

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

**CARACTERIZAÇÃO DE UM PAINEL DE GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO *Sporisorium*
scitamineum AGENTE CAUSAL DO CARVÃO**

Lucélia de Fátima Santos

Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

2024

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

**CARACTERIZAÇÃO DE UM PAINEL DE GENÓTIPOS DE
CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO *Sporisorium*
scitamineum AGENTE CAUSAL DO CARVÃO**

Discente: Lucélia de Fátima Santos

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

Coorientadores: Dr. Ivan Antônio dos Anjos

Dra. Luciana Oliveira Souza Anjos

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

2024

S237c Santos, Lucélia de Fátima

Caracterização de um painel de genótipos de cana-de-açúcar em resposta ao *Sporisorium scitamineum* agente causal do carvão / Lucélia de Fátima Santos. -- Jaboticabal, 2025

98 p. : tabs., fotos

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

Orientadora: Luciana Rossini Pinto

1. Melhoramento de plantas. 2. Resistência a doenças. 3. Marcadores microssatélites. 4. Progresso da doença. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DE UM PAINEL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO *Sporisorium scitamineum*, AGENTE CAUSAL DO CARVÃO

AUTORA: LUCÉLIA DE FÁTIMA SANTOS

ORIENTADORA: LUCIANA ROSSINI PINTO

COORIENTADOR: IVAN ANTÔNIO DOS ANJOS

COORIENTADORA: LUCIANA OLIVEIRA SOUZA ANJOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANA ROSSINI PINTO MACHADO DA SILVA**
Data: 29/01/2025 09:24:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO (Participação Presencial)
Centro Avancado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC Ribeirão Preto/SP

Documento assinado digitalmente
 **ANDREA RAPOSO**
Data: 29/01/2025 10:06:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. ANDRÉA RAPOSO (Participação Virtual)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Gado de Corte / Campo Grande/MS

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO DE GOES**
Data: 03/03/2025 22:01:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES (Participação Presencial)
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **AROLD GOMES FILHO**
Data: 31/01/2025 10:55:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. AROLD GOMES FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento Genético / Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Norte de

Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO (Participação Presencial)
Departamento de Produção Vegetal / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

GUSTAVO VITTI MORO

Data: 29/01/2025 15:49:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 27 de janeiro de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCÉLIA DE FÁTIMA SANTOS - nasceu em 22 de dezembro de 1993 na cidade de Januária, Minas Gerais, Brasil. Em 2012 ingressou no curso de Agronomia no Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, Campus Januária, onde participou de projetos de pesquisas e foi bolsista CNPq do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), sob orientação da professora Dra. Jussara Barros Silva. Realizou estágio na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Corte, envolvida principalmente com melhoramento clássico de plantas forrageiras, sob orientação do Dr. Mateus Santos. Em 2018 ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, e EMBRAPA Gado de Corte, sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Vitti Mouro e coorientação do Dr. Mateus Figueiredo Santos. Em 2021, iniciou o Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na mesma universidade juntamente com Centro de Cana - Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Ribeirão Preto, onde desenvolveu sua pesquisa, sob orientação da professora Dra. Luciana Rossini Pinto, coorientação do Dr. Ivan Antônio dos Anjos e Dra. Luciana Oliveira Souza Anjos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as conquistas alcançadas.

Aos meus pais Lúcia e José e irmãos, por me apoiarem e acreditarem nas minhas escolhas, especialmente à minha mãe, por fazer seus, meus sonhos.

Ao meu marido Augusto por todo amor e incentivo.

A UNESP de Jaboticabal pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas pela infraestrutura e equipe, que possibilitaram o desenvolvimento desse estudo.

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

Ao Centro de Pesquisa em Engenharia – Fitossanidade em Cana-de-açúcar (CEPENFITO) Processo FAPESP 17/25258-1 pelo recurso financeiro para a realização dessa pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Luciana Rossini Pinto pela oportunidade, orientação, confiança, empenho e ensinamentos para realizar essa pesquisa.

Aos meus coorientadores Dr. Ivan Antônio dos Anjos e Dra. Luciana Oliveira Souza Anjos, por todo conhecimento e auxílio compartilhado.

Aos estagiários, Camila, Pedro e Felipe, sempre muito prestativos em ajudar em qualquer etapa, o meu muito obrigada!

Aos colegas do laboratório de biologia molecular do centro de cana, pelo auxílio e suporte, em especial, Tanuza, Kátia, Thais, Maicon, Marcel, Paulo e a Lúcia sempre com um bom café.

A todos os profissionais do Centro de Cana do IAC, principalmente à equipe de campo que tanto auxiliaram neste trabalho.

Aos membros da banca Dr.^a Andréa Raposo, Dr. Aroldo Gomes, Dr. Antônio de Goes e Gustavo Moro, pela disposição, presença e contribuições.

E a todos aqueles que participaram de alguma forma na realização deste estudo.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Aspectos gerais da cultura e melhoramento da cana-de-açúcar.....	2
2.2 Carvão na cana-de-açúcar.....	5
2.3 Modelos epidemiológicos em doenças de plantas e sua importância.....	8
2.4 Marcadores Moleculares no melhoramento da cana-de-açúcar.....	11
2.5 Estrutura genética de populações.....	13
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 2 – Avaliação da reação de genótipos de cana-de-açúcar ao carvão (Sporisorium scitamineum) em casa de vegetação e a campo.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 Painel de genótipos.....	26
2.2 Casa de vegetação.....	26
2.2.1 Delineamento experimental.....	26
2.2.2 Obtenção do inóculo e teste de viabilidade.....	27
2.2.3 Inoculação.....	27
2.2.5 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD).....	29
2.2.6 Classificação dos genótipos quanto à resistência à <i>S. scitamineum</i>	30
2.3 Ensaio a Campo.....	30
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1 Incidência de carvão em casa de vegetação.....	31
3.3 Classificação quanto à suscetibilidade/resistência pela AACPD.....	35
3.4 Comparação do ensaio em casa de vegetação x Campo.....	37
3.5 Parâmetros genéticos.....	38
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 3 - Avaliação da Estrutura Genética e Diversidade de Genótipos de Cana-de-Açúcar utilizando Marcadores Microsatélites.....	44
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Material vegetal.....	47
2.2 Extração de DNA e amplificação por PCR.....	53
2.3 Genotipagem.....	55
2.4 Análise dos Dados.....	55

2.4.1 Análise Filogenética e de Dissimilaridade.....	56
2.4.2 ACP.....	56
2.4.3 Análise da estrutura genética da população.....	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 Variabilidade genética capturada pelos SSRs e alelos exclusivos.....	57
3.2 Análise de estrutura.....	59
3.2.1 Análise Filogenética e Dissimilaridade genética.....	59
3.2.2 Análise de componentes principais (ACP).....	63
3.2.3 Agrupamento Bayesiano (STRUCTURE).....	66
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
CAPÍTULO 4 - Análise da curva de progresso do carvão da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação.....	73
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Material vegetal.....	76
2.3 Ensaio Casa de vegetação.....	77
2.4 Avaliação e obtenção dos dados.....	77
2.4.1 Avaliação da Incidência do Carvão.....	77
2.4.2 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD).....	78
2.4.3 Diferenças esperadas preditas (DEPs) e modelos epidemiológicos.....	78
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
3.1 Diferenças esperadas preditas (DEPs).....	79
3.2 Curvas de progresso da doença e avaliação dos modelos epidemiológicos.....	80
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

CARACTERIZAÇÃO DE UM PAINEL DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA AO *Sporisorium scitamineum* AGENTE CAUSAL DO CARVÃO

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica, especialmente em países tropicais, como o Brasil, onde é fundamental para a produção de açúcar e bioetanol. A doença do carvão-da-cana-de-açúcar causada pelo fungo *Sporisorium scitamineum* é uma das principais doenças fúngicas que afetam a produtividade e o teor de sacarose dessa cultura em todo o mundo. A resistência de cultivares é o método de controle mais apropriado para essa doença. Devido à sua complexidade genética, que inclui poliploidia e alta heterozigosidade, a caracterização da estrutura genética dessa espécie é essencial para programas de melhoramento. Dentre os objetivos deste estudo, destacam-se a avaliação da suscetibilidade de um painel de genótipos de cana-de-açúcar inoculados artificialmente com carvão (*S. scitamineum*) em casa de vegetação e em campo e a avaliação da diversidade e estrutura genética utilizando marcadores do tipo microssatélites (SSRs). O painel consistiu de um total de 165 genótipos de cana-de-açúcar, incluindo clones e cultivares comerciais do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cultivares comerciais de outros programas de melhoramento (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético - RIDESA; Centro de Tecnologia Canavieira – CTC), cultivares de cana-energia (GranBio/Nussel) e acessos de *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, e *S. robustum*. O método de punctura demonstrou ser uma abordagem eficaz para a identificação de genótipos suscetíveis apontando genótipos potencialmente resistentes ao carvão. Além disso, a triagem de genótipos de cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação pode ser uma estratégia eficaz para eliminar genótipos suscetíveis, evitar a disseminação de esporos de carvão durante a avaliação da doença e acelerar a seleção de genótipos resistentes ao carvão em programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Os resultados indicam uma base genética estreita entre os genótipos, destacando a importância de expandir a diversidade genética por meio de cruzamentos com espécies selvagens, como *S. spontaneum* e *S. robustum*, para aumentar a variabilidade genética e melhorar o potencial de seleção nos programas de melhoramento.

Palavras-chave: doenças, estrutura genética, modelos matemáticos, SSR

CHARACTERIZATION OF A SUGARCANE GENOTYPE PANEL IN RESPONSE TO *Sporisorium scitamineum*, THE CAUSAL AGENT OF SMUT

ABSTRACT – Sugarcane is a crop of great economic importance, especially in tropical countries like Brazil, where it is fundamental for sugar and bioethanol production. Sugarcane smut, caused by the fungus *Sporisorium scitamineum*, is one of the primary fungal diseases affecting productivity and sucrose content worldwide. The resistance of cultivars is the most appropriate control method for this disease. Due to its genetic complexity, including polyploidy and high heterozygosity, characterizing the genetic structure of this species is essential for breeding programs. This study aims to evaluate the resistance of a panel of sugarcane genotypes artificially inoculated with smut (*S. scitamineum*) under greenhouse and field conditions and assess genetic diversity and structure using microsatellite markers (SSRs). The panel consisted of 165 sugarcane genotypes, including clones and commercial cultivars from the breeding program of the Agronomic Institute of Campinas (IAC), commercial cultivars from other breeding programs (Inter-University Network for the Development of the Sugar-Energy Sector - RIDESA; Sugarcane Technology Center – CTC), energy cane cultivars (GranBio/Nussed), and accessions of *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, and *S. robustum*. The puncture method proved effective in identifying susceptible genotypes, pointing to potentially resistant genotypes. Moreover, screening sugarcane genotypes in greenhouse conditions can be an effective strategy to eliminate susceptible genotypes, prevent the spread of smut spores during disease evaluation, and accelerate the selection of resistant genotypes in sugarcane breeding programs. The results indicate a narrow genetic base among genotypes, highlighting the importance of expanding genetic diversity through crosses with wild species such as *S. spontaneum* and *S. robustum* to increase genetic variability and improve selection potential in breeding programs.

Keywords: Diseases, genetic structure, mathematical models, SSR

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, da família Poaceae, tribo Andropogoneae e subtribo Saccharinae. De acordo com The Plant List (<http://www.theplantlist.org>), o gênero inclui 38 espécies reconhecidas, sendo seis as principais: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinense* e *S. edule*. Esta última, no entanto, não é utilizada no melhoramento genético devido à sua esterilidade e produção de inflorescências abortivas (Grivet et al., 2004).

As cultivares modernas de cana-de-açúcar são híbridos interespecíficos entre *S. officinarum*, também conhecida como "cana nobre" (decaplóide - $2n = 80$, $x = 10$), caracterizada por colmos coloridos, espessos e ricos em sacarose, mas altamente suscetível a estresses bióticos e abióticos, e espécies e gêneros selvagens, com destaque para *S. spontaneum*. Esta espécie é octaplóide, com cinco citótipos principais ($2n = 64, 80, 96, 112, 128$, $x = 8$), sem conteúdo significativo de açúcar, mas valorizada no melhoramento devido ao seu alto vigor, rusticidade e resistência a doenças, pragas e diversos estresses abióticos (D'Hont et al., 1998)

A cana-de-açúcar é uma das culturas agrícolas mais importantes e amplamente cultivadas em todo o mundo. O Brasil é o principal responsável pela produção de açúcar do mundo, na safra 2022/23 produziu cerca de 610,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 37 milhões de toneladas de açúcar e 31 bilhões de litros de etanol, segundo estimativas levantadas pela CONAB em 2023. Já na safra 2023/2024 produziu 713,2 milhões de toneladas em cerca de 8,33 milhões de hectares (CONAB, 2024a,b). Da cana-de-açúcar são obtidos diversos produtos como, o açúcar, etanol, energia elétrica e outros subprodutos industriais, contribuindo significativamente para a economia de diversos países, como o Brasil, Índia e China.

Além de seu impacto econômico, a cana-de-açúcar desempenha um papel central na estratégia global para mitigação das mudanças climáticas, contribuindo para a redução da dependência de combustíveis fósseis e para a diminuição das

emissões de gases de efeito estufa (Seabra et al., 2015). A expansão dessa cultura está intimamente ligada aos avanços na produtividade e na resistência a estresses bióticos e abióticos.

Embora seja uma das culturas mais relevantes economicamente, a cana-de-açúcar enfrenta desafios relacionados à suscetibilidade a doenças. Entre as principais doenças fúngicas, está o carvão, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw. (anteriormente conhecido por *Ustilago scitaminea*) (Stoll et al., 2003), presente nas regiões do mundo onde se cultiva a cana-de-açúcar (Que et al., 2014).

Diante do exposto, a presente tese é apresentada em quatro capítulos, em que o primeiro é as considerações gerais do estudo. No segundo capítulo, avaliou-se, em casa-de-vegetação, a reação de 165 genótipos de cana-de-açúcar ao carvão, cujos resultados foram comparados com os obtidos em campo. No terceiro capítulo, foi avaliada a diversidade e estrutura genética do painel de genótipos, por meio de marcadores do tipo microssatélites (SSRs). Por fim, no quarto capítulo, avaliou-se o progresso do carvão em genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação e sua representação em modelos matemáticos.

Portanto, os estudos aqui apresentados, contribuem para a compreensão da resistência ao carvão e no desenvolvimento de cultivares mais resistentes pelos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura e melhoramento da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta alógama, com capacidade de propagação vegetativa, da família das Poaceae, gênero *Saccharum*. Teve sua origem na Nova Guiné, espalhando-se para o Sudeste Asiático e Índia (Daniels e Roach, 1987). Seu cultivo se expandiu significativamente durante o período colonial, tornando-se uma das principais culturas agrícolas em regiões tropicais e subtropicais (Burner e Grisham, 2002). A planta é amplamente valorizada não apenas pela

produção de açúcar, mas também pela geração de bioenergia, como o etanol, que desempenha um papel crucial na matriz energética global (Goldemberg et al., 2008).

Segundo dados da FAO (2023), a produção global de cana-de-açúcar atingiu a marca de 1,58 bilhões de toneladas em 2022, provenientes de uma área de cerca de 27 milhões de hectares. O Brasil se destaca como líder nesse cenário, contribuindo com 45,72% da produção mundial, seguido por Índia, China, Tailândia e Paquistão. No Brasil, a safra 2023/2024 alcançou um marco histórico, registrando a impressionante marca de 713,2 milhões de toneladas. Além disso, a área colhida apresentou um leve aumento, de 0,5%, totalizando 8,33 milhões de hectares, enquanto o rendimento médio experimentou um incremento significativo de 16,2%, elevando-se de 73.655 para 85.580 kg/ha (CONAB, 2024).

