenetic relationships. **The Journal of Animal & Plant Sciences** 27(1): 268-276.

Alegria OM, Royer M, Bousalem M, Chatenet M, Peterschmitt M, Girard J-C, Rott P (2003) Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six *Sugarcane mosaic virus* isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. **Arch Virol** 148: 357–372.

Chen J, Chen J, Adams MJ (2001) Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. **Arch. Virol** 146: 1841-1853.

Comstock JC, Lentini RS (2005) Sugarcane Mosaic Virus Disease. SS-AGR-209. Florida Sugarcane Handbook, an electronic publication of the Agronomy Departament. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/sc009>. Acesso em: 21 jan. 2019.

Creste S, Pinto LR, Xavier MA, Landell MGA (2014) The importance of the germplasm in developing agro-energetic profile sugarcane cultivars. In: Cortez LAB (Coord.). **Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability**, São Paulo: Editora Edgard Blücher, p.353-358.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. (Eds.) **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam, p.7-84.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (2005) **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London. Academic Press. 1162 p.

Fernandes FT, Oliveira E de (1997) **Principais doenças na cultura do milho**. São Paulo: EMBRAPA, 80 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, 26).

Gemechu AL, Chiemsombat P, Attathom S, Reanwarakorn K, Lersrutaiyotin R. (2006) Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. **Arch. Virol** 151:167-172.

Gonçalves MC, Moreira YJCB, Maia IG, Santos AS, Fantin GM, Chaves ALR, Frangione DSS, Ulian EC (2004) Identificação e caracterização de isolados pertencentes ao subgrupo do *Sugarcane mosaic virus* no estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira** 29:129-129 (resumo).

Gonçalves MC, Santos AS, Maia IG, Chagas CM, Harakava R (2007) Caracterização de um isolado do *Sugarcane mosaic virus* que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira** 32: 32-39.

Gonçalves MC, Galdeano DM, Maia IG, Chagas CM (2011) Variabilidade genética de *Sugarcane mosaic virus*, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 46: 362-369.

Gonçalves MC, Pinto LC, Souza SC, Landell MG (2012) Virus diseases in sugar cane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional Plant Science and Biotechnology** 2: 108-116.

Grisham MP (2000) "Mosaic." In: Rott P, Bailey RA, Comstock J-C, Croft BJ, Saumtally AS (Eds.) **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier, France: CIRAD/ISSCT, La Librairie du Cirad, p. 249–254.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41: 95-98.

Koike H, Gillaspie AG Jr (1989) Mosaic. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie AG Jr, Hughes CG (Eds.) **Diseases of Sugarcane**. Elsevier, Amsterdam, p. 301-322

Landell MGA, Silva DN; dos Anjos AI, Mendonça JR, Bidoia MAP, Campana MP, Xavier MA, Figueiredo P (2007) **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil**. Instituto Agronômico de Campinas: Campinas, p.37.

Lesemann DE, Shukla DD, Tomic, M, Huth W (1992) Differentiation of the four viruses of the *Sugarcane mosaic virus* subgroup based on cytopathology. **Archives of Virology** 5: 353-361.

McKern NM, Shukla DD, Toler RW, Jensen SG, Tomic M, Ford, RE, Leon O, Ward CW (1991) Confirmation that the *Sugarcane mosaic virus* subgroup consists of four distinct potyviruses by using peptide profiles of coat proteins. **Phytopathology** 81:1025-1029.

Medeiros CNF, Gonçalves MC, Harakava R, Creste S, Nóbile PM, Pinto LR, Perecin D, Landell MGA (2014) Sugarcane Transcript Profiling Assessed by cDNA-AFLP Analysis during the Interaction with *Sugarcane mosaic virus*. **Advances in Microbiology** 4: 511-520.

Moura GL de (2004) **Análise da herança da resistência da cana-de-açúcar à ferrugem (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd.)**. 46 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Perera MF, Filippone MP, Ramallo CJ, Cuenya MI, García ML, Ploper LD, Castagnaro AP (2009) Genetic Diversity Among Viruses Associated with Sugarcane Mosaic Disease in Tucumán, Argentina. **Phytopathology** 99(1): 38 - 49.

Perera MF, Filippone MP, Noguera AS, Cuenya MI, Castagnaro AP (2012) An overview of the sugarcane Mosaic disease in South America. **Functional Plant Science and Biotechnology** 6(2): 98-107.

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. In: **XXVIII ISSCT CONGRESS**, Brisbane: São Paulo, vol. 28, p. 1 – 3.

Rott P, Comstock JC, Gilbert RA, Sandhu HS (2002) Sugarcane Mosaic. **Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension**. SS-AGR-209, p. 1-3.

Rott P, Fernandez E, Girard J-C (2008) “Mosaic diseases in sugarcane.” In: Rao GP, Kanura SMP, Lenardon SL (Eds.) **Characterization, diagnosis & management of plant viruses. Vol. 1: Industrial crops**. Houston: Studium Press LCC, p. 99–110.

SAS Institute (2013). **SAS/STAT user’s guide, version 9.3** SAS, Cary, 2013.

Schneider WL, Roossinck MJ (2001) Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. **Journal of Virology** 75(14): 6566-6571.

Seifers DL, Salomon R, Marie-Jeanne V, Alliot B, Signoret P, Haber S, Loboda A, Ens W, She YM, Standing KG (2000) Characterization of a novel potyvirus isolated from maize in Israel. **Phytopathology** 90: 505-513.

Shukla DD, Ward CW (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Brief review. Arch. Virol** 106(3-4): 171–200.

Shukla DD, Frenkel MJ, McKern NM, Ward, CW, Jilka J, Tosic M, Ford RE (1992) Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. **Archives of Virology** 5: 363-373.

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) **The Potyviridae**. Centre for Agriculture and Biosciences International. Cambridge. Cambridge University Press. 516 p.

Silva MF, Gonçalves MC, Melloni MNG, Perecin D, Landell MGA, Xavier MA, Pinto LR (2015a) Screening Sugarcane Wild Accessions for Resistance to *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). **Sugar Tech** 17(3): 252–257.

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

Teakle DS, Shukla DD, Ford RE (1989) *Sugarcane mosaic virus*. No. 342. In: **AAB Descriptions of Plant Viruses**. Wellesbourne, Warwick, UK, 6p.

Urcuqui-Inchima S, Haenni A, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Res** 74(1-2): 157–175.

Xia X, Melchinger AE, Kuntze L, Lübberstedt T (1999) Quantitative trait Loci mapping of resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. **Phytopathology** 89(8): 660-667.

Xu DL, Park JW, Mirkov TE, Zhou GH (2008) Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. **Arch Virol** 153:1031–1039.

Xu DL, Zhou GH, Xie YJ, Mock R, Li R (2010) Complete nucleotide sequence and taxonomy of *Sugarcane streak mosaic virus*, member of a novel genus in the family *Potyviridae*. **Virus Genes** 40: 432 - 439.

Yang ZN, Mirkov TE (1997) Sequence and relationships of sugarcane mosaic and sorghum mosaic virus strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. **Phytopathology** 87: 932-939.

Zhang MQ, Rao GP, Gaur RK, Ruan MH, Maneesha Singh, Sharma SR, Ashutosh Singh, Pratibha Singh (2008) *Sugarcane mosaic virus*. In: Rao GP, Khurana SMP, Lenardon SL. **Characterization, diagnosis & management of plant viruses. Volume 1: industrial crops**. Houston: Studium Press LCC, p. 111-144.

CAPITULO 4 - Identificação de marcadores moleculares relacionados com a resistência ao *Sugarcane yellow leaf virus* - SCYLV e *Sugarcane mosaic virus* – SCMV, em um painel de mapeamento associativo de genótipos do gênero *Saccharum* spp.

Resumo – Entre as doenças mais importantes da cana-de-açúcar causadas por vírus encontram-se o amarelinho (*Sugarcane yellow leaf virus* - SCYLV, *Polerovirus*, família *Luteoviridae*) e o vírus do mosaico (*Sugarcane mosaic virus* – SCMV, *Potyvirus*, família *Potyviridae*). Um estudo de mapeamento de associação foi conduzido em um painel de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. do banco de germoplasma ativo do Centro de Cana - IAC (Instituto Agrônômico de Campinas) com o objetivo de identificar marcadores moleculares que conferem resistência a estes dois vírus. O painel de associação foi genotipado com 166 marcadores polimórficos SSRs e 789 AFLPs. O painel foi fenotipado para SCYLV e SCMV mediante escala de notas de severidade em um ensaio em blocos completos ao acaso. Para conhecer a estrutura da população, as marcas e os dados fenotípicos foram submetidos a análise usando o software STRUCTURE 2.3.4., determinando que a população estava estruturada em duas subpopulações. A associação entre o polimorfismo genético e a variação fenotípica foi realizada utilizando a metodologia de regressão linear simples e seleção das marcas com $p\text{-valor} < 0,05$. Após a primeira pre-seleção, foram submetidas a análise de regressão *stepwise*, sendo finalmente selecionadas duas marcas para amarelinho e três para mosaico. As marcas AFLP289 e AFLP703 ($p < 0,001$) mostraram associação com a susceptibilidade ao SCYLV, conjuntamente apresentando um valor de R^2 de 19,23%. Outras três marcas foram detectadas associadas ao SCMV. Duas delas, AFLP424 e AFLP384 ($p < 0,001$), foram identificadas com efeito positivo, ligadas a susceptibilidade e uma com efeito negativo (AFLP346), ligada a resistência, as quais explicaram conjuntamente, 27,43% da variação fenotípica. Nenhuma das marcas associadas a susceptibilidade para os dois vírus esteve presente de forma simultânea nos genótipos KRAKATAU IN84-82, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277 e IACBIO279. A marca AFLP346, associada a resistência ao mosaico apresentou-se em todos eles, podendo estes genótipos ser considerados resistentes para as duas doenças, confirmada pela ausência de sintomas registrados em campo.

Palavras chave: Cana-de-açúcar, SSR, AFLP, regressão linear simples, escala diagramática de notas.

1. Introdução

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica e social em muitos países do mundo, sendo a principal fonte de açúcar e de etanol, adquirindo maior relevância particularmente pelo recente incremento na demanda mundial de bioenergia (CONAB, 2018).

Saccharum é um gênero complexo caracterizado pelos altos níveis de poliploidia, composto por seis espécies: *Saccharum officinarum* L., *Saccharum barberi* Jesw., *Saccharum sinensi* Roxb., *Saccharum spontaneum* L., *Saccharum robustum* Brandes e Jeswiet e *Saccharum edule* Hassk. (Daniels e Roach, 1987). A partir de pesquisas recentes, somente as espécies *S. spontaneum* e *S. officinarum* são classificadas dentro do gênero *Saccharum* (Nayak et al., 2014). *S. officinarum* é a principal espécie contribuindo para o genoma das cultivares modernas de cana-de-açúcar (D'Hont, 2005), sendo estas o resultado de hibridações entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* e uma contribuição menor das espécies *S. barberi*, *S. robustum* e *S. sinense* (Irvine, 1999). Esses cultivares são descritos como alopoliploides contendo entre 80-140 cromossomos com 8 – 18 cópias de um básico de $x=8$ como é o caso de *S. spontaneum* ($2n=40-128$, $x=8$) (Panje e Babu, 1960), ou $x=10$ para *S. officinarum* ($2n=80$, $x=10$) (Bremer, 1961).

A cana-de-açúcar é afetada por diversas doenças causadas por fungos, bactérias, fitoplasmas e vírus. Entre as viroses, o amarelinho (*Sugarcane yellow leaf virus*, SCYLV) e o mosaico (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) são consideradas as principais, sendo responsáveis de importantes episódios epidemiológicos em vários países produtores, além de ser causadores de drásticas perdas econômicas (Xu et al., 2008; Simon et al., 2016).

Os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas de apoio nos programas de melhoramento de plantas pela vantagem de não serem influenciados pelo ambiente e por não mudarem com o ciclo de vida do indivíduo, principalmente os caracteres de baixa herdabilidade (Winter e Kahl, 1995). O uso de uma variedade de marcadores moleculares como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Tanksley et al., 1989), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos et al., 1995), SSR (*Single Sequence Repeat*) (Akkaya et al.,

1992) e RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) (Fritsch e Rieseberg, 1996), tem sido útil para explorar a variabilidade genética de populações e suas relações em coleções de germoplasma de cana-de-açúcar e outras culturas agrícolas.

Os marcadores SSR, também chamados microssatélites, são amplamente utilizados para descobrir relações entre indivíduos da mesma espécie, variabilidade genética e divergência entre populações naturais de diferentes espécies (Ferrazzini et al., 2007). O polimorfismo detectado pelos microssatélites é co-dominante (Smiullah et al., 2013), o que significa que é possível detectar genótipos tanto homozigotos e heterozigotos. Os microssatélites baseiam-se em regiões do genoma composto por um conjunto de dois, três ou quatro nucleotídeos repetidos em série, que são conservados entre indivíduos da mesma espécie (Beckmann e Weber, 1992). Estes elementos repetidos não codificam para nenhuma proteína, no entanto, são úteis porque estão dispersos no genoma e exibem um alto grau de polimorfismo, especialmente no gênero *Saccharum* (Cordeiro et al., 2001), dado que cada genótipo possui um número diferente de bases repetidas (Smiullah et al., 2013).

Os marcadores AFLP são uma ferramenta que combina as fortalezas do RFLP e a PCR mediante o uso de adaptadores que vão ser reconhecidos por primers que amplificaram fragmentos altamente restritos de DNA (Lynch e Walsh 1998). Os AFLPs têm sido utilizados para detectar polimorfismos genéticos em milhões de loci em pouco tempo (Vos et al., 1995), incluindo no gênero *Saccharum*, sendo detectado um amplo número de polimorfismo em uma só reação de PCR (Rodríguez et al., 2003).

Com o intuito de encontrar genes envolvidos na resistência às doenças em cana-de-açúcar, foram desenvolvidos os AFLP-RGA (*AFLP-Resistance Gene Analogous*) (McNeil et al., 2011). Os genes de resistência ou genes R, são conhecidos por codificar a síntese de receptores celulares que detectam a presença de patógenos específicos e resposta mediante ativação das vias de transdução de sinais (Kozjak et al., 2009). O clone US01-1158 (híbrido obtido entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*), apresentou resistência ao SCYLTV como resultado da presença de proteínas NBSLRR-RGAs (Glynn et al., 2008).

As principais metodologias para estudar as características quantitativas são o mapeamento de ligação e o mapeamento associativo, podendo também ser

referidas como mapeamento de famílias e mapeamento populacional, respectivamente (Myles et al., 2009). A primeira delas é baseada numa população proveniente de um cruzamento bi-parental, podendo explorar somente os eventos de recombinação que aconteceram durante o estabelecimento da população.

Por causa do limitado número de eventos de recombinação, no mapeamento de ligação em plantas, os QTLs são localizados a intervalos muito grandes (entre 10 a 20 centimorgans, cM) dentro dos cromossomos (Zhu et al., 2008; Holland, 2007). Para o caso do mapeamento associativo, são explorados todos os eventos de recombinação que tem ocorrido na história evolutiva de uma amostra, sendo que somente os marcadores fortemente ligados ao loco permanecem unidos ao caráter em estudo, o qual garante uma maior resolução do mapa, além do ilimitado número de QTLs que podem ser mapeados para uma determinada característica (Peña Malavera et al., 2014).

A característica mais importante do mapeamento associativo é que não precisa do estabelecimento de uma família, constituindo uma ferramenta menos custosa quando comparada com o mapeamento de ligação (Myles et al., 2009), sendo especialmente importante em organismos que tem dificuldades para serem cruzados, clones ou espécies que precisam de longos tempos para completar uma geração (Nordborg e Weigel, 2008).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de realizar a fenotipagem quanto a resistência/suscetibilidade aos vírus do amarelinho e mosaico da cana-de-açúcar e identificar marcadores moleculares correlacionados a resistência para essas doenças, por meio da abordagem de mapeamento associativo num painel de 98 genótipos do género *Saccharum* spp.

2. Metodologia

2.1. Coleção de genótipos do gênero *Saccharum* spp.

Utilizou-se um painel de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. composto por acessos de germoplasma básico (*Saccharum robustum*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*), cultivares e clones do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Centro de Cana - Instituto Agrônômico (IAC), além de cultivares comerciais procedentes dos Programas de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Rede Universitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa) e Copersucar – Coopertativa de Produtores de Cana-de-Açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (SP). Além dos genótipos mencionados, utilizaram-se genótipos com nomenclatura “NG”, originários da Nova Guiné, os genótipos “IS”, “IN”, “IJ” e Krakatau, oriundos da Indonésia e o US51-415, procedente dos Estados Unidos da América. A lista de genótipos com os seus respectivos genitores é apresentada na Tabela 1.

2.2. Estabelecimento de ensaio a campo

Em março de 2016, foi instalado um viveiro de multiplicação em uma área do Centro de Cana do Instituto Agrônômico (IAC), em Ribeirão Preto, São Paulo. Os genótipos foram plantados em parcelas compostas de uma linha de 1,0 m de comprimento, intercalados com 1,0 m de carreador entre cada genótipo. O espaçamento entre sulcos foi de 1,5 m. A partir do viveiro de multiplicação foram produzidas mudas pré-brotadas (MPB) dos 98 genótipos para instalação de um experimento a campo em maio de 2017, localizado nas coordenadas geográficas: 47°52' 34,33" W e 21° 12'50,69" S e altitude 626 m. Adotou-se o delineamento experimental em blocos completos ao acaso (DBCA) com três repetições, com unidades experimentais (UEs) constituídas por 3 linhas de 1,0 m espaçadas 1,5 m. Em cada linha da parcela foram plantadas duas MPBs espaçadas 0,5 m. O espaçamento entre UEs foi de 2,0 m.