Ainda de acordo com a Conab (2024a,b), a cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas de São Paulo, desempenhando um papel fundamental na economia local e nacional. O estado é o maior produtor de cana do Brasil, respondendo por mais de 50% da produção nacional. Essa liderança deve levar em conta fatores como as condições climáticas, uma grande extensão de terras agrícolas e uma infraestrutura eficiente para o escoamento da produção. Além disso, o estado conta com diversas unidades de produção de açúcar e etanol espalhadas estrategicamente, o que facilita o processamento e a exportação dos produtos derivados da cana-de-açúcar. A cana não só impulsiona a economia, mas também gera milhares de empregos, sendo um componente essencial para o desenvolvimento socioeconômico da região.

O gênero *Saccharum* inclui seis espécies principais: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum* e *S. edule*. Graças ao seu alto teor de sacarose, *S. officinarum* é a espécie mais cultivada (Burner e Grisham, 2002). *S. spontaneum*, com sua resistência a doenças e alta variabilidade genética, é frequentemente utilizada em programas de melhoramento genético (Lakshmanan et al., 2005). *S. barberi* e *S. sinense*, com menor teor de açúcar, são cultivadas em regiões específicas da Índia e China, respectivamente (Daniels e Roach, 1987). *S. robustum*, nativa da Nova Guiné, é valorizada por seu vigor vegetativo, boa adaptação a solos mais úmidos e é utilizada em cruzamentos para melhorar a resistência e produtividade das cultivares (Lakshmanan et al., 2005). *S. edule* é

menos comum, sendo utilizada principalmente para consumo humano em algumas regiões na Nova Guiné (Burner e Grisham, 2002).

O melhoramento genético da cana-de-açúcar é um campo dinâmico e essencial para atender às demandas crescentes de produtividade e sustentabilidade. Antes dos programas de melhoramento genético, as principais variedades comerciais de cana-de-açúcar utilizadas na produção de açúcar eram encontradas na espécie *S. officinarum*. Essas variedades, conhecidas como "canas nobres", são geralmente híbridos clonais que possuem características como alto teor de sacarose, baixo teor de fibra, colmos longos e grossos, boa despalha natural e alta produtividade em condições de cultivo favoráveis (Pires, 1993).

Devido ao cultivo contínuo e à alta suscetibilidade a doenças, os países produtores de cana-de-açúcar começaram a implementar programas de melhoramento. Esses programas envolveram o cruzamento da espécie *S. officinarum* com outras espécies, como *S. spontaneum*, que são conhecidas por sua resistência a doenças e capacidade de se adaptar a diversos tipos de solo e climas. O objetivo foi combinar a alta produção de sacarose da *S. officinarum* com a resistência a doenças oferecida por *S. spontaneum*. Como resultado, as variedades de cana atualmente cultivadas são classificadas como *Saccharum* spp., ao invés de apenas *S. officinarum* (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011).

S. spontaneum é altamente variável, pois sua distribuição geográfica é a mais ampla de todos os membros do gênero (Daniels e Roach, 1987), seu número de cromossomos varia de $2n = 40$ a $2n = 128$, as isoenzimas e rDNA nuclear são as mais variáveis do gênero (Glaszmann et al., 1990), e tem uma ampla variação morfológica. Espécies como *S. barberi* e *S. sinense* são derivadas de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Daniels e Roach, 1987).

O melhoramento genético da cana-de-açúcar é conduzido por várias instituições, tanto públicas quanto privadas, que mantêm seus próprios bancos de germoplasma. No Brasil podemos citar o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) e a Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (Ridesa), tendo na identificação das cultivares desenvolvidas respectivamente, as siglas IAC, CTC e RB, (de Moraes et al., 2015).

O desenvolvimento de uma nova cultivar de cana-de-açúcar pode demorar de 10 a 15 anos, desde o início até a sua introdução no mercado (Landell e Bressiani, 2010). Esse processo inclui várias etapas, que podem variar conforme o programa de melhoramento adotado. No caso do programa do IAC, as fases são: hibridação para a obtenção de sementes; seleção na população segregante; fase de seleção (F1); seleções clonais (F2 e F3); F4, conhecida como ensaios regionais; e F5, chamada de ensaio nacional, até a liberação final da cultivar (Landell e Bressiani, 2010).

Na fase inicial de seleção (F1), milhares de genótipos são avaliados, cada um representado por uma única planta, originada a partir de uma semente obtida por cruzamento biparental ou policruzamentos. Os ensaios são conduzidos em um único ambiente neste estágio. A eficiência de seleção é menor devido à baixa herdabilidade dos caracteres avaliados, além dos custos e do tempo envolvidos na avaliação de tantos genótipos (Landell e Bressiani, 2010). Na fase seguinte (F2), as parcelas são aumentadas e os caracteres fenotípicos, além do teor de Brix, são avaliados em ciclos de cana-planta e cana-soca. Na F3, os ensaios são realizados em parcelas maiores, onde são avaliadas características tecnológicas. Finalmente, as fases F4 e F5 consistem em ensaios regionais e nacionais, respectivamente (Xavier, 2011).

2.2 Carvão na cana-de-açúcar

O carvão da cana-de-açúcar é causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw. (anteriormente conhecido como *Ustilago scitaminea*), que pertence ao filo Basidiomycota, subfilo Ustilaginomycotina, classe Ustilaginomycetes, subclasse Ustilaginomycetidae, ordem Ustilaginales e família *Ustilaginaceae* (Hauksworth et al., 1995).

O carvão foi identificado pela primeira vez em Natal, na África do Sul, em 1877 (Antoine, 1961). No Brasil foi observado pela primeira vez em 1946, na região de Assis, Estado de São Paulo (Rago et al., 2009), nas cultivares POJ36 e POJ213. Apesar dos esforços de erradicação do patógeno, ele se disseminou para outros Estados das regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil. Na década de 80,

ocorreram grandes perdas de produtividade na cultivar NA56-79, que ocupava quase 80% da área cultivada, na época (Bergamin Filho et al., 1987).

O carvão é facilmente reconhecido pela observação de chicotes nos brotos primários da planta doente. Quando a cana-de-açúcar é infectada por *S. scitamineum*, o meristema apical é modificado e forma uma estrutura conhecida como "chicote". Essa estrutura é coberta por uma película prateada que contém uma massa escura de teliósporos pretos e pulverulentos, facilmente dispersados pelo vento (BOLDINI, 2016). Podem variar em comprimento, desde alguns centímetros até mais de um metro, apresentando-se na forma de tranças ou múltiplos chicotes. Esses chicotes podem se formar no ápice, se atingirem o meristema apical de plantas recém-emergidas do solo, ou lateralmente, resultando de infecções das gemas laterais de colmos de plantas adultas (Bedendo, 1999). Além de chicotes, ocorre redução no diâmetro do colmo e superbrotção de perfilhos.

O *S. scitamineum* infecta os tecidos meristemáticos das plantas por meio de hifas dicarióticas que se movem através de tecidos não especializados localizados na base das gemas ou na base das primeiras folhas emergentes. A transmissão primária do fungo ocorre através do plantio de mudas doentes. A disseminação secundária pode ocorrer pelo transporte aéreo dos teliósporos, pelo vento, por insetos transportadores, ou esporos presentes no solo, carregados para diferentes campos pela água da chuva ou da irrigação, onde podem causar novas infecções na cana (Fragoso, 2015). Os prejuízos econômicos são significativos, podendo resultar na perda total da plantação (Bueno, 2010; Tokeshi e Rago, 2005). O uso de variedades resistentes é a estratégia mais comum e mais adequada para controlar essa doença (Fragoso, 2015).

Alguns mecanismos de resistência ao carvão são propostos para a cana-de-açúcar, e a combinação desses mecanismos é que determinará o grau de resistência das variedades. O primeiro deles é o mecanismo pré-formado, também conhecido como defesa constitutiva (Mylne et al., 2010). Este mecanismo está relacionado às características físicas e ao crescimento das gemas, que dificultam ou impedem a entrada de patógenos (Waller, 1970). Entre os exemplos desses mecanismos de defesa pré-formados estão a presença de escamas nas gemas,

especialmente na região meristemática por onde os patógenos geralmente penetram.

O segundo mecanismo é os pós-formados, ou defesa induzida (Mylne et al., 2010), regulado pela interação da planta e fungo dentro do tecido vegetal, ou seja, a resistência interna envolve mecanismos de defesa ativados após a infecção (Waller, 1970). Pesquisas que comparam diferentes genótipos quanto à suscetibilidade ao carvão revelam que os genótipos resistentes detectam o patógeno mais rapidamente, o que desencadeia uma reação significativa de reprogramação genética (Peters et al., 2017). Nos genótipos resistentes, logo no início da infecção, ocorre uma resposta inicial vigorosa de oxidação devido ao reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), acompanhada por ajustes no sistema antioxidante. Essas mudanças colaboram para retardar ou dificultar a proliferação do fungo.

A avaliação de variedades resistentes ao carvão é feita pela maioria dos programas de melhoramento mediante inoculação artificial do patógeno na planta (Comstock et al., 1987). Existem variações na metodologia de inoculação. De todos os métodos relatados, a inoculação por imersão, punctura das gemas e o natural são os mais utilizados. Com destaque para o método de punctura, onde uma suspensão de teliósporos é introduzida na planta, rompendo a barreira mecânica por agulhas. (Boldini, 2016). Usada para pré-testagem com o objetivo de eliminar clones altamente suscetíveis, essa técnica permite descartar 60 a 70% dos clones suscetíveis. Também é utilizada para avaliar a resistência ou suscetibilidade de variedades utilizadas como genitoras. Além disso, a técnica possibilita a testagem de um grande número de clones, sendo os resultados obtidos em apenas 6 meses. Isso torna o método viável para programas de melhoramento da cana-de-açúcar que lidam com grandes volumes de material (Matsuoka et al., 1986).

Trabalhos de melhoramento genético têm mostrado resultados promissores na resistência ao carvão em cana-de-açúcar. A resistência ao carvão é uma característica com herdabilidade moderada, apresentando herdabilidade no sentido restrito, entre 0,41 e 0,56 (Wu et al., 1983; Wu et al., 1988; Chao et al., 1990), e no sentido amplo, entre 0,64 e 0,7 (Raboin et al., 2003). Gao et al., (2022) indicaram um forte controle genético da resistência, com herdabilidade de 0,87. Essas evidências

indicam que é possível desenvolver variedades comerciais suficientemente resistentes ao carvão, por meio da seleção cuidadosa de genitores em programas de melhoramento.

O carvão na cana-de-açúcar é um desafio instalado que compromete a produtividade. Compreender os mecanismos de infecção, resistência e disseminação do fungo *S. scitamineum* é essencial para desenvolver estratégias eficazes de controle e criar variedades resistentes. A integração de métodos tradicionais e modernos, incluindo técnicas moleculares avançadas, é fundamental para garantir a sustentabilidade da produção de cana-de-açúcar.

2.3 Modelos epidemiológicos em doenças de plantas e sua importância

A epidemiologia dedica-se a investigar como patógenos e hospedeiros interagem, levando em conta a influência do ambiente e das atividades humanas (Kranz, 1974). Entender essas interações é imprescindível não apenas para compreender a doença, mas principalmente para desenvolver estratégias de controle eficazes, que interrompam o ciclo da doença (Bergamin Filho e Amorim, 1996).

Com o estudo das epidemias, foca-se na análise da progressão das doenças em populações de plantas hospedeiras, considerando tanto os danos absolutos quanto os relativos que estas doenças causam nas colheitas. Além disso, investiga-se o impacto das interações entre a resistência das plantas, as práticas sanitárias, o uso de fungicidas e outras estratégias de controle. Avalia-se também a eficácia técnica e econômica dessas medidas em cada fase dentro dos agroecossistemas. Com isso, desenvolvem-se e aprimoram-se estratégias de controle para assegurar a proteção das culturas. Assim, a epidemiologia conecta estudos de etiologia, fisiologia e ciclos de vida dos patógenos com a aplicação prática de métodos de controle integrado de doenças (Vale et al., 2004).

Para compreender o processo de desenvolvimento de doenças em plantas, é necessário quantificar a doença e analisar os dados resultantes dessa quantificação. O estudo das epidemias é, portanto, essencialmente quantitativo, focando-se nas variações populacionais do patógeno e do hospedeiro e nos fatores que influenciam

essas variações (Madden, 1986). A dinâmica das epidemias pode ser analisada ao longo do tempo e no espaço, utilizando diferentes modelos matemáticos.

No estudo de epidemias, a dinâmica temporal das doenças de plantas é enfatizada, pois o progresso de doenças é frequentemente a manifestação mais facilmente visualizada (Campbell e Madden 1990). Na análise temporal de doenças, a análise da curva de progresso é a melhor representação de uma epidemia e a interpretação do formato dessas curvas e sua intensidade final são fundamentais para se efetuar o manejo de doenças (Bergamin Filho e Amorim 1996). A curva é geralmente traçada com dados acumulados de incidência ou severidade da doença ao longo de um período de tempo (Van der Plank, 1963, apud Amorim e Bergamin Filho, 1991). Em um gráfico é refletida a dinâmica de crescimento das epidemias, capturando em uma única imagem a interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente (Kranz, 1974). A curva de progresso da doença mostra a relação entre a proporção da doença e o tempo. Dependendo do modelo utilizado, essa curva pode indicar diversos parâmetros, como o início da epidemia, a quantidade inicial de inóculo, a velocidade de desenvolvimento da doença, o formato da curva, a área sob a curva, as quantidades máxima e final de doença, e a duração da epidemia (Bergamin Filho, 1995).

A análise do progresso de doenças em plantas frequentemente utiliza modelos matemáticos para descrever e prever a dinâmica das infecções. Os modelos mais comumente empregados incluem o modelo exponencial, o modelo logístico, o modelo de Gompertz e o modelo monomolecular. Cada um desses modelos oferece uma perspectiva distinta sobre a taxa de progresso e o comportamento da epidemia ao longo do tempo (Bergamin Filho e Amorim, 1996). Os modelos de crescimento populacional mencionados, também são chamados de "modelos biológicos" (Madden, 1986). Isso ocorre porque, na sua formulação, eles consideram o impacto dos aspectos biológicos da doença no progresso das epidemias.

O modelo exponencial assume que a taxa de infecção é constante ao longo do tempo, e é frequentemente utilizada para descrever o estágio inicial de uma epidemia, onde a propagação da doença ainda não é limitada por fatores como a disponibilidade de hospedeiros suscetíveis. O modelo logístico considera que a taxa

de infecção diminui à medida que a epidemia avança, refletindo a limitação dos recursos, como a diminuição do número de hospedeiros suscetíveis (Van der Plank; Amorim e Bergamin Filho, 1991). Semelhante ao modelo logístico, o modelo de Gompertz também descreve uma taxa de infecção decrescente, mas com uma desaceleração mais gradual. Ele é especialmente útil para doenças que apresentam uma fase inicial rápida e uma longa fase de estabilização (Kranz, 1974). O modelo monomolecular é utilizado para doenças que seguem uma progressão linear em relação ao tempo (Van der Plank, 1993; Amorim e Bergamin Filho, 1991). Este modelo é menos comum, mas pode ser aplicável em situações onde a infecção progride de maneira constante e previsível (Bergamin Filho e Amorim, 1996).

A análise das epidemias envolve o ajuste das curvas de progresso da doença utilizando modelos baseados em regressões não lineares (Cornell e Berger, 1987). Outra abordagem consiste em transformar a porcentagem de doença em logito ou gompito, seguida pela aplicação de uma regressão linear nos pontos transformados. A partir desses ajustes, as retas resultantes são descritas por parâmetros como r , que representa a taxa aparente de infecção, e Y_0 , correspondente ao inóculo inicial (Van der Plank, 1963), permitindo a caracterização das epidemias com base nesses valores.

Segundo Amorim et al. (1993), no caso específico do carvão da cana-de-açúcar, a análise das curvas de progresso é particularmente complexa devido ao padrão duplo-sigmóide que caracteriza a doença, resultante de pelo menos dois ciclos de infecção anual do fungo *S. scitamineum*. Esse padrão é marcado por duas ondas distintas de produção de chicotes, o que dificulta sua análise com modelos tradicionais. Amorim e Bergamin Filho (1991) propuseram a subdivisão dessas curvas em duas partes para facilitar a análise. A primeira fase, ou onda, da curva ajustou-se bem ao modelo monomolecular, enquanto a segunda fase foi mais bem descrita pelo modelo logístico. Essa abordagem, embora eficaz, ainda apresenta limitações na compreensão completa do progresso anual da doença.

Para superar essas limitações, desenvolveu-se uma função matemática que generaliza os modelos monomolecular, logístico e Gompertz, permitindo a descrição da curva anual de progresso do carvão sem a necessidade de subdivisões (Amorim et al., 1993). Essa função considera a curva de progresso da doença como um único

processo com uma taxa de infecção variável, expressa por uma função parabólica de tempo (Hau et al., 1993). Essa inovação não apenas simplifica a análise, mas também melhora a precisão das previsões epidemiológicas, oferecendo uma visão mais integrada do ciclo da doença e suas interações com os genótipos de cana-de-açúcar.

Embora os modelos sejam simplificações da realidade e dificilmente consigam representar com precisão os fenômenos naturais, são uma das poucas ferramentas eficazes para comparar epidemias, distinguir variedades, avaliar tratamentos fungicidas e técnicas de manejo. Além disso, os modelos matemáticos ajudam na previsão de epidemias e na quantificação de danos e perdas (Bergamin Filho, 1995).

2.4 Marcadores Moleculares no melhoramento da cana-de-açúcar

Os marcadores moleculares são um dos tipos de marcadores genéticos utilizados para analisar as variações genéticas entre dois ou mais indivíduos (Serrote et al., 2020). Eles oferecem uma ampla representação do genoma, não são afetados por fatores ambientais e funcionam independentemente do estágio de desenvolvimento da planta (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A cana-de-açúcar, sendo uma planta de importância econômica global, tem se beneficiado enormemente da aplicação de marcadores moleculares em seus programas de melhoramento. A complexidade do seu genoma, devido à sua natureza poliplóide e interespecífica, torna a identificação e a manipulação genética um desafio significativo.

Os marcadores moleculares oferecem diversas vantagens aos programas de melhoramento. Primeiramente, eles são altamente precisos e podem detectar variações genéticas que não são aparentes fenotipicamente. Outro benefício é a capacidade de realizar seleções múltiplas simultaneamente, como resistência a doenças e características de produtividade (Barbosa et al., 2005).

Permitem a triagem precoce de plantas jovens para características desejáveis, economizando tempo e recursos significativos. Além disso, permitem a compreensão da base genética da resistência a doenças, o que é crucial para desenvolver variedades resistentes (Costet et al., 2012), como no caso do carvão (*S. scitamineum*). Há diferentes tipos de marcadores moleculares, que se distinguem

pela tecnologia empregada para revelar a variabilidade, pela capacidade de identificar diferenças entre indivíduos, bem como pelo custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Dentre esses, os SSR (Simple Sequence Repeat) se destacam por seus altos níveis de polimorfismo, ampla cobertura do genoma e elevada reprodutibilidade (Caixeta et al., 2009). Esse tipo de marcador permite a identificação precisa de loci genéticos associados a características desejáveis, facilitando a seleção assistida por marcadores (MAS) (Hu et al., 2018).

Os SSRs são sequências de DNA compostas por um padrão de um a seis nucleotídeos que se repetem consecutivamente entre 5 a 100 vezes por local (Weber e May, 1989). O polimorfismo desses marcadores resulta da variação no número de repetições em um mesmo locus, originada por inserções ou deleções de um ou mais motivos, que podem ocorrer devido a um deslizamento da DNA polimerase na região de repetição ou a um crossing over desigual (Ellegren, 2004).

Os SSRs podem ser isolados de bibliotecas genômicas, onde diversos clones são submetidos a sondas baseadas em repetições para identificar fragmentos contendo SSR, os fragmentos hibridizados são então sequenciados, o que permite a construção de primers específicos para os SSRs (Jones et al., 2009). Além disso, eles podem ser facilmente obtidos a partir de bancos de dados públicos que armazenam sequências expressas de DNA, sendo conhecidos como SSR gênicos ou EST-SSR. Nesse caso, a identificação de sequências repetitivas é realizada por meio de programas computacionais, oferecendo uma abordagem simples, rápida e econômica para desenvolver primers de SSR. No Brasil, o projeto Sucest (Sugarcane Expressed Sequence Tag Project) gerou um dos mais completos bancos de dados de sequências expressas (EST) para cana-de-açúcar no mundo, reunindo 291.904 sequências organizadas em 43.141 clusters, dos quais 2.005 contêm SSRs (Pinto et al., 2006).

Embora a técnica de SSR tenha caráter codominante, em indivíduos poliploides como os do gênero *Saccharum* spp., não é possível determinar o número exato de cópias ou doses de cada alelo, sendo identificados apenas os diferentes tipos de alelos presentes no loco analisado (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Cordeiro et al., 2000). Dessa forma, no caso de *Saccharum* spp., os marcadores SSR são considerados de caráter dominante. A leitura e a pontuação em um experimento de

eletroforese de SSR são realizadas com base na presença (1) ou ausência (0) das marcas para cada indivíduo no gel, o que reflete seu haplótipo (Hoang et al., 2015).

A avaliação da estrutura genética de populações de cana-de-açúcar usando marcadores moleculares é fundamental para entender a diversidade genética e a estrutura populacional. Essa informação é crucial para a gestão de recursos genéticos e para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento eficazes. Estudos têm mostrado que a diversidade genética dentro das populações de cana-de-açúcar pode ser significativa, e a utilização de marcadores moleculares como SSR tem permitido a caracterização detalhada dessa diversidade (Besse et al., 1998; Gao et al., 2016).

2.5 Estrutura genética de populações

Estrutura de população refere-se a presença de subgrupos diferenciados geneticamente na população original, ou seja, esses subgrupos são formados devido às diferenças sistemáticas na ancestralidade dos indivíduos que compõem a população (Aistle e Balding 2009). Em espécies domesticadas, a estrutura de população pode ser influenciada pela história natural das populações dos ancestrais, quanto pelas práticas de melhoramento utilizadas ao longo do tempo (Garris et al., 2005).

Existem várias metodologias genético-estatísticas para inferir a estrutura populacional. Um dos métodos mais amplamente usados, especialmente em estudos com humanos, animais e plantas, foi proposto por Pritchard et al. (2000) e implementado no software STRUCTURE. Esse método utiliza um algoritmo bayesiano para analisar as amostras, empregando marcadores genéticos não ligados (Pritchard et al., 2000) ou fracamente ligados (Falush et al., 2003) para iterativamente inferir o número mais provável de populações distintas dentro de um grupo de indivíduos. A inferência pode ser realizada através de um modelo de não-mistura, onde os indivíduos são atribuídos exclusivamente a uma determinada população, ou um modelo de mistura, onde os indivíduos podem ter proporções genômicas de diferentes populações. Aplicações desse método têm sido utilizadas em estudo de estrutura de população de plantas cultivadas, tais como batata

(D'hoop et al., 2010), tomate (Sim et al., 2011), cevada (Castillo et al., 2010), entre outras. Na cana-de-açúcar, este método também tem sido muito empregado, ajudando a identificar grupos geneticamente distintos dentro da população.

A maioria dos estudos sobre estrutura populacional revela que a presença de subgrupos tende a coincidir com a genealogia ou com a classificação botânica das espécies, tendo pouca relação com a origem geográfica dos acessos. Por exemplo, Wei et al. (2006) investigaram a estrutura populacional e sua influência na associação entre marcadores genéticos e resistência a doenças como podridão radicular, carvão e escaldadura em um painel de 154 acessos genotipados com 1068 marcadores AFLPs e 141 SSRs. Utilizando o software STRUCTURE, detectaram oito subpopulações, sendo que essa classificação coincidiu com a estrutura genealógica do painel analisado. Por sua vez, Jannoo et al. (1999) mostraram que não há evidências de que a diversidade genética entre uma coleção de clones de *S. officinarum* tenha relação com a distribuição geográfica.

A diversidade genética dentro de uma população é um fator crucial para a resistência a doenças e para a adaptação a diferentes condições ambientais. A análise da estrutura genética permite a identificação da variabilidade genética existente entre os genótipos de cana-de-açúcar, revelando a presença de alelos raros ou únicos que podem conferir resistência a doenças, como o carvão. Estudos demonstram que uma maior variabilidade genética está frequentemente associada a uma maior capacidade de resposta a pressões seletivas, incluindo a resistência a patógenos (McDonald e Linde, 2002).

A identificação de subpopulações e a compreensão da estrutura são passos essenciais para o mapeamento associativo, também conhecido como estudos de associação genômica ampla (GWAS). Esse mapeamento permite a detecção de loci de características quantitativas (QTLs) associadas à resistência a doenças. Uma vez identificados, esses loci podem ser utilizados em programas de seleção assistida por marcadores (MAS), acelerando o processo de melhoramento genético ao permitir a seleção direta de genótipos portadores de alelos favoráveis (Chang et al., 2016).

A análise da estrutura genética também é vital para a preservação da diversidade genética. Em programas de melhoramento genético, é essencial evitar a

consanguinidade, que pode levar à depressão endogâmica e à perda de variabilidade genética.

A avaliação da estrutura genética de painéis de genótipos é uma etapa fundamental em estudos de associação genômica ampla, pois diferenças na composição genética entre subpopulações podem gerar associações espúrias se não forem devidamente consideradas (Pritchard et al., 2000). A presença de subgrupos geneticamente diferenciados dentro de uma população pode influenciar diretamente os resultados, levando a correlações não genuínas entre marcadores e características fenotípicas. Assim, a avaliação da estrutura genética é essencial para garantir que as associações identificadas reflitam verdadeiramente as relações entre os marcadores genéticos e os fenótipos de interesse e a utilização de ferramentas como o software STRUCTURE e a aplicação de metodologias estatísticas avançadas são essenciais para alcançar esses objetivos.

REFERÊNCIAS

- Amorim L, Bergamin Filho A (1991) Sugarcane smut development models: I. Annual curves of disease progress / Modelle der Entwicklung des Zuckerrohrbrandes. I. Jahreskurven des Krankheitsverlaufs. **Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection**, 98:605–612
- Amorim L, Bergamin Filho A, Hau B (1993) Analysis of progress curves of sugarcane smut on different cultivars using functions of double sigmoid pattern. **Phytopathology**, 83:933-936.
- Antoine R (1961) Smut. In: Martin JP, Abbott EV, Hughes CG (Eds.) **Sugar-cane Diseases of the World**. Amsterdam: Elsevier, p. 327-354.
- Astle W, Balding D (2009) Population structure and cryptic relatedness in Genetic association studies. *Statistical science*, **Hayward**, 24:451-471.
- Barbosa MHP, de Resende MDV, Bressiani JA, da Silveira LCI, Peterlini LA (2005) Selection of sugarcane families and parents by Reml/Blup. **Crop Breed Appl Biotechnol**, 5:443–450.
- Bedendo IP (1999) Carvões. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 881-888.
- Bergamin Filho A (1995) Curvas de progresso da doença. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 602-625.

Bergamin Filho A, Amorim L (1996) Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 299p.

Bergamin Filho A, Amorim L, Cardoso CON, Sanguino A, Irvine JE, Silva WM (1987) **Carvão da cana-de-açúcar e sua epidemiologia**. Boletim Técnico Copersucar, Piracicaba, p.1-23.

Besse P, Taylor G, Carroll B, Berding N, Burner D, McIntyre C (1998) Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. **Genetica**, 104:143-153.

Boldini JM (2016) **Padronização de métodos para inoculação de *Sporisorium scitamineum* em testes de resistência ao carvão da cana-de-açúcar**. 60 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP.

Bueno CRNC (2010) **Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce**. 68 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Burner DM, Grisham MP (2002) Genetic Resources and Breeding of Sugarcane. **Plant Breeding Reviews**, 22:15-52.

Caixeta ET, Oliveira ACB, Brito GG, Sakiyama NS (2009) Tipos de marcadores moleculares. In: Borém A, Caixeta ET (Eds). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, p. 11-94.

Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 523p.

Castillo A, Dorado G, Feuillet C, Sourdille P, Hernandez P (2010) Genetic structure and ecogeographical adaptation in wild barley (*Hordeum chilense* Roemer et Schultes) as revealed by microsatellite markers. **BMC plant**, 10:266.

Chang HX, Brown PJ, Lipka AE, Domier LL, Hartman GL (2016) Genome-wide association and genomic prediction identifies associated loci and predicts the sensitivity of Tobacco ringspot virus in soybean plant introductions. **BMC genomics**, 17:1-11.

Chao CP, Hoy JW, Saxton AM, and Martin FA (1990) Heritability of resistance and repeatability of clone reactions to sugarcane smut in Louisiana. **Phytopathology** 80:622-626.

Cheavegatti-Gianotto A, De Abreu HMC, et al. (2011) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, 4:62-89.

Comstock JC, Wu KK, Tew TL, Ferreira SA (1987) Sugarcane smut: Comparison of natural infection testing and artificial inoculation. **Hawaii. Plant. Rec.** 60:7.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2024a) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2023/2024**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 21 Abril. 2024.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2024b) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra - 2º levantamento 2024/2025**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 20 dez. 2024.

Cordeiro GM, Taylor GO, Henry RJ (2000) Characterisation of microsatellite markers from sugarcane. **Plant Science**, 155:161–168.

Cornell JA, Berger RD (1987) Factors that influence the value of the coefficient of determination in simple linear and nonlinear regression models. **Phytopathology**, 77:63-70.

Costet L, 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**, 131:637–640.

D'hoop BB, Paulo MJ, Kowitwanich K, Sengers M, Visser RG, van Eck HJ, van Eeuwijk FA (2010) Population structure and linkage disequilibrium unravelled in tetraploid potato. **Theoretical and Applied Genetics**, 121:1151-1170.

Daniels J, Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz DJ (Ed.) **Sugarcane Improvement through Breeding**. Amsterdam: Elsevier, pp. 7–87.

de Moraes LK, Cursi D, et al. (2015) **Melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 40 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 200).

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

Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequence with complex evolution. **Nature Reviews/Genetics**, 5:435-445.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, 164:1567-1587.

FAO (2023). "FAOSTAT Statistical Database." Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 15 dez. 2023

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-Cenargen, 220 p.

Fragoso RB (2015) **Inoculação de *Sporisorium scitamineum* em cariopses de cana-de-açúcar para descarte antecipado de genótipos suscetíveis ao carvão.** 47 f. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Gao S, Yang Y, Wang C, Guo J, Zhou D, Wu Q, Su Y, Xu L, Que Y (2016). Transgenic sugarcane with a cry1Ac gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. **PLoS One**, 11:e0153929.

Gao Y, Zhou S, et al. (2022). Quantitative trait loci mapping and development of KASP marker smut screening assay using high-density genetic map and bulked segregant RNA sequencing in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Frontiers in Plant Science**, 12:796189.

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S (2005) Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. **Genetics**, 169:1631-1638.

Glaszmann IC, Lu YH, Lanaud C (1990) Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane. **Journal of Genetic Breeding**, 44:191-198.

Goldemberg J, Coelho ST, Guardabassi P (2008) The Sustainability of Ethanol Production from Sugarcane. **Energy Policy**, 36:2086-2097.

Grivet L, Daniels C, Glaszmann JC, D'Hont A (2004) A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, 2:9-17.

Hau B, Amorim L, Bergamin Filho A (1993) Mathematical functions to describe disease progress curves of double sigmoide pattern. **Phytopathology**, 83:928-932.

Hauksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford: CAB International, 616p.