Tabela 1. Lista de genótipos que conformaram o painel de mapeamento associativo, sua origem e genitores.

Id	Genótipo	A/B/C*	Genitor feminino	Genitor Masculino
1	US57-1415	C	<i>S. spontaneum</i>	-
2	CANA ALHO	A	<i>S. officinarum</i>	-
3	IACSP01-2410	A	R570	IAC87-3396
4	IACSP04-6007	A	PO88-62	CTC-9
5	IACSP04-6059	A	IACSP95-3018	SP96-3092
7	IACSP95-3028	B	IACSP95-3028	RB85-5156
8	NG57-12	A	<i>S. robustum</i>	-
9	IACSP042516	A	IAC91-2288	SP80-185
10	KRAKATAU	C	<i>S. spontaneum</i>	-
11	IN84-82	A	<i>S. spontaneum</i>	-
12	IACSP04-2508	A	SP91-3059	IACSP97-2077
13	IACSP95-5037	A	SP84-2066	IAC87-3396
14	IACCTC05-9630	A	IACSP97-2053	RB85-453
15	IACSP04-6053	A	IACSP95-6114	IACSP93-3046
16	IACSP99-3009	A	CP70-1133	SP83-2847
17	IS76-155	A	<i>S. officinarum</i>	-
18	IACSP01-2421	A	RB83-5486	SP77-5158
19	IACSP04-2521	A	IAC91-2288	SP96-3092
20	IACSP04-6058	A	IACSP95-3018	SP96-3092
21	IACSP99-1020	A	SP85-1682	SP80-185
22	IACSP04-5065	A	IACSP95-6114	IACSP95-3050
23	IACCTC06-9767	A	IACSP96-3069	IACSP95-2078
24	IACSP98-5046	A	SP81-3251	SP82-3697
25	IACSP01-8034	A	IAC91-3093	SP87-432
26	IACSP99-3357	A	SP92-1584	?
27	IACCTC05-9578	A	WHITETRANS	SP80-3280
28	IACCTC05-5580	A	CTC-4	IACSP93-3046
29	IACSP97-6628	A	RB83-5486	SELF
30	IACSP97-6680	A	SP84-2066	SP84-7017
31	IACCTC05-9534	A	IACSP95-3028	CT96-1414
32	IACSP97-2084	A	RB85-5035	SP80-185
33	CTC15	B	SP84-2025	?
34	IAC91-4168	A	SP81-3137	?
35	IACBIO232	A	RB85-5465	GLAGAH
36	IACBIO241	A	RB85-5465	GLAGAH
37	IACBIO257	A	NG26-011	?
38	IACBIO266	A	NG26-011	?
39	IACBIO270	A	SES-069	?
40	IACBIO271	A	SES-069	?
41	IACBIO273	A	SES-069	?

42	IACBIO275	A	SES-069	?
43	IACBIO277	A	SES-069	?
44	IACBIO279	A	SES-069	?
45	IACCTC05-3616	A	IAC91-5155	CT96-1414
46	IACCTC05-6518	A	SP91-1049	CT93-1231
47	IACCTC05-9552	A	IACSP95-5011	CT96-1414
48	IACCTC05-9607	A	IACSP97-2053	SP88-721
49	IACCTC05-9634	A	IACSP97-2053	RB85-5453
50	IACCTC06-1050	A	CT94-3165	IAC91-1099
51	IACCTC06-9708	A	IACSP96-2042	CT01-4455
52	IACCTC06-9713	A	IACSP95-5000	CT96-1307
53	IACCTC06-9741	A	IACSP95-5000	RB72-454
54	IACSP01-2417	A	RB83-5486	SP77-5181
55	IACSP01-2430	A	IAC91-2195	SELF
56	IACSP01-5501	A	SP91-3059	CTC-957
57	IACSP01-5519	A	RB83-5486	SP77-5181
58	IACSP01-8046	A	R-570	IAC87-3396
59	IACSP01-8082	A	IAC91-3093	SP87-365
60	IACSP01-8158	A	RB83-5486	SP77-5181
61	IACSP02-2067	A	SP97-3060	SP70-1143
62	IACSP02-2125	A	SP90-1161	SP90-1644
63	IACSP02-3025	A	SP92-4230	SP88-813
64	IACSP02-3168	A	IAC91-4216	SP80-3280
65	IACSP04-2503	A	PO88-62	CTC-9
66	IACSP04-2504	A	IACSP95-5037	?
67	IACSP04-2509	A	SP91-3059	IACSP97-3391
68	IACSP04-2510	A	IAC91-3093	CTC-9638
69	IACSP04-3123	A	IACSP95-3028	SP83-2847
70	IACSP04-3148	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
71	IACSP04-3150	A	IACSP95-3018	IACSP93-3046
72	IACSP04-3259	A	IACSP96-6026	RB85-5453
73	IACSP04-5081	A	IACSP96-6026	RB85-5453
74	IACSP04-6032	A	IACSP95-3028	SP77-5181
75	IACSP04-6035	A	SP91-3059	IACSP96-6026
76	IACSP04-6073	A	IACSP95-3028	SP92-4221
77	IACSP04-6077	A	IACSP97-2109	IACSP95-6114
78	IACSP04-6152	A	IAC91-1099	SP93-1124
79	IACSP93-3046	B	SP79-1011	?
80	IACSP95-3018	A	SP84-2189	SP80-1842
81	IACSP95-6114	A	IAC87-3187	CTC-9019
82	IACSP96-2008	A	SP80-144	?
83	IACSP96-3056	A	SP82-6108	?
84	IACSP96-3069	A	SP80-3280	?
85	IACSP96-3076	A	SP84-7017	?

86	IACSP97-3384	A	RB85-5113	RB85-5453
87	IACSP97-4039	A	RB83-5486	RB85-5453
88	IACSP97-4048	A	SP84-2066	IAC86-3154
89	IACSP98-2053	A	SP84-7017	SP80-1842
90	IACSP98-3011	A	IAC91-3093	SP82-3530
91	IACSP99-3369	A	SP90-1616	?
92	IACSP99-4011	A	SP84-2025	RB85-5113
93	IJ76-293	A	<i>S. robustum</i>	-
94	IN84-58	A	<i>S. spontaneum</i>	-
95	IN84-88	A	<i>S. spontaneum</i>	-
96	NG57-213	A	?	?
98	RB93-5744	B	RB83-5089	RB76-5418
100	SP83-2847	B	HJ57-41	SP70-1143
101	SP71-6163	B		

?=Policruzamento. *A= clone IAC; B= Cultivar comercial, C=especie.

2.3. Avaliação fenotípica da severidade do SCMV e SCYLV

A severidade das duas doenças foi avaliada nas folhas TVD0 (*Top Visible Dewlap* 0) TVD1, TVD2 e TVD3, sendo que TVD1, refere-se à primeira folha com o "dewlap" visível. As leituras foram feitas mensalmente, a partir do mês de dezembro de 2017, aos sete meses após o plantio, com três avaliadores diferentes com o objetivo de reduzir o erro experimental. Para o caso do mosaico, foram feitas um total de três avaliações, até o mês de fevereiro de 2018; entanto que para o amarelinho foi feito um total de sete sete avaliações, até o mês de junho de 2018.

A severidade foi avaliada utilizando uma escala diagramática de notas elaborada a partir de folhas das mesmas plantas dos genótipos que conformaram o painel de mapeamento. Para as duas doenças foram coletadas folhas apresentando os sintomas característicos, desde sadias até folhas com sintomas altamente expressos das doenças. Para ambos os casos, as escalas compreendiam notas de severidade de 1 até 4, sendo 1, folhas sadias, e; 4, folhas com a maior intensidade de sintomas (Figuras 1.a e 1.b).