Hoang NV, Furtado A, Botha FC, Simmons BA, Henry RJ (2015) Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 3:182.

Hu W, Hua X, et al. (2018). New insights into the evolution and functional divergence of the SWEET family in *Saccharum* based on comparative genomics. **BMC Plant Biology**, 18:270.

Jannoo N, Grivet L, Seguin M, Paulet F, Domaingue R, Rao OS, Dookun A, D'hont A, Glaszmann JC (1999) Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **Theor Appl Genet**, 99:171–184

Jones N, Ougham H, Thomas H, Pasakinskiene I (2009) Markers and mapping revisited: finding your gene. **New Phytologist**, 183:935-966.

Kranz J (1974) The role and scope of mathematical analysis and modeling in epidemiology. In: **Epidemics of plant diseases: mathematical analysis and modeling**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 7-54.

Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, Grof CPL, Bonnett GD, Smith GR (2005) Sugarcane Biotechnology: The Challenges and Opportunities. In **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 41:345-363.

Landell MGA, Bressiani JA (2010) Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 101-155.

Madden LV (1986) Statistical analysis and comparison of disease progress curves. **Plant disease epidemiology**, 1:55-84.

Matsuoka S, Sordi RA, Masuda Y, Arizona H (1986) Reliability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clones. In: Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology, 19:375-385.

McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 40:349-379.

Mylne JS, Wang CK, Van Der Weerden NL, e Craik DJ (2010) Cyclotides are a component of the innate defence of Oldenlandia affinis. **Biopolymers**, May 26.

Peters LP, Carvalho G, Vilhena MB, Creste S, Azevedo RA, Monteiro-Vitorello CB (2017) Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and-susceptible genotypes. **Planta**, 245:749-764.

Pinto LR, Oliveira KM, Marconi T, Garcia AAF, Ulian EC, de Souza AP (2006) Characterization of novel sugarcane expressed sequece tag microsstellites and their comparison whit genomic SSRs. **Plant Breeding, Berlin**, v. 125:378-384.

Pires CELS (1993) **Diversidade genética de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas no Brasil**. 120 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959.

Que Y, Xu L, Wu Q, Liu Y, Ling H, Liu J (2014) Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut. **BMC Genomics**, 15:996

Raboin LM, Hoarau JY, Costet L, Telismart H, Glaszmann JC, D'Hont A (2003) Progress in genetic mapping of sugarcane smut resistance. In: Proceedings of the Annual Congress of the South African Sugar Technologists' Association, Durban, p. 134-141

Rago AM, Casagrande MV, Massola Júnior NS (2009) Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 35:93-97.

Seabra JE, Macedo IC, Leal MRLV (2015) Greenhouse gases emissions related to sugarcane ethanol. In: Cortez LAB **Sugarcane bioetanol - R&D for Productivity and Sustainability**. Editora Edgar Blucher, p. 291-300

Serrote CML, Reiniger LRS, Silva KB, dos Santos Rabaiolli SM, Stefanel CM (2020) Determining the polymorphism information content of a molecular marker. **Gene**, 726:144175.

Sim SC, Robbins MD, van Deynze A, Michel AP, Francis DM (2011) Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Heredity**, 106:927-935.

Stoll M, Piepenbring M, Begerow D, Oberwinkler F (2003) Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Canadian Journal of Botany**, 81:976–984.

The Plant List. Disponível em: <http://www.theplantlist.org>. Acesso em: 11 mai. 2024.

Tokeshi H, Rago AM (2005) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 185-196.

Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L (2004) Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Perfíl Editora, 531p.

Van der Plank JE (1963) Plant diseases: epidemics and control. New York: Academic Press, 349p.

Waller JM (1970) Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya II: Infection and resistance. **Transactions British Mycological Society**, 54:405-414.

Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, 44:388-396.

Wei X, Jackson PA, McIntyre CL, Aitken KS, Croft B (2006) Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure. **Theoretical and Applied Genetics**, 114:155-164.

Wu KK, Heinz DJ, and Meyer HK (1983) Heritability of sugarcane smut resistance and correlation between smut grade and yield components. **Crop Sci.** 23:54-56.

Wu KK, Heinze DJ, and Hogarth DM (1988) Association and heritability of sugarcane smut resistance to races A and B in Hawaii. **Theor. Appl. Genet.** 75:754-760.

Xavier MA (2011) **Ponto de mérito de família, parâmetros genéticos e identificação de genitores masculinos em policruzamentos de cana-de-açúcar.**

92 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.

CAPÍTULO 2 – Avaliação da reação de genótipos de cana-de-açúcar ao carvão (*Sporisorium scitamineum*) em casa de vegetação e a campo

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do ponto de vista econômico, principalmente no Brasil, que é o maior produtor mundial desta cultura. O carvão da cana-de-açúcar, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.), é uma doença que provoca grandes perdas econômicas na cultura. O presente estudo investigou a reação de 165 genótipos de cana-de-açúcar à infecção pelo carvão em condições de casa de vegetação e comparou os resultados com os obtidos no campo, ambos usando o método de punctura. Os genótipos foram avaliados semanalmente em um período de 198 dias para determinar a incidência da doença (emissão de chicote). A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e a área abaixo da curva de progresso da doença em relação ao genótipo mais suscetível (AACPDR) foram calculadas, assim como a herdabilidade em sentido amplo (h^2). O coeficiente de correlação de Spearman (r^2) foi empregado para verificar a correlação entre a expressão da doença observada na estufa e a observada no campo. A incidência de carvão variou de 0% a 88%, e os valores de AACPD variaram de 0 a 2629 para os 165 genótipos. Com base na AACPDR, 54 genótipos foram classificados como apresentando alta resistência. A correlação observada entre a expressão da doença na casa de vegetação e no campo foi positiva e moderadamente forte (r^2 de 61%), e o valor h^2 em casa de vegetação foi de 74%. O método de punctura demonstrou ser uma abordagem eficaz para a identificação de genótipos suscetíveis apontando genótipos potencialmente resistentes ao carvão. Além disso, a triagem de genótipos de cana-de-açúcar em condições de estufa pode ser uma estratégia eficaz para eliminar genótipos suscetíveis, evitar a disseminação de esporos de carvão durante a avaliação da doença e acelerar a seleção de genótipos resistentes ao carvão em programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: fitopatologia, melhoramento genético, *Saccharum* spp., *Sporisorium scitamineum*.

CHAPTER 2 – Evaluation of sugarcane genotypes' reaction to smut (*Sporisorium scitamineum*) in greenhouse and in the field

ABSTRACT - Sugarcane is one of the most economically important crops, especially in Brazil, the world's largest producer of this crop. Sugarcane smut, caused by the fungus *Sporisorium scitamineum* (Syd.), is a disease that leads to significant economic losses in the crop. This study investigated the response of 165 sugarcane genotypes to smut infection under greenhouse conditions and compared the results with those obtained in the field, both using the puncture method. The genotypes were evaluated weekly over a period of 198 days to determine disease incidence (whip emission). The area under the disease progress curve (AUDPC) and the relative area under the disease progress curve in relation to the most susceptible genotype (RAUDPC) were calculated, as well as broad-sense heritability (h^2). Spearman's correlation coefficient (r^2) was used to assess the correlation between disease expression observed in the greenhouse and in the field. Smut incidence ranged from 0% to 88%, and AUDPC values ranged from 0 to 2629 for the 165 genotypes. Based on RAUDPC, 54 genotypes were classified as highly resistant. The observed correlation between disease expression in the greenhouse and in the field was positive and moderately strong (r^2 of 61%), and the h^2 value in the greenhouse was 74%. The puncture method proved to be an effective approach for identifying susceptible genotypes, indicating potentially resistant genotypes to smut. Additionally, screening sugarcane genotypes under greenhouse conditions may be an effective strategy to eliminate susceptible genotypes, prevent smut spore dissemination during disease evaluation, and accelerate the selection of smut-resistant genotypes in sugarcane breeding programs.

Keywords: genetic breeding, phytopathology, *Saccharum* spp., *Sporisorium scitamineum*.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das culturas agrícolas mais importantes e amplamente cultivadas em todo o mundo. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, com 713,2 milhões de toneladas e cerca de 8,33 milhões de hectares, safra 2023/2024 (CONAB, 2024). Da cana-de-açúcar são obtidos o açúcar, etanol, energia elétrica e outros subprodutos industriais.

Entre as principais doenças fúngicas que podem afetar a produtividade e qualidade da matéria prima, levando a danos econômicos, está o carvão da cana-de-açúcar, cujo agente causal é o *Sporisorium scitamineum* (Syd.). O carvão da cana-de-açúcar foi identificado pela primeira vez em Natal, na África do Sul, em 1877 (Antoine, 1961). Disseminado globalmente, no Brasil foi observado pela primeira vez em 1946, na região de Assis, São Paulo (Rago et al., 2009). Canas infectadas por *S. scitamineum* têm o meristema apical modificado, designado como “chicote”, principal sinal de identificação da doença. Além de chicotes, ocorre redução no diâmetro e super brotações de perfilhos. A disseminação ocorre principalmente por esporos, transportados pelo vento, chuva, homem e insetos (Hoy et al., 1991).

A cana-de-açúcar apresenta dois tipos de resistência, (i) resistência constitutiva, governada pela barreira estrutural da escama da gema e/ou secreção química da gema, e (ii) resistência induzida, regulada pela interação das plantas e fungo, dentro do tecido vegetal (Waller, 1970). A resistência constitutiva é avaliada pelo método de imersão, no qual as hifas de *S. scitamineum* não conseguem penetrar na epiderme devido a modificações estruturais e bioquímicas na parede celular da planta hospedeira, como acúmulo de lignina e compostos fenólicos (Marques et al., 2018). A resistência induzida é avaliada pelo método de punctura (Burner et al., 1993; McNeil et al., 2018), onde uma suspensão de teliósporos é introduzida na planta, rompendo a barreira mecânica por agulhas, e é regulada por várias respostas de defesa induzidas na cana-de-açúcar. Este método é mais indicado para selecionar genitores resistentes, que possuem resistência genética (Boldini, 2016).

A avaliação de cultivares comerciais, clones e acessos de germoplasma quanto à resistência ao carvão tem sido adotada pelos programas de melhoramento da Austrália, Indonésia e Japão (Croft et al., 2008a). Nesses programas através de inoculações artificiais têm-se usado avaliações de campo para identificar genótipos resistentes e têm obtido sucesso cruzando genitores resistentes para conferir resistência às progênes (de 64 para 11%) (Croft et al., 2008a; Croft et al., 2008b).

Os ensaios em casas de vegetação oferecem vantagens como avaliações de um maior número de genótipos, sob condições ambientais controladas e de contenção, reduzindo a disseminação de esporos. Embora a resistência observada nessas condições possa não refletir completamente a resistência a campo, os experimentos em casas de vegetação são um primeiro passo para eliminar os genótipos mais suscetíveis e identificar os mais promissores para resistência ao carvão. Essa abordagem permite avaliar a resposta dos genótipos em apenas seis meses, sendo viável para programas de melhoramento de cana-de-açúcar que lidam com grande quantidade de genótipos (Matsuoka et al., 1986).

As avaliações de resistência ao carvão consideram a incidência da doença, medida pelo número de perfilhos com chicotes ou de plantas infectadas por parcela (Hoepers et al., 2024). Além disso, parâmetros epidemiológicos como a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) (Campbell e Madden, 1990; Singh et al., 2005; Que et al., 2006; Olweny et al., 2008) permitem verificar o comportamento da doença ao longo do tempo. Enquanto a incidência mede apenas a porcentagem de plantas infectadas, a AACPD resume o progresso da doença em um único valor, levando em consideração tanto a incidência quanto a gravidade da doença ao longo do tempo.

No presente estudo, a reação de 165 genótipos de cana-de-açúcar ao carvão (*S. scitamineum*), foi avaliada em casa de vegetação e em campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação e, para verificar a correspondência, os genótipos foram também, avaliados a campo. Os ensaios foram estabelecidos e conduzidos nas dependências do Centro de Cana do Instituto

Agrônomo – IAC/APTA, em Ribeirão Preto-SP, no período de março de 2022 a maio de 2023. Antes do estabelecimento dos ensaios, um painel de genótipos foi previamente definido.

2.1 Painel de genótipos

O painel consistiu em 165 genótipos, incluindo clones e variedades comerciais do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cultivares comerciais dos programas de melhoramento genético da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Nussel e acessos de *Saccharum spontaneum*. A seleção dos genótipos baseou-se em informações prévias sobre a resposta ao carvão, provenientes de observações de campo e da literatura (resistentes e suscetíveis), visando incluir cultivares com variabilidade genética para essa característica.

2.2 Casa de vegetação

2.2.1 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições. Cada parcela experimental foi constituída por 50 gemas, totalizando 150 gemas por genótipo. Os genótipos SP80-3280 e IAC6-66 foram utilizados como padrões de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

As gemas de cada genótipo foram individualizadas a partir de colmos de 10 meses de idade, previamente selecionados para uniformidade e qualidade, seguindo a metodologia de mudas pré-brotadas (MPB) (Landell et al., 2012). Antes do plantio, as gemas foram submetidas à inoculação artificial pelo método da punctura.

2.2.2 Obtenção do inóculo e teste de viabilidade

Os teliósporos de *S. scitamineum* foram coletados de uma área experimental previamente infectada com carvão no Centro de Cana. Os chicotes foram secos em estufa a 38°C por quatro horas, peneirados (peneira de 200 mesh), acondicionados em sacos plásticos permeáveis, identificados e armazenados em vidros com sílica gel para manter a viabilidade dos teliósporos (Mata, 1975). A viabilidade biológica dos teliósporos de *S. scitamineum* foi avaliada mediante testes de germinação em meio de cultivo ágar-água a 1% (p/v). Para isso, uma suspensão contendo 150 µL de teliósporos diluídos 10^5 esporos/mL foi aplicada em lâminas usando uma pipeta, obtida a partir de uma amostra com concentração de 10^5 /mL teliósporos, contada em câmara de Neubauer. As lâminas foram então colocadas em uma placa de Petri com algodão umedecido, cobertas por lona escura e incubadas em estufa B.O.D. a 28°C por sete horas. Considerou-se germinado o teliósporo cujo tubo germinativo ultrapassou ou igualou o seu diâmetro médio. Foram realizadas quatro avaliações sob microscópio, tomando-se como referência 100 teliósporos para cada uma das lamínulas justapostas sobre o meio de cultivo, e em seguida, determinada a porcentagem de germinação, considerando viável uma porcentagem mínima de 90%.

2.2.3 Inoculação

As gemas individualizadas foram inoculadas pelo método de punctura (Matsuoka et al., 1986; Ferreira e Comstock, 1989). Preparou-se uma suspensão de esporos a $4,5 \times 10^5$ esporos/mL, com germinação acima de 90%, em cadinho esterilizado (0,2 g de teliósporos, 1,5 mL de água destilada e 2 µL de Tween 80 a 10 %). Cada gema foi levemente perfurada com auxílio de uma agulha hipodérmica medindo 25 x 0,70 mm, em ambas as laterais, preservando o polo germinativo (Figura 1a). Após a inoculação, em casa de vegetação, as gemas foram plantadas em bandejas plásticas de 50 células, em formato quadrado com volume de 136 mL cada, contendo substrato composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduo orgânico agroindustrial classe A e calcário (Carolina Soil Classe XVI) (Figura 1b), e

colocado em câmara de brotação a 30 °C e umidade relativa acima de 85% por 48 horas para germinação dos teliósporos e infecção. Após esse período, modificou-se a temperatura para 35°C para promover a brotação das gemas, durante 10 dias (Figura 1c). Posteriormente, as bandejas foram transferidas para a casa de vegetação, com irrigação por aspersão durante 15 minutos, duas vezes ao dia, onde permaneceram até ao final das avaliações (Figura 1d).