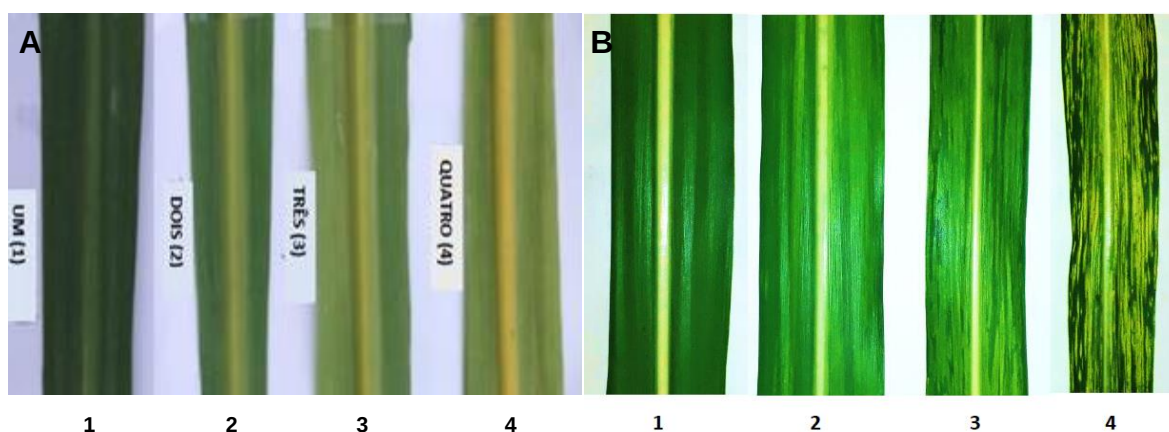


Figura 1. Escala diagramática de notas para avaliação de SCYLV (A) e SCMV (B) em condições de campo. **A:** SCYLV (1) folha verde sem sintomas; (2) amarelecimento acentuado da nervura com limbo foliar de cor verde-amarelo; (3) amarelecimento intenso da nervura e amarelecimento parcial do limbo da folha; (4) amarelecimento intenso da nervura e do limbo da folha. **B:** SCMV (1) folha verde sem sintomas; (2) poucas áreas amareladas em alternância com áreas de verde normal; (3) acentuada expressão do mosaico com alto número de áreas verde intenso e verde normal; e (4) elevado número de áreas verde escuro – verde claro, acompanhado de distorção das folhas.

2.4. Genotipagem com marcadores moleculares

2.4.1. Extração de DNA genômico

O DNA total foi extraído de plantas dos 98 genótipos do género *Saccharum* spp. plantados no viveiro em campo, com seis meses de idade, segundo a metodologia de Aljanabi et al. (1999). A qualidade e concentração de DNA foi estimada tanto por espectrometria via NanoDrop, como visualmente, utilizando como referência padrões de concentrações conhecidas de DNA do fago λ (lambda) em gel de agarose 0.8% (p.v⁻¹), adicionando brometo de etídio como corante.

2.4.2. Marcadores microssatélite (SSR, *Single Sequence Repeat*)

Os 98 genótipos do género *Saccharum* spp. foram genotipados utilizando 12 pares de iniciadores. Cinco deles são conhecidos como iniciadores "SC" (SugarCane: SCB213, SCB381, SCB312, SCB436 e SCC423), (Marconi et al., 2011; Oliveira et al., 2009). Os restantes sete iniciadores são denominados "CV" (Cana

Vialis: CV29, CV37, CV38, CV60, CV79, CV94, CV106), (Maccheroni et al., 2009; Oliveira et al., 2007). Os iniciadores foram desenvolvidos a partir do banco de sequências expressas do SUCEST (ESTSSR) (Oliveira et al., 2009) (Tabela 2).

Tabela 2. Pares de iniciadores SSR utilizados para a genotipagem de 98 genótipos do género *Saccharum* spp.

SSR	Unidade de repetição	Amplicon esperado	Temperatura de anelamento	Sequência forward Sequência reverse
CV29	(ATCT) ₁₄	85-151	60,0 °C	TCGCGTCCACCAATGTAACC GCGTG CATCGCTTGTGTCTT
CV37	(TTTC) ₁₅	114-171	60,0 °C	GGATGGACGACGTGTCCTGG ATAAAGTGGCCGCTTGGATTGA
CV38	(CTTTT) ₁₈	93-2014	60,0 °C	GAAGCAGGGGCTCAAGTTG GTCAAACAGGCGATCTGGCTC
CV60	(CTCTCC) ₅	158-194	60,0 °C	AATCTGCACCCTGCCCTCTC CAGCTGGAGCATGGATGGAG
CV79	(CTATAT) ₁₁ (TATAGA) ₆	131-231	60,0 °C	GGCACTGCTGGTGGTTGATTG TCCCACATCAAGAGGCAGCTA
CV94	(AAAAAG) ₅ (CGT) ₅	182-234	60,0 °C	GGCAGGCCAAGATGAATGAAG AGCACAGCGGAGGGTACGG
CV106	(GGC) ₈	78-162	60,0 °C	AAACAGAGCATACTCGAGGCC ACGTTGCTGACGAGGTTTTCC
SCB213	(TCC) ₆	247-337	62,0 °C	AGCCGTCAGGGGTCAGG ATTCGATGGAGCCTGAGTGAG
SCB312	(TCC) ₇	190-278	64,7 °C	AGTCCGTCGCCGTAATCATCTTG GCACCTCCTCCTTTCCTTCCTTATT
SCB381	(TAC) ₈	190-257	60,0 °C	TGGAGCTCCGTCTTCTTGTT GCTAGCCCGTACATTGGGTA
SCB436	(GAG) ₅	158-274	60,0 °C	AGTACGCCTGAGTCCTGACG AGGTGCAAGGGCTGATAGAA
SCB423	DISPONÍVEL SOB CONSULTA			

Na tabela, são apresentados os iniciadores com suas respectivas temperaturas de anelamento, motivos de repetição, sequências “forward” e “reverse” (5' a 3'), e tamanhos de produtos amplificados esperados.

O *master mix* de PCR foi preparado em um volume final de 15 µL usando 30 ng de DNA genômico, 0,02 µM dos primers forward e reverse, 1X de tampão PCR, 2mM de MgCl₂, 0,1 mM de dNTPs e 12 µL de Taq Polymerase. A reação para

amplificar o DNA genômico foi realizada em um termociclador (BIO-RAD MyCycler Thermal cycler) com o seguinte programa de PCR: desnaturação a 94,0°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 94,0°C durante 1 minuto e uma temperatura de anelamento específica para cada iniciador (Tabela 2), segundo protocolos utilizados por Marconi et al. (2011) e Oliveira et al. (2009). Os produtos de PCR foram colocados num gel de eletroforese de poliacrilamida utilizando um sistema de análise de DNA LI-COR modelo 4300. Os primers foram marcados com um corante fluorescente (IR 700 e 800), a fim de poder visualizar cada banda de microssatélites de DNA a partir dos produtos da PCR.

2.4.3. Marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Os marcadores AFLP foram desenvolvidos utilizando 300ng do DNA genômico de cada genótipo e digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MspI* em um volume final de 20 µL, contendo tampão 10X e água *milli-Q*. As amostras foram incubadas por três horas a 37°C e a 70°C por cinco minutos em termociclador. Após a digestão procedeu-se à ligação dos adaptadores em um volume final de 40 µL. Para cada tubo de reação, adicionou-se 20 µL da reação de digestão, tampão Buffer 4X, 0,5 µM do adaptador *EcoRI*, 5 µM do adaptador *MspI* (*Hpa II*), 1 mM de ATP e 3,4 U da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação foi feita a 37°C por duas horas e a 16°C por 16 horas utilizando um termociclador.

A pré-amplificação foi realizada com primers complementares aos adaptadores de *EcoRI* e *MspI* (*HpaII*) desprovidos de nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Os produtos de ligação dos adaptadores foram diluídos seis vezes para o preparo da reação de amplificação. Aplicou-se 2µL de cada amostra diluída 6X e foi adicionado 3,3 µM do primer *EcoRI*+0; 3,3 µM do primer *Msp*+0; 0,17mM de dNTPs; 2,0 mM de MgCl₂, 0,07 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 15 µL/reação. As amostras com o mix de reação foram submetidas a 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto em um termociclador *BIO-RAD MyCycler Thermal cycler*.

A amplificação seletiva foi realizada utilizando os primers: (1) sequência complementar ao adaptador da enzima de corte raro que tem acrescentado um ou

mais nucleotídeos aleatórios na extremidade 3'; e (2) sequência complementar ao adaptador da enzima de corte frequente seguida por nucleotídeos arbitrários. As reações de pré-amplificação foram diluídas 10X e utilizadas na amplificação seletiva, adicionado o primer seletivo para três nucleotídeos.

Foram realizadas duas reações utilizando 35 combinações de primers EcoRI/MspI (Tabela 3). Os primers EcoRI700 e EcoRI800 foram marcados com os fluoróforos IRDye700 e IRDye800, respectivamente. Para cada reação utilizou-se 2,5µL da pré-amplificação diluída 10X, tampão PCR 1X, 0,05µM do primer Eco700 ou 0,07 µM do primer Eco800 marcado, 0,25 µM do primer não marcado, 0,25 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0,5 U de Taq DNA polimerase em um volume final de 10 µL.