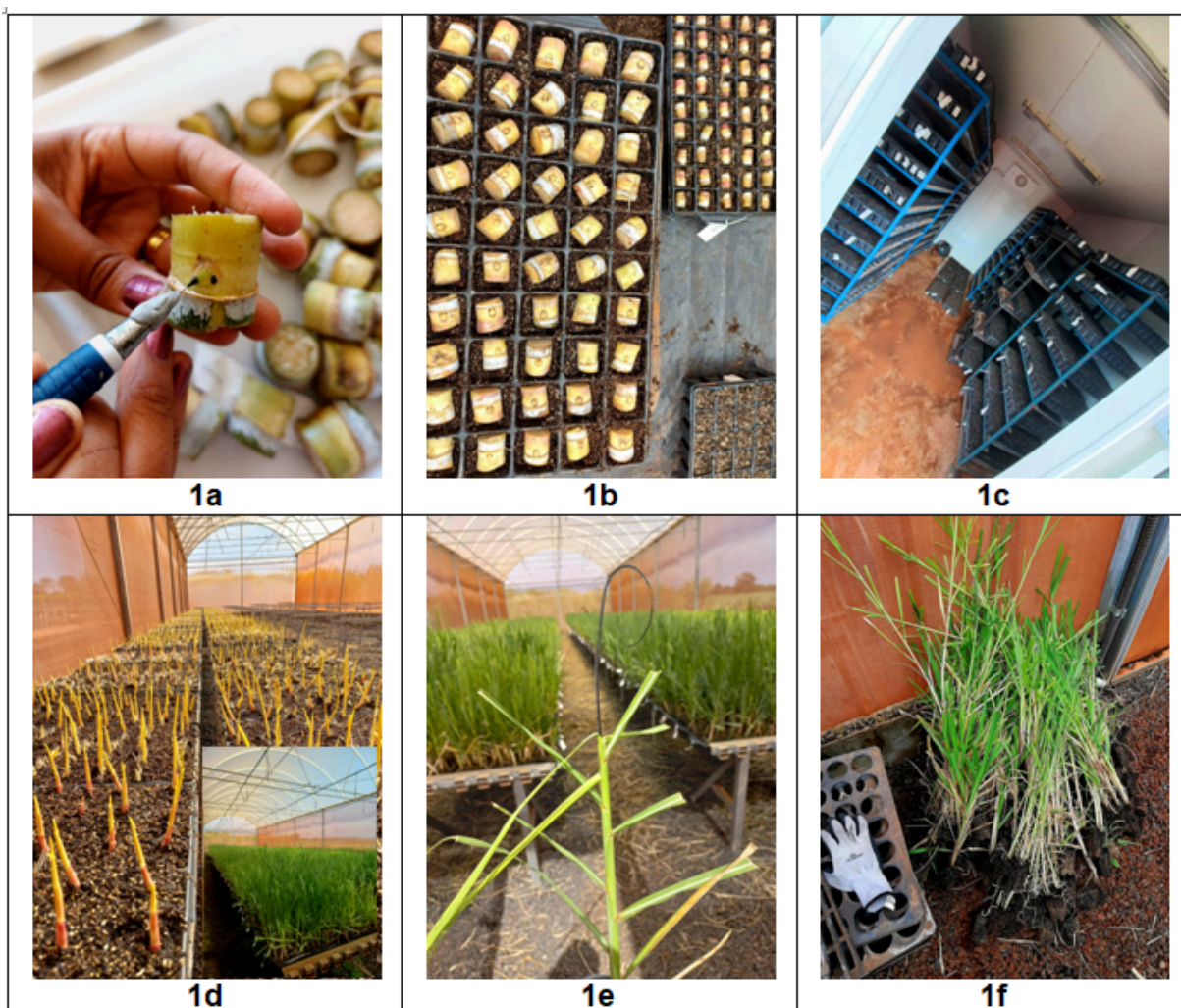


Figura 1. Ensaio em casa de vegetação. (a) inoculação das gemas; (b) gemas inoculadas plantadas em bandejas de 50 células; (c) Câmara de brotação; (d) disposição do ensaio na casa de vegetação; (e) Presença de chicotes; (f) remoção de genótipos infectados.

2.2.4 Avaliação da incidência de chicotes

As avaliações iniciaram dois meses após o plantio das gemas, quando os primeiros sinais da doença surgiram nos genótipos, e continuaram semanalmente até 198 dias após o início das avaliações. Foi avaliada a presença de chicotes nos genótipos (Figura 1e). A cada avaliação, os genótipos com chicotes foram removidos da casa de vegetação e descartados para prevenir infestações secundárias (Figura 1f).

A incidência da doença (% de plantas com chicote) foi calculada levando em consideração o número de plantas com chicote pelo número total de plantas de cada parcela, a saber:

Incidência da doença (%) = (N° de plantas com chicote/total de gemas brotadas) x 100.

2.2.5 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD)

De posse aos levantamentos semanais sobre a incidência de chicotes, calculou-se a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença – AACPD, conforme a equação de Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

em que: AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; y_i = proporção da doença na i -ésima observação, t_i = tempo na i -ésima observação (em dias); e n = número total de observações em um tempo t .

A AACPD foi calculada em cada avaliação até o final do ciclo de leituras do experimento (maio de 2023). Esses cálculos foram usados para estimar parâmetros genéticos, incluindo variância genética e ambiental, e herdabilidade no sentido amplo, utilizando o pacote VCA (Variance Component Analysis) do software R versão 4.2.3. A herdabilidade foi calculada para o sentido amplo de plantas individuais, seguindo a equação:

$$h^2 = \frac{V_G}{(V_G + V_E)}$$

onde h^2 é a herdabilidade no sentido amplo de plantas individuais, V_G é a variância genotípica e V_E é a variância ambiental.

2.2.6 Classificação dos genótipos quanto à resistência à *S. scitamineum*

Para classificar os genótipos quanto à resistência à *S. scitamineum*, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD), considerando o genótipo mais suscetível do painel como referência. A AACPD de cada genótipo foi dividida pela AACPD do genótipo mais suscetível e multiplicada por 100. Isso resultou em valores de 0 a 100 %, onde 0 % indica alta resistência e 100 % indica suscetibilidade semelhante à do genótipo mais suscetível. Com esses dados, foram estabelecidos intervalos de AACPD relativos às seguintes classes de reação dos genótipos ao carvão: altamente resistente (0%), resistente (0,1% a 5%), moderadamente suscetível (5,1 a 20%) e suscetível (>20%).

As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico R, com a análise de variância dos fatores avaliados realizada à nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para normalizar os dados, foi realizada uma transformação utilizando o logaritmo neperiano ($\ln$), a partir da fórmula $\ln(x+5)$, onde “x” representa o valor a ser transformado.

2.3 Ensaio a Campo

Para o experimento a campo, foram utilizados os 165 genótipos previamente inoculados conforme descrito nos itens 2.2.2 a 2.2.3. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições, sendo cada parcela constituída por quatro plantas espaçadas entre si por 0,5 m e 1,5 m entre linhas, totalizando 12 plantas por genótipo. Antes do transplante, as mudas passaram pelo processo de aclimação (preparação das mudas para as condições adversas do campo) durante dois meses. O experimento foi conduzido sem instalação de sistema de irrigação, o suprimento hídrico ocorreu exclusivamente por precipitação pluvial durante o período experimental. Após o transplante, os genótipos foram avaliados quanto aos sinais da doença conforme descrito em 2.2.4 no período entre novembro de 2022 a maio de 2023 (Figura 2). A correlação de Spearman foi calculada para determinar a relação entre os dados de incidência entre o campo e a casa de vegetação. As cultivares

SP80-3280 e IAC6-66 foram usadas como padrões de resistência e suscetibilidade, respectivamente.

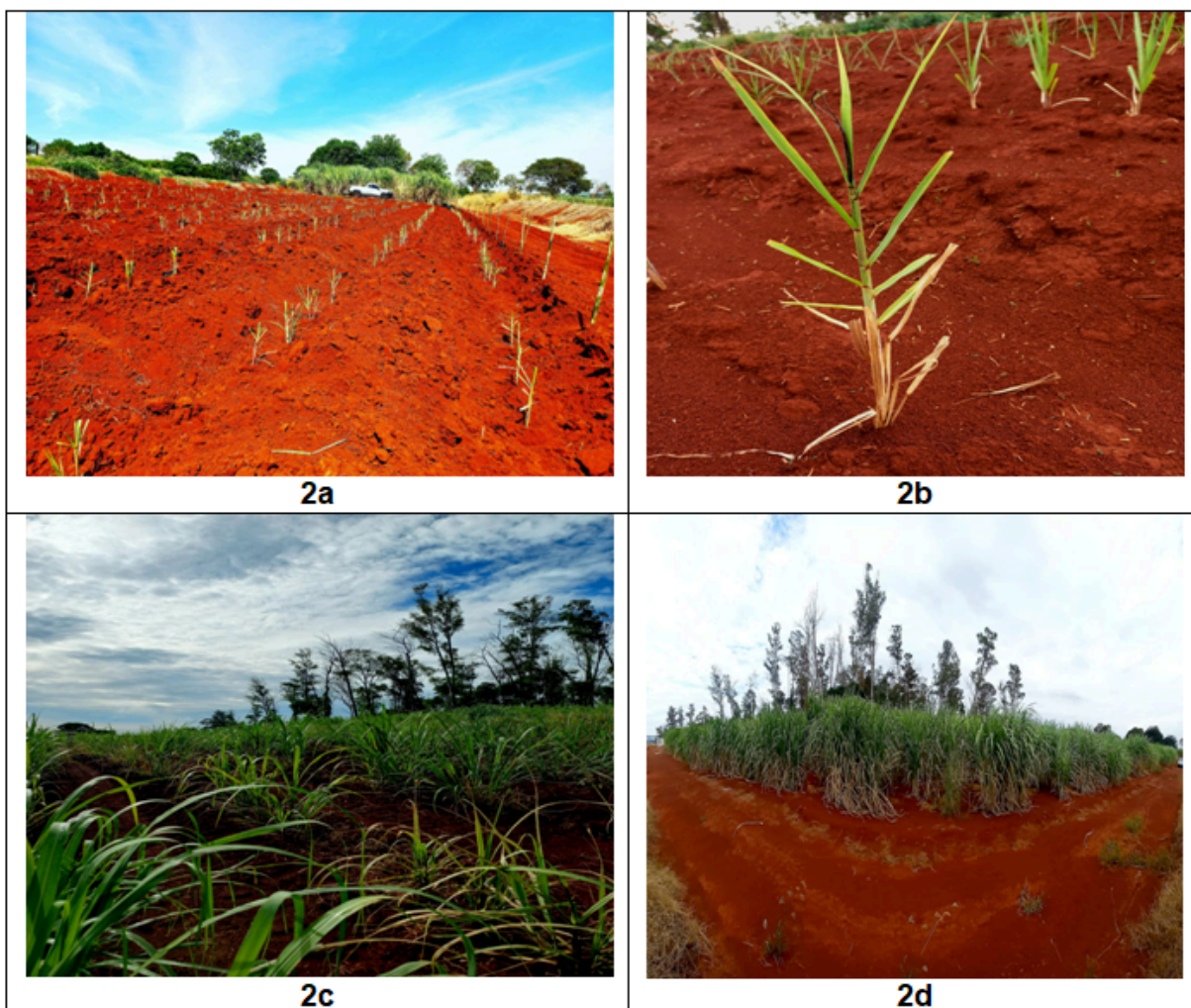


Figura 2. Ensaio a campo. (a) transplante dos genótipos a campo; (b) presença de chicotes; (c) e (d) disposição do ensaio no campo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Incidência de carvão em casa de vegetação

A avaliação da incidência de carvão em casa de vegetação revelou uma variação de 0 a 88%, com uma média de 9,5%, indicando uma diversidade significativa de respostas entre os genótipos testados. A resposta detalhada de alguns genótipos ao longo dos 198 dias de observação, apresentada na Figura 3,

ilustra o comportamento diferencial de incidência entre eles. O genótipo SP80-3280, utilizado como padrão de resistência, manteve-se livre de sintomas durante o período experimental, confirmando sua imunidade à infecção pelo patógeno, em concordância com classificações anteriores (Boldini, 2016). Já o genótipo intermediário SP91-1049 apresentou baixa incidência ao longo do experimento, reforçando a eficácia do método de inoculação por punctura na identificação de níveis variados de resistência entre os genótipos de cana-de-açúcar. A ampla variação na incidência da doença entre os genótipos indica não apenas a efetividade desse método, mas também a adequação do painel genotípico para estudos de mapeamento por associação e para a seleção de genótipos promissores em futuros programas de melhoramento genético, focados em resistência (Silveira, 2016).

Especificamente o genótipo IAC16-2144 alcançou uma incidência de 88%, superando o padrão suscetível IAC6-66, que apresentou 63%. Esse dado é essencial para a identificação de genótipos promissores, pois a compreensão dos diferentes padrões de resistência entre os genótipos orienta estratégias de seleção mais eficazes e potencializa a capacidade de desenvolvimento de cultivares mais robustas.

Ao comparar o surgimento dos primeiros sinais da doença entre o padrão suscetível IAC6-66 e o genótipo com maior incidência, IAC16-2144, observou-se que os primeiros sinais no IAC6-66 apareceram por volta dos 13 dias após o início das avaliações (55 dias após a inoculação, “dai”), atingindo o pico aos 142 dias (188 dai), enquanto no IAC16-2144 os sintomas começaram aos 43 dias (72 dai, com o pico até o 170º dia (216 dai). Além do IAC16-2144, outros nove genótipos se mostraram mais suscetíveis que o padrão suscetível. A Figura 3 destaca seis desses genótipos (IAC16-2134, IACSP04-2503, CO213, IACSP99-4011, IN84-58 e IACCTC05-3616), que apresentaram sintomas em média aos 76 dias após a inoculação, com um pico de incidência até o 150º dia, seguido de estabilização até o final do experimento, no 198º dia. Esse padrão consistente nos genótipos mais suscetíveis reforça a utilidade do método para caracterizar a resistência relativa dos genótipos testados.

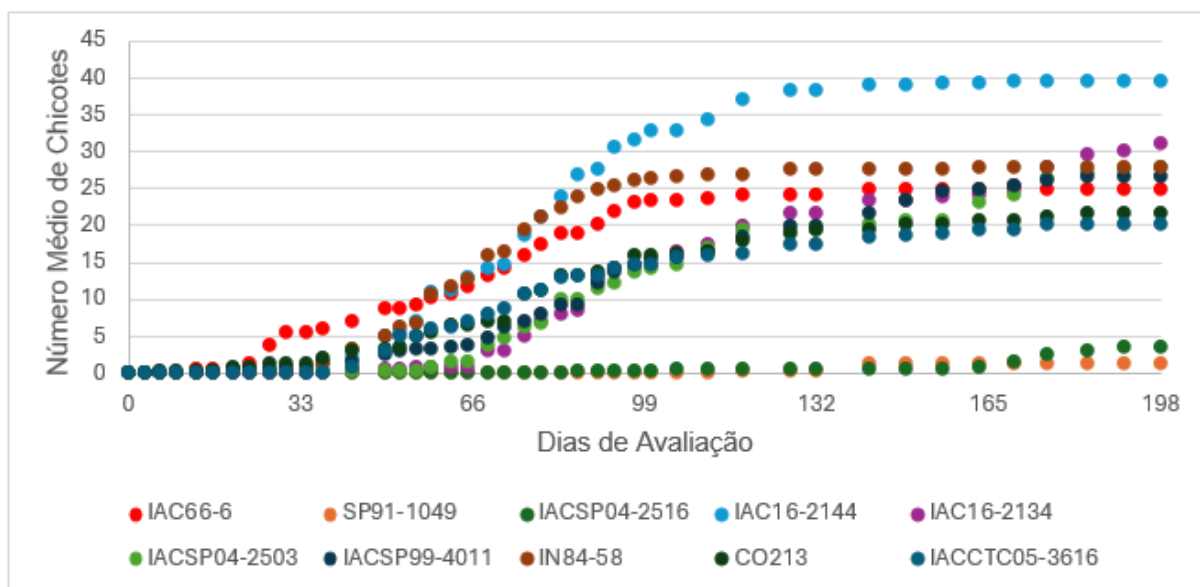


Figura 3. Incidência de *Sporisorium scitamineum* em genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação (ensaio 198 dias). As cores indicam os genótipos.