Tabela 3. Combinações dos primers AFLP utilizados na genotipagem de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. As sequências apresentadas correspondem aos três nucleotídeos seletivos posicionados na extremidade 3' dos iniciadores *EcoRI* e *MspI*.

No. da combinação	Sequência 3' do primer*		No. da combinação	Sequência 3' do primer*	
	EcoRI	MspI/Hpa		EcoRI	MspI/Hpa
1	AGA-IRD800	ACA	26	ACC-IRD700	ACT
2	AGA-IRD800	TTG	33	AAC-IRD700	CGC
3	AGA-IRD800	ACC	34	AAC-IRD700	GAG
5	AGA-IRD800	TAG	36	AAC-IRD700	GAA
6	AGA-IRD800	CGC	37	ACG-IRD700	ACA
9	AGA-IRD800	GAA	40	ACG-IRD700	TCG
10	ACA-IRD700	ACA	41	ACG-IRD700	TAG
11	ACA-IRD700	TTG	42	ACG-IRD700	CGC
12	ACA-IRD700	ACC	48	AGG-IRD800	ACC
14	ACA-IRD700	TAG	49	AGG-IRD800	TCG
15	ACA-IRD700	CGC	51	AGG-IRD800	CGC
16	ACA-IRD700	GAG	53	AGG-IRD800	ACT
18	ACA-IRD700	GAA	54	AGG-IRD800	GAA
20	ACC-IRD700	TTG	55	AAG-IRD800	ACA
21	ACC-IRD700	ACC	56	AGG-IRD800	TTG
22	ACC-IRD700	TCG	59	AGG-IRD800	TAG
24	ACC-IRD700	CGC	60	AGG-IRD800	CGC
25	ACC-IRD700	GAG			

*As sequências acima correspondem aos três nucleotídeos seletivos posicionados na extremidade 3' dos iniciadores *EcoRI* e *MspI*.

Para as combinações com os primers EcoRI800, foram aplicados 12 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos (decrecendo 0,7°C/ciclo) e 72°C por 1 minuto, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Da mesma forma, as combinações dos primers EcoRI700 foram submetidas a 13 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 65°C (-0,7 °C/ciclo) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Finalmente, os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida utilizando o *Licor 4300 DNA analyzer*.

2.5. Análise de dados

2.5.1. Análise de dados fenotípicos para amarelinho e mosaico

Os dados fenotípicos quanto a severidade de sintomas da infecção por amarelinho e mosaico foram submetidos à análise de variância (teste F) usando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013) mediante o procedimento Proc GLM e a comparação de médias foi feita utilizando o teste t (LSD=*least significance difference*) a um $p\text{-valor} < 0,05$, segundo o modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + B_j + G_i + E_{ijk}$, onde Y_{ij} = observação de i étimo genótipo no j étimo bloco, μ = média geral, B_j = efeito do j étimo bloco, G_i = efeito do i étimo genótipo, e E_{ij} = erro médio experimental. Os dados são apresentados como medias das notas dos sintomas e foram transformados mediante $\ln(x + 5)$. O modelo foi aplicado para os dados de severidade de amarelinho coletados no mês de junho de 2018 (13 meses após plantio) e janeiro de 2018 para o caso de mosaico (sete meses após plantio). Esses meses foram eleitos para o análise por ser nesse tempo quando os genótipos apresentaram a maior expressão dos sintomas para cada uma das doenças em estudo.

A partir dos dados e assumindo o efeito aleatório dos genótipos no modelo misto, estimou-se a variância genética (σ_G^2) e a variância ambiental (σ_E^2). A herdabilidade em sentido amplo (h^2) foi estimada utilizando os componentes da variância, segundo a equação: $h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + \sigma_E^2)$.

2.5.2. Avaliação da estrutura genética da população

A estrutura genética da população foi analisada mediante modelo de agrupamento baseado na estatística bayesiana no programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Hubisz et al., 2009). Os genótipos foram considerados haplóides e nenhuma informação prévia sobre a origem dos cultivares foi inserida, sendo selecionado o modelo *admixture* e a opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações. Inicialmente foi avaliada a hipótese de K, número de subgrupos, variando de 1 a 10 com agrupamento mais provável obtido a partir de 200000 interações MCMC, *Monte Carlo Markov Chain*, após um período de 100000 interações iniciais (período de *burning*). O programa foi executado 10 vezes para cada hipótese de K. Os resultados de todas as corridas foram transferidos para o programa Structure Harvester v. 0.6.94 (Earl, 2014), o qual determinará o número mais provável K, de acordo com Evanno et al. (2005).

2.5.3. Análise de associação

A associação entre polimorfismo genético e variação fenotípica foi realizada no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2013), de acordo com a metodologia de regressão linear simples, segundo o modelo: $y = a_i + b_i x_i + e_i$ ($i = 1, 2, \dots, n$); em que y representa as notas de severidade ao SCYLV e SCMV; a_i , o intercepto da equação; x corresponde aos valores (0,1) dos n marcadores moleculares, b_i são coeficientes de regressão simples, que especificam a relação entre y e x_i ; e e_i os efeitos residuais. Na sequência, as marcas simples significativas ($p < 0,05$) foram submetidas a um processo de regressão com seleção *stepwise* para escolher o conjunto de marcas simultaneamente relacionadas a cada doença.

Para avaliar a contribuição dos efeitos de estrutura da população, não foi testada a interação entre os marcadores significativamente associados e os subgrupos detectados pelo programa STRUCTURE, baseados em outros trabalhos que indicam que a análise segmentada em subgrupos, poderia levar à perda de importantes marcadores associados fortemente à característica de interesse (Gouy et al., 2015; Li et al., 2010).

A ausência de interação marcador*grupo significativa ($p < 0,05$) indica que os efeitos dos marcadores são independentes da base genética dos indivíduos, enquanto a presença dessa interação recomenda a observação da correlação, fenótipo e genótipo, dentro do subgrupo (Sharma, 2009).

3. Resultados e discussão

3.1. Análise de dados fenotípicos

Para os análises de dados fenotípicos, foram tomados os dados das avaliações feitas nos meses de janeiro e junho de 2018, sendo que nesses meses foi mais clara a expressão dos sintomas dos vírus de mosaico e amarelinho, respectivamente. O efeito encontrado entre genótipos foi significativo ($p < 0,01$) para resistência, tanto para SCYLV como para SCMV, expressando a existência de grande variabilidade dentro do painel para essas características (Tabela 4). Essa variabilidade é explicada pela presença de uma grande diversidade genética dos genótipos que compõem o painel, sendo que os genitores possuem genomas que são originários das espécies *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. officinarum*, *S. barberi* e *S. sinense*.

Por outro lado, a não significância obtida entre blocos, indica um bom controle das fontes de variação ambiental, sendo que o número de repetições, a casualização e o controle local foram eficientes para reduzir essas variações. Apesar de que os dois vírus estudados são transmitidos por insetos com comportamento gregário e de distribuição aleatória no campo (Raccah e Fereres, 2009), os baixos coeficientes de variação obtidos confirmam a boa precisão experimental do ensaio a campo.

Tabela 4. Análise de variância da resposta de genótipos do gênero *Saccharum* spp. à infecção do SCYLV e SCMV

Fonte de variação	GL	QM	Variância Genética (σ_G^2)	Variância Ambiental (σ_E^2)	Herdabilidade em nível de parcela (h^2)
SCYLV					
Blocos	2	0,02037 ^{ns}	0,006576	0,00592	52,62%
Genótipos	97	0,02565 ^{**}			
Resíduos	194	0,00592			
CV (%)	4,13				
SCMV					
Blocos	2	0,00459 ^{ns}	0,009296	0,00558	62,49%
Genótipos	97	0,03347 ^{**}			
Resíduos	194	0,00558			
CV (%)	4,05				

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; CV: coeficiente de variação. ^{**}p<0,01. Dados estimados a partir das médias de três avaliadores na folha TVD0 no mês de junho/2018 para SCYLV, e janeiro/2018 para SCMV. Os dados foram transformados para $\ln(x+5)$. ns: não significativo.

A herdabilidade da resposta aos vírus ficou em 52,62% e 62,49% ao nível de parcela para SCYLV e SCMV respectivamente, podendo ser categorizada entre moderada e alta. Essas herdabilidades pode ser novamente um indicativo de um bom controle ambiental. De acordo com a classificação exposta por Resende (2002), a herdabilidade pode ser considerada baixa quando $h^2 < 0,15$, magnitude média entre $0,15 < h^2 < 0,50$ e magnitude alta com $h^2 > 0,50$. Esses altos valores evidenciam que as características avaliadas apresentam uma expressiva herança genética, mas que ainda são sensíveis a variação do ambiente.

A frequência de distribuição dos valores fenotípicos médios dos genótipos avaliados pode ser observada na figura 2. As distribuições fenotípicas aliadas às médias obtidas entre os genótipos indicam um maior desempenho (resistência aos vírus), podendo ser evidenciado pela distribuição à esquerda dos gráficos.