3.2 Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença em casa de vegetação

A AACPD, reconhecida como um parâmetro epidemiológico essencial, fornece uma medida integrada do progresso da doença ao longo do tempo, sendo indispensável na avaliação da resistência ao carvão em cana-de-açúcar. Esse método tem sólida aplicação em estudos fitopatológicos e é amplamente adotado na avaliação de cultivares de cana (Rago et al., 2009; Moraes, 2013). De acordo com Campbell e Madden (1990), genótipos que manifestam sintomas mais cedo tendem a apresentar maiores valores de AACPD, refletindo a dinâmica de infecção e a interação patógeno-hospedeiro.

No presente estudo, a AACPD aumentou conforme o desenvolvimento da doença, com sintomas mais precoces resultando em valores mais elevados. Conforme ilustrado nos gráficos de incidência (Figura 4) e AACPD (Figura 5) predominou uma baixa manifestação de sintomas, com 144 dos 165 genótipos registrando incidências entre zero e 40%, e a maioria (115) apresentando menos de 10% de infecção. Esses dados estão alinhados com os valores de AACPD observados, nos quais 80% dos genótipos situaram-se entre zero e 500, refletindo uma prevalência significativa de resistência ao carvão. Apenas 11% dos genótipos

apresentaram valores de AACPD em torno de 1000, indicando suscetibilidade moderada.

A distribuição de AACPD nas Figuras 4 e 5 evidencia uma baixa frequência de genótipos com valores elevados, sugerindo uma baixa suscetibilidade ao carvão no painel avaliado. O valor mínimo de AACPD foi zero, indicando ausência total da doença nos genótipos mais resistentes, enquanto o valor máximo, 2629, foi observado no genótipo IAC16-2144, que superou o padrão suscetível IAC6-66 (1369).

A análise de AACPD permite uma comparação robusta entre os genótipos, através dessa análise, foi detectado nesse estudo, uma predominância de resistência no painel. No entanto, a presença de genótipos com valores elevados de AACPD destaca a importância de avaliar não somente a presença, mas o grau de resistência, ao selecionar genótipos para melhoramento. Estudos similares, como o de Silveira (2016), também demonstraram uma distribuição comparável de resistência ao carvão em cana-de-açúcar, reforçando a aplicabilidade e confiabilidade da AACPD como métrica de seleção.



Figura 4. Distribuição dos valores de incidência de *Sporisorium scitamineum* em genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação, representada pelo número de genótipos com valores percentuais de doença.

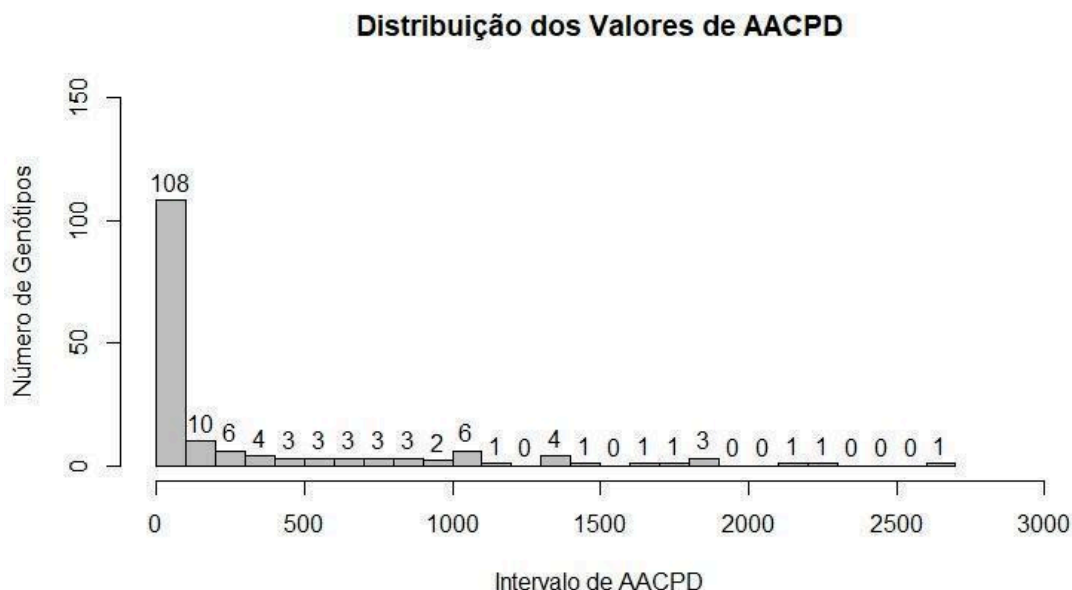


Figura 5. Distribuição dos valores de Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) de *Sporisorium scitamineum* em genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação, representando a frequência de genótipos com os valores de área calculada.

3.3 Classificação quanto à suscetibilidade/resistência pela AACPDR

Os valores de AACPD relativa (AACPDR), calculados em relação ao genótipo suscetível IAC16-2144 no ambiente de casa de vegetação, estão resumidos na Tabela 1. A cultivar padrão suscetível IAC6-66 apresentou um valor de 52%, enquanto os genótipos mais suscetíveis exibiram AACPDR entre 52% e 100%. Por outro lado, 54 genótipos, incluindo a cultivar resistente SP80-3280, não apresentaram sintomas (0% de AACPDR) ao longo do período de avaliação.

Tabela 1. Área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPDR) à IAC16-2144, obtida para 26 genótipos de cana-de-açúcar mais suscetíveis ao *Sporisorium scitamineum* no ensaio em casa de vegetação.

AACPD relativa			
Genótipos	% Relativa	Genótipos	% Relativa
IAC16-2144	100%	NG5712	42%
IAC16-2134	84%	IAC16-2086	41%
IACSP04-2503	84%	IACCTC05-8069	41%

CO213	72%	IAC16-2036	40%
IACSP99-4011	71%	IACSP99-3369	39%
IN84-58	70%	NCO310	39%
IACSP93-3046	65%	IACBIO-275	38%
IACCTC05-3616	64%	IACSP01-8082	37%
IACCTC05-9552	54%	IACBIO-270	37%
IACSP04-5065	52%	IAC16-2014	34%
IAC6-66	52%	IACCTC05-9630	33%
IAC91-1099	52%	RB867515	32%
IJ76-293	51%	IACBIO-271	30%

Com base nesses resultados, foi proposta uma classificação da suscetibilidade ao carvão, organizada em quatro categorias: altamente resistentes (AR), resistentes (R), moderadamente suscetíveis (MS) e suscetíveis (S), conforme mostrado na Tabela 2. O grupo AR foi composto por genótipos sem sintomas (0%), o grupo R incluiu aqueles com a presença da doença em uma escala de 0 a 5%. O intervalo de 6% até 20% foi determinado para os genótipos MS, onde está inclusa a variedade intermediária CO 419 com 6,85%. Todos os genótipos que apresentaram AACPDOR acima de 20% foram classificados como S, incluindo IAC6-66 e IAC16-2144. Dos 165 genótipos avaliados, 54 foram classificados como AR (33%), 60 como R (36%), 18 MS (11%) e 33 como S (20%).

Os grupos AR e R representam candidatos promissores para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao carvão, o que pode reduzir a incidência da doença e as perdas de rendimento. Embora a classificação proposta tenha sido baseada em resultados em casa de vegetação, é crucial testar esses genótipos em diferentes ambientes e condições para validar a resistência, dado que fatores genéticos e ambientais influenciam a resposta ao carvão.

Uma abordagem integrada, combinando triagem em campo, uso de marcadores moleculares e outras ferramentas avançadas, é essencial para o melhoramento eficaz da resistência ao carvão na cana-de-açúcar. A classificação baseada na AACPDOR proporciona um critério prático e robusto para identificar e selecionar genótipos resistentes, contribuindo para a sustentabilidade da produção e a mitigação das perdas de rendimento causadas pela doença.

Tabela 2. Classificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto à reação ao *Sporisorium scitamineum* em casa de vegetação, considerando a área abaixo da curva do progresso da doença relativa a cultivar suscetível IAC16-2144.

Intervalos	Classificação
0%	Altamente Resistentes
0,1% a 5%	Resistentes
5,1% a 20%	Moderadamente Suscetíveis
>20%	Suscetíveis

3.4 Comparação do ensaio em casa de vegetação x Campo

No ensaio de campo, 143 genótipos (87%) apresentaram chicotes, enquanto na casa de vegetação foram observados chicotes em 111 genótipos (67%). Dos 165 genótipos avaliados, 106 (64%) desenvolveram chicotes em ambas as condições. Adicionalmente, 37 genótipos (22%) mostraram chicotes apenas no campo, 5 (3%) apenas na casa de vegetação, e 17 (10,3%) não apresentaram sintomas em nenhuma das condições (Tabela 3). Esses resultados sugerem que ensaios em casa de vegetação são eficazes para a triagem inicial, eliminando genótipos altamente suscetíveis, acelerando a seleção em programas de melhoramento.

A correlação de Spearman entre a incidência de carvão nos ensaios de campo e casa de vegetação foi de 61%, indicando uma correlação positiva e moderadamente forte. Essa correlação reforça a confiabilidade dos ensaios em condições controladas como uma etapa preliminar válida na triagem de resistência ao carvão.

Genótipos que manifestaram chicotes em ambas as condições podem ser descartados, enquanto aqueles sem sintomas em qualquer ambiente representam candidatos prioritários para cruzamentos e outras estratégias de melhoramento. Esse processo aumenta a eficiência da seleção, garantindo que apenas os genótipos mais promissores avancem para ensaios de campo, que são mais dispendiosos e demorados.

Tabela 3. Relação do número de genótipos de cana-de-açúcar com incidência de *Sporisorium scitamineum* e correlação de spearman entre casa de vegetação e campo.

Condição do ensaio	Número de genótipos com carvão
Casa de vegetação	111 (67,27%)
Campo	143 (86,66%)
Casa de vegetação e campo	106 (64,24%) r_s : 61%***
Somente Campo	37 (22,42%)
Somente casa de vegetação	5 (3,03%)
Sem emissão de chicotes (ambas condições)	17 (10,30%)

 r_s coeficiente de correlação de spearman *** $p < 0,0001$

3.5 Parâmetros genéticos

Os parâmetros genéticos para a AACPD, derivados da incidência de carvão em 165 genótipos de cana-de-açúcar avaliados em casa de vegetação, são apresentados na Tabela 4. Diferenças significativas entre os genótipos ($p < 0,05$) indicam variabilidade genética relevante para a resistência ao carvão no painel avaliado, enquanto a ausência de variação significativa entre blocos confirma a uniformidade experimental.

A herdabilidade em sentido amplo foi estimada em 74,70%, sugerindo que grande parte da variação fenotípica observada se deve à variância genética, com um erro experimental de apenas 25,30%. Essa alta herdabilidade indica que a AACPD é um critério eficiente para a seleção de resistência em programas de melhoramento, permitindo explorar a variabilidade genética de forma direcionada (Silva et al., 2001). Sob condições controladas, em casa de vegetação, essa baixa influência ambiental destaca o papel predominante dos fatores genéticos na resposta ao carvão.

Esses resultados corroboram estudos anteriores que também encontraram herdabilidades moderadas para a resistência ao carvão na cana-de-açúcar. Por exemplo, Raboin (2003) relatou herdabilidades de 0,68 e 0,75 a campo, enquanto Silveira (2016) e Moraes (2013) obtiveram valores de 0,57 e de 0,54 a 0,35 em casa de vegetação, respectivamente. Em programas de melhoramento, no Havaí e na Austrália, a seleção intensiva, baseada em resistência ao carvão, duplicou a proporção de plantas resistentes em 4 a 5 anos (Comstock et al., 1983; Croft et al., 2008a).

A seleção de genitores resistentes para cruzamentos têm mostrado resultados expressivos na redução de suscetibilidade ao carvão. No Havaí, essa estratégia reduziu a incidência de mudas suscetíveis de 64% para 11% em cinco anos (Comstock et al., 1983). De modo similar, a indústria australiana aumentou a proporção de genitores resistentes, elevando a frequência de cruzamentos biparentais resistentes de 0,4% para 52% entre 2000 e 2007, o que resultou no dobro de mudas resistentes até 2011 (Bhuiyan et al., 2013; Croft et al., 2008a).

Esses resultados ressaltam o impacto positivo do uso de genótipos resistentes em programas de melhoramento e demonstram o potencial de aumento na resistência ao carvão em cana-de-açúcar ao longo do tempo. A identificação e seleção criteriosa de genótipos superiores são essenciais para o desenvolvimento de variedades mais resistentes, contribuindo para a sustentabilidade e produtividade da cultura.

Tabela 4. Resultados da análise de variância e seus componentes para área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), obtida para 165 genótipos de cana-de-açúcar avaliados quanto à reação ao carvão em casa de vegetação.

Fonte de variação	GL	QM	Pr>Fc	Variância Genética	Variância Ambiental	Herdabilidade
Blocos	2	3,218	0,07897 ^{ns}	3,749	1,269	74,702
Genótipos	164	12,517	0,00000			
Resíduo	328	1,257				
Total	494					
CV (%)	33,63					

GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou a eficácia do método de inoculação por punctura, em casa de vegetação para avaliar a suscetibilidade ao carvão, em genótipos de cana-de-açúcar, proporcionando uma alternativa controlada, rápida e econômica para a triagem inicial em programas de melhoramento.

A significativa variabilidade genética observada e a alta herdabilidade (74,70%) indicam que a resistência ao carvão é uma característica passível de

seleção, o que reforça o potencial de progresso em programas de melhoramento genético.

Entre os genótipos testados, 54 não manifestaram sintomas da doença, destacando-se como candidatos promissores para cruzamentos visando à resistência ao carvão. Por outro lado, genótipos suscetíveis, como o IAC6-66 e especialmente o IAC16-2144, que apresentaram as maiores incidências de chicotes, podem ser utilizados como padrões de suscetibilidade, contribuindo para a definição de referências no manejo e controle da doença.

Além disso, a correlação moderadamente forte entre as avaliações em casa de vegetação e em campo (61%) reforça a validade do ensaio controlado como etapa preliminar na triagem de genótipos resistentes. A combinação de ensaios de casa de vegetação e campo permite uma seleção mais precisa, otimizando o tempo e os recursos investidos e acelerando o desenvolvimento de novas cultivares resistentes. Para maximizar os resultados, recomenda-se a integração de avaliações de resistência com outras características agronômicas, como produtividade, teor de açúcar e qualidade do caldo, visando ao desenvolvimento de cultivares com desempenho superior em múltiplos aspectos.

A incorporação de ferramentas moleculares e de fenotipagem avançada também se apresenta como uma estratégia promissora, complementando as metodologias convencionais e potencializando a eficácia da seleção. Esses esforços conjuntos possibilitaram a sustentabilidade e a produtividade da cultura de cana-de-açúcar, atendendo às demandas de resistência a doenças e de qualidade agrícola e industrial. Portanto, os resultados deste estudo fornecem uma base para o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar com maior resistência ao carvão, contribuindo significativamente para a sustentabilidade e resiliência da cultura no longo prazo.