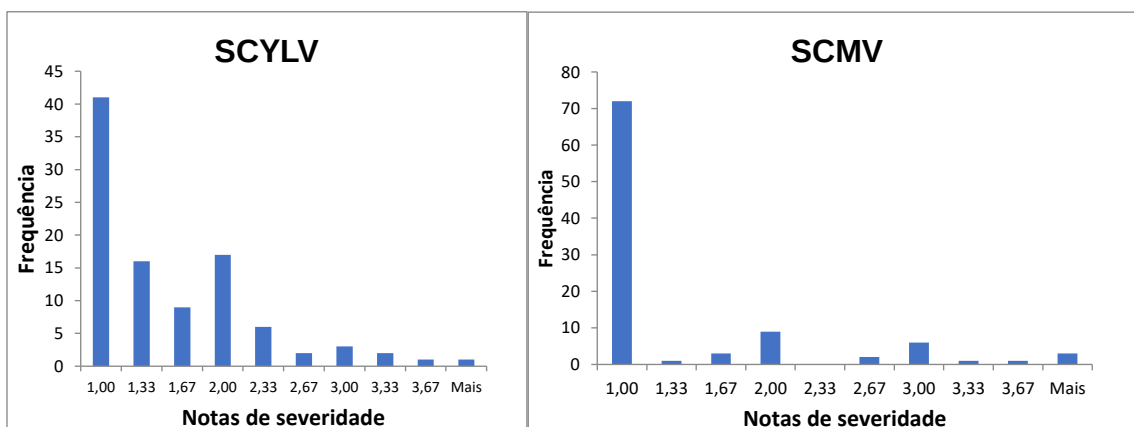


Figura 2. Frequência de distribuição dos valores fenotípicos para severidade do SCYLV e SCMV em um painel composto por 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp.

As correlações entre o valor de $\ln$ (nota de severidade+5) de SCYLV e SCMV mostraram-se negativas com p-valor ao redor de 0,10. Tomando as folhas TVD0 e o mês de janeiro para mosaico e junho para amarelinho, os resultados mostram 57 dos 98 genótipos com amarelinho, 26 com mosaico e 13 com ambos os vírus. O valor esperado sob a hipótese de independência seria ao redor de 16 para ambos os vírus, o que explica a correlação levemente negativa entre as duas viroses; ou seja, elas ocorreram juntas menos que o esperado pelo simples acaso. As Figuras 3.a e 3.b apresentam a incidência para amarelinho e mosaico respectivamente, no painel de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp.

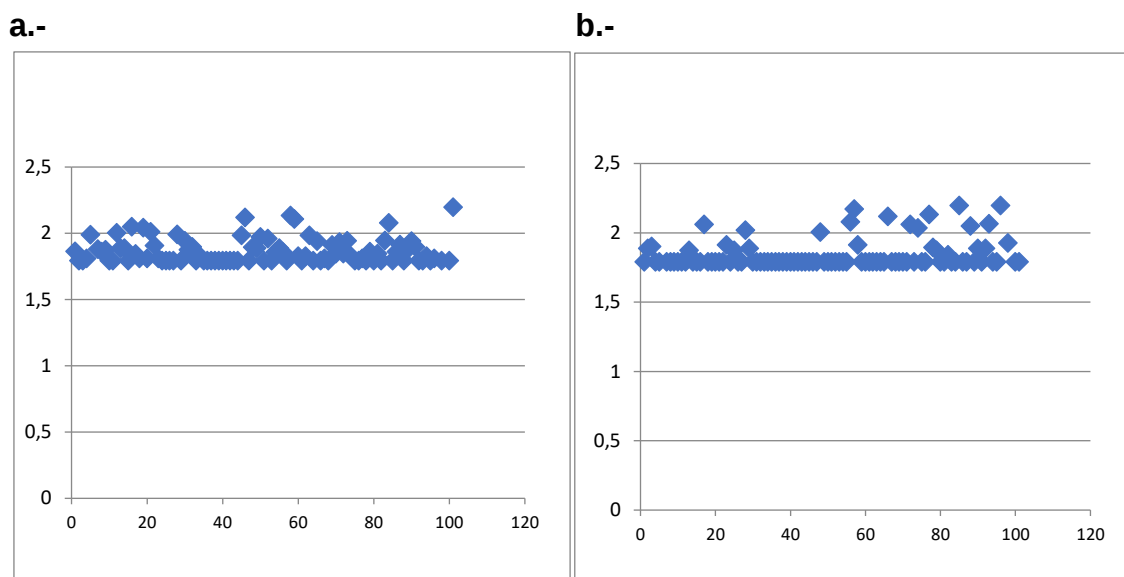


Figura 3. Genótipos expressando sintomas de amarelinho **(a)** e de mosaico **(b)** em um painel de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. A abscissa representa o número do genótipo (1 até 98) e a ordenada $\ln$ (nota + 5). A ordenada $1.79176 = \ln(1+5)$, corresponde a ausência de sintomas.

3.2. Análise da estrutura da população

Os resultados nas análises realizadas pelo programa STRUCTURE foram inseridas no *Strucuture Harvester* (Earl, 2014), detectando dois grupos mais prováveis nas análises de estrutura da população, a partir do valor de “Delta K” (ΔK) máximo, segundo com Evanno et al. (2005) (Figura 4). A alocação dos genótipos dentro de cada grupo foi baseada na proporção acima de 50% em um determinado cluster. A distribuição dos genótipos nos dois grupos mostrou que 63 genótipos da população ficaram no agrupamento 1 com mais de 90% da proporção genômica, enquanto que no agrupamento 2 compreenderam 35 genótipos. A Figura 5 apresenta a distribuição dos genótipos nos 2 grupos e a porcentagem do genoma compartilhada com o outro grupo.

O mesmo painel de genótipos foi utilizado por Coutinho (2017), na busca de associações para pol (%) e fibra (%) em diferentes épocas de colheita. Para nosso trabalho, o painel tem importância na busca de resistência a viroses pela presença de genitores provenientes das espécies *S. spontaneum* e *S. robustum*, conhecidas por apresentar fatores de resistência a pragas e doenças.

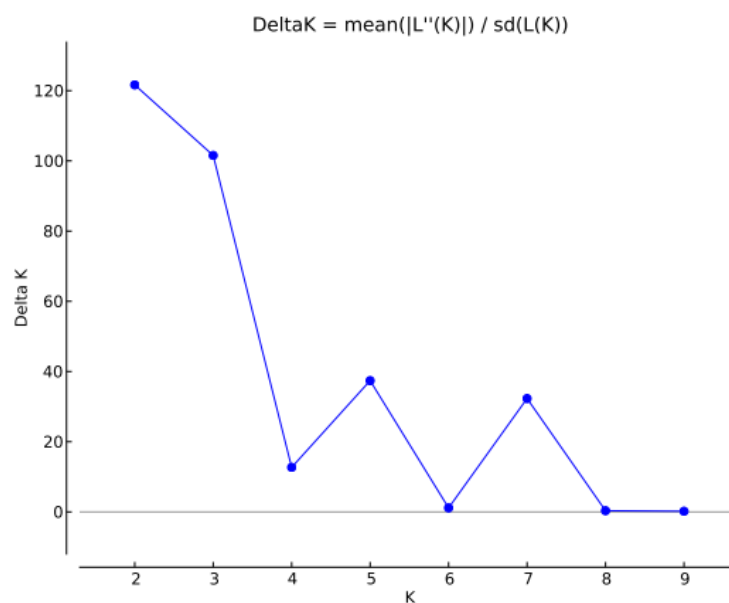


Figura 4. Valor de Delta K= 2 indicando o número de subgrupos mais prováveis existentes no painel de mapeamento composto por 98 genótipos do género *Saccharum* spp.

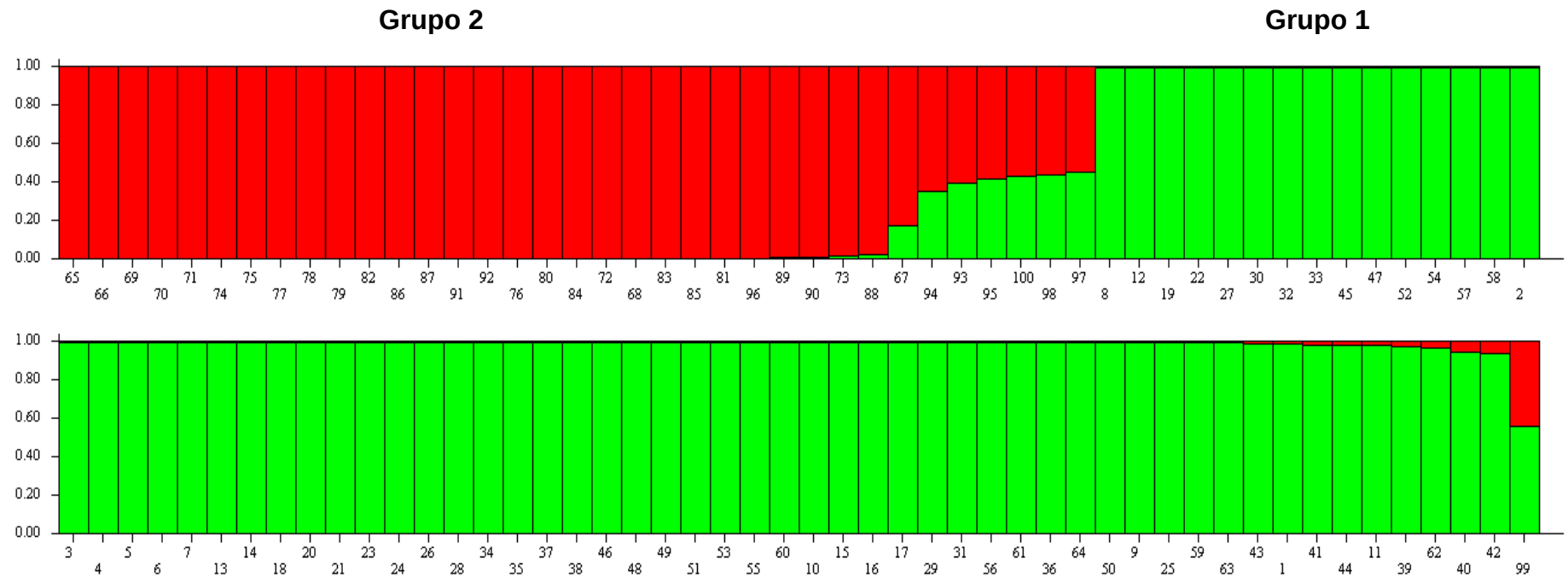


Figura 5. Agrupamento de 98 genótipos do género *Saccharum* spp. pelo programa STRUCTURE. O genoma de cada indivíduo está representado por linhas verticais e segmentado de acordo com a fração de seu genoma (valor Q no eixo vertical) compartilhada com o outro grupo. Para facilitar a visualização, os genótipos estão identificados por um número arábigo. A lista dos genótipos com o correspondente número de identificação é apresentada na Tabela 1 deste capítulo.

Estes resultados diferem dos obtidos por Coutinho (2017); quem determinou a existência de três grupos utilizando o mesmo painel de genótipos, realizando a discriminação dos subgrupos mediante o programa STRUCTURE e genotipagem com marcadores AFLP na busca de associações para características de *Pol* e fibra. No entanto, o mesmo autor, por meio de Análise de Coordenada Principais (PCoA) e de K-means, identificou dois subgrupos para a mesma população utilizando somente os marcadores que melhor discriminaram os grupos para estes dois caracteres. Resultados similares foram encontrados por Gonçalves (2012), estudando a estrutura de uma população composta por 83 genótipos de cana-de-açúcar. A autora relatou que mediante análise de PCoA e o método *neighbour-joining*, baseado na matriz de dissimilaridade e coeficiente de similaridade de Jaccard, os genótipos foram agrupados em três subgrupos; no entanto, o programa STRUCTURE detectou somente dois subgrupos da mesma população.

Para os objetivos deste trabalho, além de marcadores AFLP foram adicionados microssatélites (SSR) na determinação da estruturação da população. Os resultados demonstram que a adição dos SSR não gera uma discriminação mais detalhada da população. É possível que, apesar de que os SSRs tenham sido considerados como co-dominantes, Cordeiro et al. (2003) relatam a tendência da Taq Polimerase de incorporar nucleotídeos de adenosina nos extremos 3' dos produtos amplificados, impossibilitando ao marcador distinguir entre bandas homologas que correm ao mesmo tamanho fazendo difícil diferenciar entre heterozigotos ou homozigotos em qualquer locus particular, especialmente em genomas altamente poliploides, como aquele da cana-de-açúcar.

3.3. Análise de associação

A análise de regressão linear simples identificou 109 marcas associadas à resposta ao amarelinho e 99 para mosaico com $p < 0,05$, sendo a maioria delas provenientes de marcadores AFLPs. No entanto, apenas três marcas estiveram associadas com $p < 0,001$, os quais explicaram, conjuntamente, ao redor de 20,03 % da variação fenotípica para o amarelinho. O efeito individual das marcas simples oscilou entre 0,06975 ($R^2 = 0,1256$) e 0,08287 ($R^2 = 0,1211$) (Tabela 5). As marcas

AFLP151, AFLP289 e AFLP703 tiveram efeito positivo sobre as notas de severidade, estando presentes em respectivamente 76, 71 e 80 dos genótipos avaliados; sendo associadas a suscetibilidade da doença. Nenhuma das três marcas esteve presente de forma simultânea nos genótipos KRAKATAU, IN84-82, IACBIO270, IACBIO271, IACBIO273, IACBIO275, IACBIO277, IACBIO279 e IN84-88, podendo ser considerados resistentes. O mesmo grupo de genótipos foi categorizado como resistentes (segundo a ausência de sintomas no campo) para os dois vírus aqui estudados, podendo confirmar as estimativas feitas com o análise de associação. Depois de aplicar a seleção *stepwise*, somente ficaram as marcas AFLP289 e AFLP703, explicando um 19,23% da variação fenotípica. As combinações dos primers para essas duas marcas foram ECO-ACA-700-MSP-GAG e ECO-AGG-800-MSP-ACT, respectivamente.

Para o caso do SCMV, das 99 marcas, apenas quatro estiveram associadas com $p < 0,001$, explicando conjuntamente um 28,41% da variação fenotípica. Três delas foram identificadas com efeito positivo (AFLP424, AFLP621 e AFLP384) ligadas a susceptibilidade e uma com efeito negativo (AFLP346) (Tabela 5), ligada a resistência. As marcas AFLP424, AFLP621 e AFLP384 estiveram presentes em 35, 26 e 1 dos genótipos estudados, respectivamente; enquanto que a marca AFLP346 foi identificada em 86 genótipos. Após a seleção *stepwise*, ficaram somente as marcas AFLP346, AFLP424 e AFLP384, explicando conjuntamente um 27,43% da variação fenotípica. As combinações dos primers para essas três marcas foram ECO-ACC-700-MSP-ACC, ECO-ACC-700-MSP-ACT e ECO-ACC-700-MSP-CGC, respectivamente.

Analizados individualmente, os marcadores associados à severidade tanto do SCYLV, como de SCMV tiveram pequeno efeito sobre a proporção da variação fenotípica total explicada (R^2), variando entre 11 e 14%. Efeitos similares foram relatados por Gonçalves (2012); quando da avaliação de 83 genótipos de cana-de-açúcar, para resistência à ferrugem marrom, atingindo um máximo de 8% da variação fenotípica. Autores como Aitken et al. (2008) identificaram variação fenotípica de até 10% para marcadores ligados à produção de biomassa. Os autores inferem que o baixo valor de R^2 pode ser explicado pela ação de muitos alelos por loco (poliploidia da cana-de-açúcar), gerando um padrão de herança poligênica,

restringindo a influência de um único alelo para toda a variação fenotípica observada.

Tabela 5: Resultados da regressão lineal simples para marcadores moleculares mais associados com resistência/suscetibilidade a SCYLV e SCMV ao nível de $p < 0.001$.

Marca	Ação individual das marcas	Pr > t	R ²
SCYLV			
AFLP 151	0,07605	0,0004	0,1256
AFLP 289	0,06975	0,0004	0,1297
AFLP 703	0,08287	0,0005	0,1211
SCMV			
AFLP 621	0,09266	0,0001	0,1431
AFLP 346	-0,14715	0,0002	0,1402
AFLP 424	0,07957	0,0005	0,1228
AFLP 384	0,3576	0,0009	0,1110

As análises de associação foram feitas sem considerar a estrutura da população do painel de genótipos. Embora a correção da estrutura da população é importante para evitar a ocorrência de falsos positivos ou falsas associações, estas metodologias poderiam levar a resultados incorretos quando foram feitas as associações entre as características de interesse e as marcas moleculares, pois populações estratificadas poderiam impedir a detecção de efeitos verdadeiros ao caráter em estudo (Gouy et al., 2015; Li et al., 2010). Gonçalves, 2012; analisando um grupo de 83 genótipos de cana-de-açúcar, concluiu que, embora foram realizadas as correções para o efeito da estrutura populacional, esta não influenciou significativamente nas interações fenótipo-genótipo.