REFERÊNCIAS

- Antoine R (1961) Smut. In: Martin JP, Abbott EV, Hughes CG (Eds.) **Sugarcane diseases of the world**. Amsterdam: Elsevier, p. 326-353.
- Bhuiyan SA, Croft BJ, Deomano EC, James RS, Stringer JK (2013) Mechanism of resistance in Australian sugarcane parent clones to smut and the effect of hot water treatment. **Crop and Pasture Science**, 64:892-900.
- Boldini JM (2016) **Padronização de métodos para inoculação de *Sporisorium scitamineum* em testes de resistência ao carvão da cana-de-açúcar**. 60 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP.
- Burner DM, Grisham MP, Legendre BL (1993) Resistance of sugarcane relatives injected with *Ustilago scitaminea*. **Plant Disease**, 77:1221-1223.
- Campbell CL, Madden LV (1990). Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 532p.
- Comstock JC, Ferreira SA, Tew TL (1983) Hawaii's Approach to Control of Sugarcane Smut. **Plant Disease**, 67:452-457.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2024) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2023/2024**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 11 mai. 2024.
- Croft BJ, Berding NILS, Cox MC, Bhuiyan S, Bruce RC, (2008a) Breeding smut-resistant sugarcane varieties in Australia: progress and future directions. In: Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists, 30:125-134.
- Croft BJ, Magarey RC, Allsopp PG, Cox MC, Willcox TG, Milford BJ, Wallis ES (2008b) Sugarcane smut in Queensland: arrival and emergency response. **Australasian Plant Pathology**, 37:26-34.
- Ferreira SA, Comstock JC (1989) Smut. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie Jr AG, Hughes CG (Eds.) **Diseases of Sugarcane – Major Disease**. Amsterdam: Elsevier, p. 211-229.
- Hoepers LML, Ruaro L, Bessalho Filho JC, Oliveira RAD, Duarte HDSS (2024) Screening of Brazilian sugarcane genotypes for smut reaction. **Ciência Rural**, 54: e20220611.
- Hoy JW, Grisham MP, Chao CP (1991) Production of sori and dispersal of teliospores of *Ustilago scitaminea* in Louisiana. **Phytopathology**, 81:574-579.
- Landell MGA, Campana MP et al. (2012) **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas**

individualizadas. Ribeirão Preto: Instituto Agronômico de Campinas, 17p. (IAC. Documentos, 109).

Marques JPR, Hoy JW, Appezzato-da-Glória B, Viveros AFG, Vieira MLC, Baisakh N (2018) Sugarcane cell wall-associated defense responses to infection by *Sporisorium scitamineum*. **Frontiers in Plant Science**, 9:698.

Mata JF (1975) **Preservação e determinação de viabilidade de clamidósporos de *Ustilago scitaminea***. 66 f. Dissertação de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Matsuoka S, Sordi RA, Masuda Y, Arizona H (1986) Reliability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clones. In: Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology, 19:375-385.

McNeil MD, Bhuiyan SA, Berkman PJ, Croft BJ, Aitken KS (2018). Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection using RNA-seq and microscopy. **PLoS One**, 13:e0197840.

Morais TBR (2013) **Mapa de ligação e mapeamento de locos quantitativos de resistência a *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Olweny CO, Ngugi K, Nzioki H, Githiri SM (2008) Evaluation of smut inoculation techniques in sugarcane seedlings. **Sugar Tech**, 10:341–345.

Que YX, Xu LP, Lin JW, Chen TS, Chen RK, Li YL (2006) Establishment of evaluation system of smut resistance for sugarcane varieties. **Journal of Plant Genetic Resources**, 7:18–23.

Raboin LM, Hoarau JY, Costet L, Telismart H, Glaszmann JC, D'Hont A (2003) Progress in genetic mapping of sugarcane smut resistance. In: Proceedings of the Annual Congress of the South African Sugar Technologists' Association, Durban, p. 134-141

Rago AM, Casagrande MV, Massola Júnior NS (2009) Variabilidade patogênica de *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, 35:93-97.

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, 67:1051-1056.

Silva HPD, Barbosa MPM, Nass LL, Camargo LEA (2001) Capacidade de combinação e heterose para resistência a *Puccinia polysora* Underw. em milho. **Scientia Agricola**, 58:777-783.

Silveira BR (2016) **Mapeamento de QTL para resistência a *Sporisorium scitamineum* em população bi-parental de cana-de-açúcar**. 58 f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de São Carlos, Araras.

Singh N, Somai BM, Pillay D (2005) In vitro screening of sugarcane to evaluate smut susceptibility. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 80:259-266

Waller JM (1970) Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya II: Infection and resistance. **Transactions British Mycological Society**, 54:405-414.

CAPÍTULO 3 - Avaliação da Estrutura Genética e Diversidade de Genótipos de Cana-de-Açúcar utilizando Marcadores Microssatélites

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica, especialmente em países tropicais, como o Brasil, onde é fundamental para a produção de açúcar e bioetanol. Devido à sua complexidade genética, que inclui poliploidia e alta heterozigosidade, a caracterização da estrutura genética da cana-de-açúcar é essencial para programas de melhoramento. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e a estrutura de um painel de 165 genótipos de cana-de-açúcar, utilizando marcadores do tipo microssatélites (SSRs). Foram aplicadas três abordagens analíticas: análise filogenética, análise de componentes principais (ACP) e agrupamento Bayesiano via software STRUCTURE. A análise filogenética agrupou os genótipos em três clusters principais, refletindo uma variação genética significativa. A ACP indicou que os dois primeiros componentes explicaram 9% da variabilidade total, com a maioria dos genótipos agrupados próximos ao centro do gráfico, sugerindo uma base genética comum. Já o agrupamento Bayesiano confirmou a presença de três subgrupos genéticos, e a predominância de um grupo genético comum, corroborando as demais análises. Os resultados indicam uma base genética estreita entre os genótipos, destacando a importância de expandir a diversidade genética por meio de cruzamentos com espécies selvagens, como *Saccharum spontaneum* e *S. robustum*, para aumentar a variabilidade genética e melhorar o potencial de seleção nos programas de melhoramento.

Palavras-chave: cana-de-açúcar, diversidade genética, estrutura genética, marcadores microssatélites(SSRs)

CHAPTER 3 - Assessment of the Genetic Structure and Diversity of Sugarcane Genotypes Using Microsatellite Markers

ABSTRACT - Sugarcane is a great economic importance crop, particularly in tropical countries like Brazil, where it plays a key role in sugar and bioethanol production. Due to its genetic complexity, which includes polyploidy and high heterozygosity, the characterization of the genetic structure of sugarcane is essential for breeding programs. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and structure of a panel of 165 sugarcane genotypes using microsatellite markers (SSRs). Three analytical approaches were applied: phylogenetic analysis, principal component analysis (PCA), and Bayesian clustering via STRUCTURE software. The phylogenetic analysis grouped the genotypes into three main clusters, reflecting significant genetic variation. PCA indicated that the first two components explained 9% of the total variability, with most genotypes clustered near the center of the graph, suggesting a common genetic base. Bayesian clustering confirmed the presence of three genetic subgroups, with a predominance of a common genetic group, corroborating the other analyses. The results indicate a narrow genetic base among the genotypes, highlighting the importance of expanding genetic diversity through crosses with wild species, such as *Saccharum. spontaneum* and *S. robustum*, to increase genetic variability and improve selection potential in breeding programs.

Keywords: genetic diversity, genetic structure, microsatellite markers (SSRs), sugarcane

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura agrícola de grande relevância global, especialmente em países tropicais como o Brasil, onde desempenha um papel crucial na produção de açúcar e bioetanol. Além de sua importância econômica, a cana-de-açúcar é notável por sua complexidade genética, sendo uma espécie altamente poliplóide, com um número elevado de cromossomos ($2n = 100 - 130$), o que confere uma complexidade genômica significativa (Piperidis et al., 2010). O genoma das cultivares modernas de cana-de-açúcar é composto por aproximadamente 70-80% de cromossomos de *Saccharum officinarum* e 10-20% de *S. spontaneum*, com apenas 10% de cromossomos resultantes da recombinação entre essas duas espécies (D'Hont et al., 1996). Os processos de hibridação e seleção utilizados para desenvolver essas cultivares deram origem a plantas com genomas muito grandes (cerca de 10 Gb), altamente poliplóides, aneuplóides e notavelmente duplicados (D'Hont e Glaszmann, 2001).

Os marcadores do tipo microssatélites (SSRs) podem ser utilizados na caracterização da diversidade genética e análise da estrutura genética de painéis compostos por genótipos de interesse no melhoramento para fins de mapeamento por associação. Esses marcadores apresentam um alto grau de polimorfismo, natureza co-dominante, facilidade de detecção, alta reprodutibilidade, localização cromossômica específica, são multialélicos, o que os tornam ideais para análises da variabilidade genética (Singh et al., 2010).

Em cana-de-açúcar, a busca por associações entre marcadores e fenótipos tem sido conduzida pelo uso de populações provenientes de cruzamentos bi-parentais (Wang et al., 2023; Cortes et al., 2024) ou por painéis que reúnem genótipos com parentescos distintos (Fickett et al., 2020; Xiong et al., 2022; Perera et al., 2023) que, portanto, apresentam maior diversidade alélica. A avaliação da estrutura genética de painéis de genótipos é uma etapa fundamental em estudos de associação genômica ampla (GWAS - *Genome Wide Association Studies*). A estrutura genética pode influenciar diretamente os resultados desses estudos, uma vez que diferenças na composição genética entre subpopulações podem gerar associações espúrias se não forem adequadamente consideradas (Pritchard et al.,

2000). Portanto, a avaliação da estrutura genética é essencial para garantir que as associações identificadas sejam verdadeiramente representativas das relações entre marcadores genéticos e características fenotípicas de interesse.

Esses painéis também podem ser explorados para estimar a distância genética entre genótipos de interesse para o programa de melhoramento e que são utilizados em cruzamentos. Vale ressaltar que a escolha de genitores para cruzamentos é uma etapa importante em um programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar, a qual leva em consideração além da complementaridade de características de interesse a divergência genética entre os genitores, podendo ser quantificada pelo uso de marcadores moleculares.

Em 2013, no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) foi montado um painel constituído por 100 genótipos contrastantes para os caracteres porcentagem em massa de sacarose aparente (POL) e fibra (Coutinho et al., 2022), sendo posteriormente avaliado quanto a resposta ao amarelinho da cana-de-açúcar (Pimenta et al., 2021) e ao mosaico (Burbano et al., 2022), duas viroses de importância para a cultura. A este painel de 100 genótipos foram adicionados 65 novos genótipos para permitir a investigação quanto à resposta ao carvão da cana-de-açúcar visando a sua futura exploração via mapeamento associativo para a identificação de marcadores associados à resistência a esta doença. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética e estruturação deste painel, composto por 165 genótipos de cana-de-açúcar, o qual inclui clones do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cultivares comerciais de outros programas de melhoramento no Brasil, bem como alguns acessos de germoplasma de *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum*, utilizando marcadores do tipo microssatélites.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O painel consistiu de um total de 165 genótipos de cana-de-açúcar, incluindo clones e cultivares comerciais do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), cultivares comerciais de outros programas de melhoramento (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético- RIDESA; Centro de Tecnologia Canavieira - CTC , cultivares de cana-energia (GranBio/Nussed) e acessos de *S. officinarum*, *S. spontaneum*, e *S. robustum* (Tabela 1.)

Tabela 1. Lista dos 165 genótipos de cana-de-açúcar com seus respectivos genitores para o estudo da caracterização da estrutura genética

ID	Genótipo	A = clone IAC; B = Cultivar comercial, C = espécie	Genitor f	Genitor m
1	US571415	C	Desconhecido	Desconhecido
3	IACSP01-2410	A	R570	IAC873396
4	IACSP04-6007 ©*	A	PO8862	CTC9
5	IACSP04-6059	A	IACSP953018	SP963092
6	IACSP972053		SP842066	IAC863154
7	IACSP95-3028	B	IACSP953028	RB855156
8	NG5712	A	<i>S. robustum</i>	Desconhecido
9	IACSP04-2516	A	IAC912288	SP80185
10	KRAKATAU	C	<i>S. spontaneum</i>	-
11	IN84-82	A	<i>S. spontaneum</i>	-
12	IACSP04-2508	A	SP913059	IACSP972077
13	IACSP95-5037	A	SP842066	IAC873396
14	IACCTC05-9630	A	IACSP972053	RB85453
15	IACSP04-6053	A	IACSP956114	IACSP933046
16	IACSP99-3009	A	CP701133	SP832847
17	IS76155	A	<i>S. officinarum</i>	-
18	IACSP01-2421*	A	RB835486	SP775181
19	IACSP04-2521	A	IAC912288	SP963092
20	IACSP04-6058	A	IACSP953018	SP963092

21	IACSP99-1020	A	SP851682	SP80185
22	IACSP04-5065	A	IACSP956114	IACSP953050
23	IACCTC06-9767	A	IACSP963069	IACSP952078
24	IACSP98-5046	A	SP813251	SP823697
25	IACSP01-8034	A	IAC913093	SP87432
26	IACSP99-3357	A	SP921584	-
27	IACCTC05-9578	A	White transparent	SP80-3280
28	IACSP95-3028	A	CTC4	IACSP933046
29	IACSP97-6628	A	RB835486	SELF
30	IACSP97-6680	A	SP842066	SP847017
31	IACCTC05-9534	A	IACSP953028	CT961414
32	IACSP97-2084	A	RB855035	SP80185
33	CTC15	B	SP842025	?
34	IAC91-4168	A	SP813137	?
35	IACBIO-232	A	RB855465	GLAGAH
36	IACBIO-241	A	RB855465	GLAGAH
37	IACBIO-257	A	NG26011	?
38	IACBIO-266	A	NG26011	?
39	IACBIO-270	A	SES069	?
41	IACBIO-271	A	SES069	?
42	IACBIO-275	A	SES069	?
43	IACBIO-277	A	SES069	?
44	IACBIO-279	A	SES069	?
45	IACCTC05-3616	A	IAC915155	CT961414
46	IACCTC05-6518	A	SP911049	CT931231
47	IACCTC05-9552	A	IACSP955011	CT961414
48	IACCTC05-9607	A	IACSP972053	SP88721
49	IACCTC05-9634	A	IACSP972053	RB855453
50	IACCTC06-1050	A	CT943165	IAC911099
51	IACCTC06-9708	A	IACSP962042	CT014455
52	IACCTC06-9713	A	IACSP955000	CT961307

53	IACCTC06-9741	A	IACSP955000	RB72454
54	IACSP01-2417	A	RB835486	SP775181
55	IACSP01-2430	A	IAC912195	SELF
56	IACSP01-5501	A	SP913059	CTC957
57	IACSP01-5519	A	RB835486	SP775181
58	IACSP01-8046	A	R570	IAC873396
59	IACSP01-8082	A	IAC913093	SP87365
60	IACSP01-8158	A	RB835486	SP775181
61	IACSP02-2067	A	SP973060	SP701143
62	IACSP02-2125	A	SP901161	SP901644
63	IACSP02-3025	A	SP924230	SP88813
64	IACSP02-3168	A	IAC914216	SP803280
65	IACSP04-2503 ©*	A	PO8862	CTC9
66	IACSP04-2504	A	IACSP955037	?
67	IACSP04-2509	A	SP913059	IACSP973391
68	IACSP04-2510	A	IAC913093	CTC9638
69	IACSP04-3123	A	IACSP953028	SP832847
70	IACSP04-3148	A	IACSP953018	IACSP933046
71	IACSP04-3150	A	IACSP953018	IACSP933046
72	IACSP04-3259	A	IACSP966026	RB855453
73	IACSP04-5081	A	IACSP966026	RB855453
74	IACSP04-6032	A	IACSP953028	SP775181
75	IACSP04-6035	A	SP913059	IACSP966026
76	IACSP04-6073	A	IACSP953028	SP924221
77	IACSP04-6077	A	IACSP972109	IACSP956114
78	IACSP04-6152	A	IAC911099	SP931124
79	IACSP93-3046	B	SP791011	?
80	IACSP95-3018	A	SP842189	SP801842
81	IACSP95-6114	A	IAC873187	CTC9019
82	IACSP96-2008	A	SP80144	?
83	IACSP96-3056	A	SP826108	?