4. Conclusões

Foram detectadas as marcas AFLP 289 e AFLP 703, como associadas a severidade do SCYLV, enquanto que as marcas AFLP424 e AFLP384 associadas a severidade do SCMV. Uma marca adicional, a AFLP436, foi identificada com efeito para resistência para este último vírus. Embora a associação não é muito forte ($p < 0,001$), tendo em conta que associações fortes devem apresentar registros de p-valor de ao redor de $< 1 \times 10^{-6}$, recomenda-se a observação desta correlação fenótipo

- genótipo para serem validadas em outros genótipos na seleção de novos materiais resistentes a doenças nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

5. Referências

Aitken KS, Hermann S, Karno K, Bonnett GD, McIntyre LC, Jackson PA (2008) Genetic control of yield related stalk traits in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics** 117: 1191-1203.

Akkaya MS, Bhagwa AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics** 132: 1131-1139.

Aljanabi SM, Forget L, Dookun A (1999) An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide- and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter** 17: 1-8.

Beckmann JS, Weber JL (1992) Survey of human and rat microsatellites. **Genomics** 12: 627–631.

Bremer G (1961) Problems in breeding and cytology of sugar cane. **Euphytica** 10: 59–78.

CONAB (2018) Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018, segundo levantamento. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2018_1o_lev.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL, Manners JM, Henry RJ, Microsatellite (2001) Markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *Erianthus* and *Sorghum*, **Plant Sci** 160: 1115 - 1123.

Cordeiro GM, Pan Y-B, Henry RJ (2003) Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Science** 165: 181 - 189.

Coutinho AE (2017) **Parâmetros genéticos e mapeamento associativo de características tecnológicas de cana de açúcar em três épocas de colheita**. 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Unesp, Jaboticabal.

D'Hont A (2005) Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenet. Genome Res** 109: 27–33.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz DJ (Eds.). **Sugarcane improvement through breeding**. Elsevier, Amsterdam, p.7-84.

Earl DA (2014) Structure harvester v 0.6.94. Disponível em: http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/. Acesso em: 14 jan.2018.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology** 14(8): 2611-2620.

Ferrazzini D, Monteleone I, Belletti P (2007) Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). **Ann For Sci** 64: 159–168.

Fritsch P, Rieseberg LH (1996) The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith TB, Wayne RK (Eds.) **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, p. 54-73.

Glynn NC, Comstock JC, Sood SG, Dang PM, Chaparro JX (2008) Isolation of nucleotide binding site-leucine rich repeat and kinase resistance gene analogues from sugarcane (*Saccharum* spp.). **Pest Manag Sci** 64: 48–56.

Gonçalves BS (2012) **Identificação de marcadores moleculares relacionados à severidade de sintomas da ferrugem marrom em painel associativo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Unesp, Jaboticabal.

Gouy M, Rousselle Y, Thong Chane A, Anglade A, Royaert S, Nibouche S, Costet L (2015) Genome wide association mapping of agro-morphologic and disease resistance traits in sugarcane. **Euphytica** 202(2): 269-284.

Holland JB (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. **Curr. Opin. Plant Biol** 10: 156 - 161.

Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources** 9(5): 1322-1332.

Irvine JE (1999) *Saccharum* species as horticultural classes. **Theor Appl Genet** 98: 186 -194.

Kozjak P, Jakse J, Javornik B (2009) Isolation and sequence analysis of NBS-LRR disease resistance gene analogues from hop *Humulus lupulus* L. **Plant Sci** 176: 775–782.

Li M, Reilly MP, Rader DJ, Wang L-S (2010) Correcting population stratification in genetic association studies using a phylogenetic approach. **Bioinformatics** 26(6): 798 - 806.

Lynch M, Walsh B (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 980 p.

Maccheroni W, Jordão H, Gaspari R, Moura G, Matsuoka S (2009) Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. **Sugar Cane Intl** 27: 8 - 13.

Marconi TG, Costa EA, Miranda HR, Mancini MC, Cardoso-Silva CB, Oliveira KM, Pinto LR, Molinari M, Garcia AA, Souza AP (2011) Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **BMC Research Notes** 4(1) p. 264.

McNeil MD, Hermann SR, Jackson Ph A, Aitken KS (2011) Conversion of AFLP markers to high-throughput markers in a complex polyploid, sugarcane. **Molecular Breeding** 27(3): 395-407.

Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE, Buckler ES (2009) Association Mapping: Critical Considerations Shift from Genotyping to Experimental Design. **The Plant Cell** 21: 2194–2202.

Nayak SN, Song J et al. (2014) Promoting utilization of *Saccharum* spp. genetic resources through genetic diversity analysis and core collection construction. **PLoS One** 9(10): e110856.

Nordborg M, Weigel D (2008) Next-generation genetics in plants. **Nature** 456: 720–723.

Oliveira KM, Pinto LR et al. (2007) Functional integrated genetic linkage map based on EST markers for a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross. **Molecular Breeding** 20(3): 189–208.

Oliveira KM, Pinto LR, Marconi TG, Molinari M, Ulian EC, Chabregas SM, Falco MC, Burnquist W, Garcia AAF, Souza AP (2009) Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome** 52(2): 191-209.

Panje R, Babu C (1960) Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers. **Cytologia** 25: 152–172.

Peña Malavera A, Gutierrez L, Balzarini M (2014) Principal components in associative mapping. **Journal of Basic & Applied Genetics** 25(2): 32 – 40.

Racch B, Fereres A (2009) **Plant Virus Transmission by Insects**. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, p.1-9.

Resende MD (2002) **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 975p.

Rodríguez M, Hernández I, Coto O, Canales E, Cornide MT (2003) RFLP and AFLP polymorphism analysis in sugarcane varieties. **Revista CENIC Ciencias Biológicas** 34(3): p. 121.

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

Sharma V (2009) **Identification of drought-related quantitative trait loci (QTLS) in sugarcane (*Saccharum spp.*) using molecular markers**. 67f. Tese (Doutorado em Filosofia- Área de concentração: Melhoramento Vegetal) - Texas A&M University, Wisconsin.

Simon EDT, Veríssimo MAA, Härter A, Ueno B (2016) Doenças da cana de açúcar. In: Silva SD dos A, Montero CRS, Santos RC dos, Nava DE, Gomes CB, Almeida I R de. **Sistema de Produção da Cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. Embrapa, Clima Temperado, p. 104 – 112.

Smiullah, Farooq Ahmed Khan, Aqeel Afzal, Abdullah, Ambreen Ijaz, Usman Ijaz (2013) Diversity analysis of sugarcane genotypes by microsatellite (SSR) markers. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research** 4(7): 105-110.

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW (1989) RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. **Bio/Technology** 7: 257–264.

Vos P, Hogers R et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res** 23(21): 4407 - 4414.

Winter P, Kahl G (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. **World J Microbiol Biotechnol** 11(4): 438-48.

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** 153: 1031–1039.

Zhu Ch, Gore M, Buckler ES, Yu J (2008) Status and Prospects of Association Mapping in Plants. **The Plant Genome** 1: 5 - 20.

CONCLUSÕES GERAIS

1. O estudo de um painel de 98 genótipos do gênero *Saccharum* spp. avaliados para resistência aos vírus de amarelinho (*Sugarcane yellow leaf virus*) e mosaico (*Sugarcane mosaic virus*) mediante a aplicação de escala de notas, permitiu identificar e discriminar com alta acurácia genótipos resistentes e suscetíveis para as duas doenças.
2. Neste trabalho, foram empregadas as metodologias DAS-ELISA e RT-qPCR para quantificar o SCYLV, verificando a robustez e acurácia destas ferramentas nas condições da pesquisa. Particularmente foi constatado que a RT-qPCR é uma técnica que permitiu a quantificação efetiva do vírus em um grupo significativamente grande de amostras.
3. Existiu alta correlação entre os sintomas de campo e a quantificação viral do SCYLV nos dois ensaios de campo para os genótipos categorizados como resistentes e suscetíveis. Para o caso dos moderadamente resistentes e moderadamente suscetíveis, essa correlação foi fraca.
4. Para o caso do vírus de amarelinho, dos 98 genótipos avaliados, 29 foram categorizados como resistentes, e; para o vírus de mosaico, 72 deles foram incluídos dentro desta categoria. Recomenda-se que este grupo de genótipos sejam considerados para novos estudos, tanto em cana soca e em casas de vegetação com o intuito de obter mais informações e levar para frente os mais resistentes que serão considerados como fontes de resistência para serem utilizados nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar.
5. No painel estudado e nas condições da pesquisa, pode-se considerar a presença da estirpe do vírus de mosaico RIB-1, como causante dos sintomas nos genótipos suscetíveis.
6. Finalmente, as marcas moleculares AFLP289 e AFLP703 foram significativamente relacionadas aos fenótipos avaliados em campo para suscetibilidade do SCYLV, enquanto que as marcas AFLP424, AFLP384 e AFLP436 estiveram associadas a suscetibilidade/resistencia ao SCMV.