84	IACSP96-3069	A	SP803280	?
85	IACSP96-3076	A	SP847017	?
86	IACSP97-3384	A	RB855113	RB855453
87	IACSP97-4039	A	RB835486	RB855453
88	IACSP97-4048	A	SP842066	IAC863154
89	IACSP98-2053	A	SP847017	SP801842
90	IACSP98-3011	A	IAC913093	SP823530
91	IACSP99-3369	A	SP901616	?
92	IACSP99-4011	A	SP842025	RB855113
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	Desconhecido	,
97	RB855156	B	RB72454	TUC717
98	RB93-5744	B	RB835089	RB765418
99	SES205A	B	<i>S. spontaneum</i>	,
100	SP83-2847	B	HJ5741	SP701143
101	SP71-6163	B	NA5679	?
102	IAC16-2014	A	IAC133227	IACSP973354
103	IAC16-2036	A	IAC133247	IJ76482
104	IAC16-2044	A	CO1148,	IAC133224
105	IAC16-2050	A	IAC127060	IACSP04065-
106	IAC16-2053	A	IAC127059	IACSP04065
107	IAC16-2059	A	CTC9	IAC133172
108	IAC16-2060	A	IAC133176	IACSP974039
109	IAC16-2081	A	IAC07388	IAC133225
110	IAC16-2086	A	IAC133247	IACSP994010-
111	IAC16-2108	A	IACSP013127	IACSP962008
112	IAC16-2134	A	IAC133235	IACSP018158
113	IAC16-2138	A	IAC133435	IACSP976628
114	IAC16-2140	A	IAC133264	IACSP976619

115	IAC16-2142	A	IACSP047070	IAC127064
116	IAC16-2144	A	-----	-----
117	IAC16-2162	A	IACSP976680	IAC127064
118	CO419	B	POJ 2878	CO290
119	IAC6-66	A	CO419	C0356
120	IAC80-3480	A	-----	-----
121	IAC86-2480	A	US71399	?
122	IAC87-3396	B	CO740	SP701143
123	IAC91-1099	A	RB785148	?
124	IACCTC05-2562	A	CTC4	IACSP933046
125	IACCTC05-8069	A	IACSP955000	CT961414
126	IACCTC07-8008	A	IACSP963076	CTC4
127	IACSP01-3127	B	RB835486	SP775181
128	IACSP01-5503	B	SP913059	CTE957
129	IACSP04-2503	A	PO8862	CTC9
130	IACSP93-2060	B	RB765418	?
131	IACSP93-6006	A	SP791011	?
132	IACSP94-2101	B	SP775181	RB785148
133	IACSP94-4004	B	SP26108	SP775181
134	IACSP95-5000	B	SP842066	SP80185
135	IACSP95-5094	B	SP803280	?
136	IACSP96-2042	B	SP815193	SP775181
137	IACSP96-7569	B	SP841192	SP803280
138	KASSOER	B	<i>S. officinarum</i>	GLAGAH
139	NA5679	B	CO419	C0419
140	NCO310	B	CO421	C0312
142	RB855453	B	TUC717	?
143	RB92579	B	RB755126	RB72199
145	SP701143	B	IAC4865	?
146	SP80185	B	BO17	?
148	SP803280	B	SP711088	H575028

149	SP813250	B	CP701547	SP711279
150	SP835073	B	SP711406	SP711088
151	SP901638	B	SP784601	?
152	SP903414	B	SP801079	SP823544
153	SP91-1049	B	SP803328	SP813250
154	U557-14105	B	<i>S. spontaneum</i>	-
155	CTC07	B	RTT8618	?
156	CTC21	B	CT971246	SP832847
157	CTC12	B	SP801842	SP811747
158	CTC22	B	SP803280	?
159	CTC08	B	SP813492	?
160	CTC06	B	SP811763	SP791416
161	IACSP94-2094	B	SP847017	?
162	RB867515	B	RB72454	?
163	RAGNAR	B	CO270	MQ3371
164	R570	B	H393633	M20246
165	VERTIX 2	B	IAC91-1099	KRAKATAU
166	VERTIX3	B	IACBIO79	?
167	VERTIX7	B	IACBIO-123	?
168	VERTIX9	B	IACSP963055	KRAKATAU
169	POJ2878	B	POJ2364	EK28
170	CO213	B	COLK 8102	CO 775

(?) Policruzamento; (-) acesso; (-----) não cadastrado no Caiana

2.2 Extração de DNA e amplificação por PCR

O DNA genômico total foi extraído de folhas jovens pelo método CTAB, de acordo com Aljanabi et al., (1999). A qualidade e concentração de DNA foram estimadas por espectrometria utilizando NanoDrop e visualmente em gel de agarose 0,8%, comparando com padrões conhecidos de DNA do fago λ , com brometo de etídio como corante. Foram utilizados 12 pares de iniciadores, sete denominados

“CV” (CanaVialis) (Maccheroni et al., 2007) e cinco “SC” (SugarCane) (Marconi et al., 2011). Os iniciadores foram desenvolvidos a partir do banco de sequências expressas do SUCEST (ESTSSR) (Oliveira et al., 2009). As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 15 µl contendo 20 ng de DNA modelo, 0,2 µM de cada primer “forward” e “reverse” (marcado com corantes infravermelhos IR700 ou IR800), 100 µM de cada dNTP, 2,0 mM MgCl₂, 10 mM Tris- HCl, KCl 50 mM e Taq DNA polymerase. As reações foram amplificadas em um termociclador MyCycler Thermal Cycler (BIO-RAD®). Para os pares de iniciadores CV (CanaVialis): condições de termociclagem CV29, CV37, CV38, CV60, CV79, CV94 e CV106 foram realizadas de acordo com Palhares et al. (2012). Para os pares de primers SC (cana-de-açúcar): SCB213, SCB312, SCB381, SCB423 e SCC436 as condições de termociclagem foram às seguintes: desnaturação a 94,0°C por 3 min seguida de 30 ciclos de amplificação (94,0°C por 1 min, temperatura de anelamento específica para cada primer por 1 min de extensão de 72,0°C por 1 min) e uma etapa de alongamento final a 72,0°C por 5 min. As sequências de pares de iniciadores SSR com respectivas temperaturas de recozimento e faixa de alelos esperada estão listadas na Tabela 2. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% em analisadores de DNA NEN4300 (LI-COR Biosciences®).

Tabela 2. Pares de iniciadores SSR utilizados para a genotipagem de 165 genótipos de cana-de-açúcar com incidência ao carvão

SSR	Motivos de repetição	Amplicon esperado	Temperatura de anelamento	Sequência forward Sequência reverse
CV29	(ATCT) ₁₄	85-151	60,0 °C	TCGCGTCCACCAATGTAACC GCGTGCATCGCTTGTGTCTT
CV37	(TTTC) ₁₅	114-171	60,0 °C	GGATGGACGACGTGTCCTGG ATAAAGTGGCCGCTTGGATTGA
CV38	(CTTTT) ₁₈	93-2014	60,0 °C	GAAGCAGGGGCCTCAAGTTG 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.

2.3 Genotipagem

Os produtos amplificados foram pontuados como presença (1) ou ausência (0). O padrão de peso molecular de 50-350pb (LI-COR Biosciences®) foi usado para calibrar os tamanhos dos alelos amplificados em cada execução. As imagens em gel foram pontuadas manualmente e revisadas com o software Saga GT™ (LI-COR Biosciences®). Este software identifica o tamanho do produto amplificado para construir a matriz de genotipagem. Os dados binários (presenças e ausências) foram exportados e organizados em uma planilha, montando assim a matriz de genotipagem que foi utilizada em todas as análises.

2.4 Análise dos Dados

A estrutura genética dos 165 genótipos de cana-de-açúcar foi investigada utilizando diferentes métodos: análise filogenética e de dissimilaridade; análise de componentes principais (ACP); e método baseado em modelo bayesiano usando o software STRUCTURE. Além disso, a frequência de cada tipo de alelo e a presença de alelos exclusivos também foram investigadas.

2.4.1 Análise Filogenética e de Dissimilaridade

A árvore filogenética dos genótipos foi construída por meio do software DARwin v6.0.13, utilizando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard, a partir do método “UnWeighted Neighbor Joining” com 1000 amostragens (bootstrap = 1000), com o mínimo de dados válidos definido em 50%, removendo o emparelhamento no caso de dado faltante.

2.4.2 ACP

Para a realização do ACP, os dados de genotipagem (0-1) foram interpolados com a finalidade de substituir os dados ausentes (NA) por valores estimados. Após a interpolação dos dados, no software estatístico “R” (versão 4.2.3) foi utilizada a função “prcomp” (pacote “stats”) para calcular os componentes principais, e para a plotagem foi utilizado a função “ggbiplot”, do pacote “ggbiplot” (versão 0.6.2).

2.4.3 Análise da estrutura genética da população

A análise da estrutura genética da população para verificar a existência de grupos foi realizada pelo software Structure v 2.3.4, mediante modelo de agrupamento baseado na estatística bayesiana (Pritchard et al., 2000). A ploidia dos genótipos foi definida como 1 (haploides) e os parâmetros das corridas foram definidos da seguinte forma: período de burn-in de 100.000 iterações, seguido de 200.000 iterações MCMC (Monte Carlo Markov Chain), o modelo utilizado foi o

admixture, sem nenhuma informação de ancestralidade, com o modelo de frequências alélicas correlacionadas. Nessa análise foram testadas as hipóteses da existência de K subgrupos, com K variando de 1 a 10, cada hipótese foi repetida 10 vezes. A determinação do nível mais provável de subgrupos (K), dentro da população, é baseada no Delta K (ΔK) que é uma média dos valores absolutos do logaritmo de K ($L(K)$) do número de corridas realizadas, dividido pelo desvio padrão de $L(K)$, sendo o maior ΔK relacionado ao valor mais provável de K (Evanno et al., 2005). Para determinar o melhor valor de K, os resultados foram submetidos ao CLUMPAK (Kopelman et al., 2015), por meio do “pipeline Best K”.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Variabilidade genética capturada pelos SSRs e alelos exclusivos

Os 12 pares de primers SSR geraram 242 alelos (marcadores) entre os 165 genótipos (Tabela 3). O número total de alelos reflete a eficiência dos marcadores em detectar a diversidade genética presente no painel de genótipos de cana-de-açúcar. A variação no número de alelos foi observada entre os loci, com o menor número registrado nos primers CV60 e CV94 (9 alelos), enquanto o primer SCB423 apresentou o maior número de alelos (33 alelos).

De forma semelhante, Manechini et al. (2018), utilizando os mesmos 12 pares de primers em 137 genótipos, obtiveram 285 alelos, com uma variação de 10 (CV60) a 43 alelos (SCC423) e uma média de 23,75 alelos por locus. Comparativamente, Nayak et al. (2014) analisaram 1.002 acessos de cana-de-açúcar com 36 pares de primers SSR, gerando 209 alelos, enquanto Pan (2010) reportou 144 alelos a partir de 21 pares de primers.

A eficiência dos 12 primers SSR no painel de 165 genótipos foi elevada, com uma média de 20,17 alelos por locus. Esse valor é significativamente superior ao encontrado por Nayak et al. (2014), que reportaram uma média de 5,8 alelos por locus. Isso indica que os primers selecionados neste estudo foram eficazes em capturar o polimorfismo genético de forma eficiente. A alta poliploidia da cana-de-açúcar facilita a amplificação de múltiplos alelos por locus, o que foi

evidenciado nos primers que detectaram até 33 alelos (SCB423). A elevada heterozigosidade dos genótipos contribui para a diversidade, e a capacidade dos SSRs de identificar múltiplos alelos por locus reforça sua eficácia como ferramentas robustas para a caracterização da diversidade genética.

Tabela 3. Alelos gerados pelos 12 pares de primers SSR entre 165 genótipos de cana-de-açúcar

Primer	Número de alelos
SCB381	21
CV29	18
CV37	15
CV38	28
CV60	9
CV79	22
CV94	9
CV106	12
SCB312	29
SCB213	32
SCB436	14
SCB423	33
Total	242
Média	20,17

Dentre a amplificação total de 242 alelos, 21 alelos, foram identificados como exclusivos dos 65 genótipos recentemente incorporados ao painel, os quais foram adicionados para investigar a resposta ao carvão da cana-de-açúcar. Esses alelos, listados na Tabela 4, podem indicar variações genéticas importantes para a resistência à doença, com potencial para exploração futura por meio de mapeamento associativo, visando a identificação de marcadores de resistência e contribuindo para o melhoramento genético da cultura.

Tabela 4. Alelos exclusivos a partir dos 65 genótipos de cana-de-açúcar incorporados ao painel.

Alelos	Genótipos	ID	Alelo	Genótipo	ID
381_239	KASSOER	138	213_330	IAC16-2059	107
381_225	IAC86-2480	121	213_277	IAC16-2144	116
CV29_147	IAC16-2086	110	213_277	IACSP93-2060	130

CV29_147	CO213	170	213_277	U557-14105	154
CV38_202	IAC6-66	119	213_277	CTC07	155
CV38_202	IACSP94-2094	161	436_225	IAC16-2036	103
CV38_167	U557-14105	154	436_225	IAC16-2044	104
CV38_144	CTC07	155	436_225	IAC16-2138	113
CV38_138	CTC22	158	423_254	VERTIX7	167
CV60_179	IAC16-2053	106	423_248	IACSP94-4004	133
CV60_179	IAC16-2138	113	423_248	NA5679	139
CV60_179	IAC16-2140	114	423_248	U557-14105	154
CV79_241	IAC16-2059	107	423_248	CTC07	155
CV94_179	VERTIX2	165	423_235	CTC21	156
312_249	VERTIX3	166	423_224	IAC16-2138	113
312_249	VERTIX9	168	423_224	IAC16-2144	116
312_240	VERTIX9	168	423_222	IAC16-2060	108
312_227	IAC16-2059	107	423_222	IAC16-2142	115

3.2 Análise de estrutura

A estrutura genética do painel foi investigada usando três abordagens diferentes: análise filogenética, componentes principais (ACP) e agrupamento Bayesiano implementado no software STRUCTURE.

3.2.1 Análise Filogenética e Dissimilaridade genética

Métodos de agrupamento hierárquico, como o Neighbor-Joining, são comumente aplicados para visualizar as relações genéticas entre genótipos, oferecendo uma representação clara das distâncias genéticas (Saitou e Nei, 1987).

Na árvore filogenética gerada utilizando o método *Unweighted Neighbor Joining* (Figura 1), é possível identificar a formação de três clusters distintos (Cluster 1, Cluster 2 e Cluster 3). Essa árvore reflete a estrutura genética do painel de genótipos com base no coeficiente de dissimilaridade de Jaccard.

O cluster 1 contém a maior parte dos genótipos analisados (127). Isso sugere uma proximidade genética significativa entre eles, indicando que compartilham alelos similares nos marcadores microssatélites utilizados. O Cluster 2 agrupou 11 genótipos que estão geneticamente mais próximos entre si, porém mais distantes do grande grupo central presente no Cluster 1. O Cluster 3 com 27 genótipos destaca-se por agrupar genótipos desenvolvidos para uma finalidade específica, conhecidos por IACBIO.

Alguns genótipos aparentados foram distribuídos em clusters diferentes, como observado para os clones 65-(IACSP04-2503) e 4-(IACSP04-6007), descendentes dos genitores PO8862 e CTC9, o que resultou em irmãos completos em clusters distintos (1 e 2). Isso pode ser atribuído à recombinação genética e à segregação de alelos durante a formação dos descendentes. A heterogeneidade do material genético em cana-de-açúcar muitas vezes leva a resultados como esse, onde a variabilidade genética dentro de uma mesma família pode ser considerável. Esse fenômeno é comum na cana-de-açúcar, uma cultura de natureza poliploide e altamente heterozigótica, onde diferentes combinações alélicas podem levar a diferenças fenotípicas, mesmo entre genótipos aparentados (Singh et al., 2013).

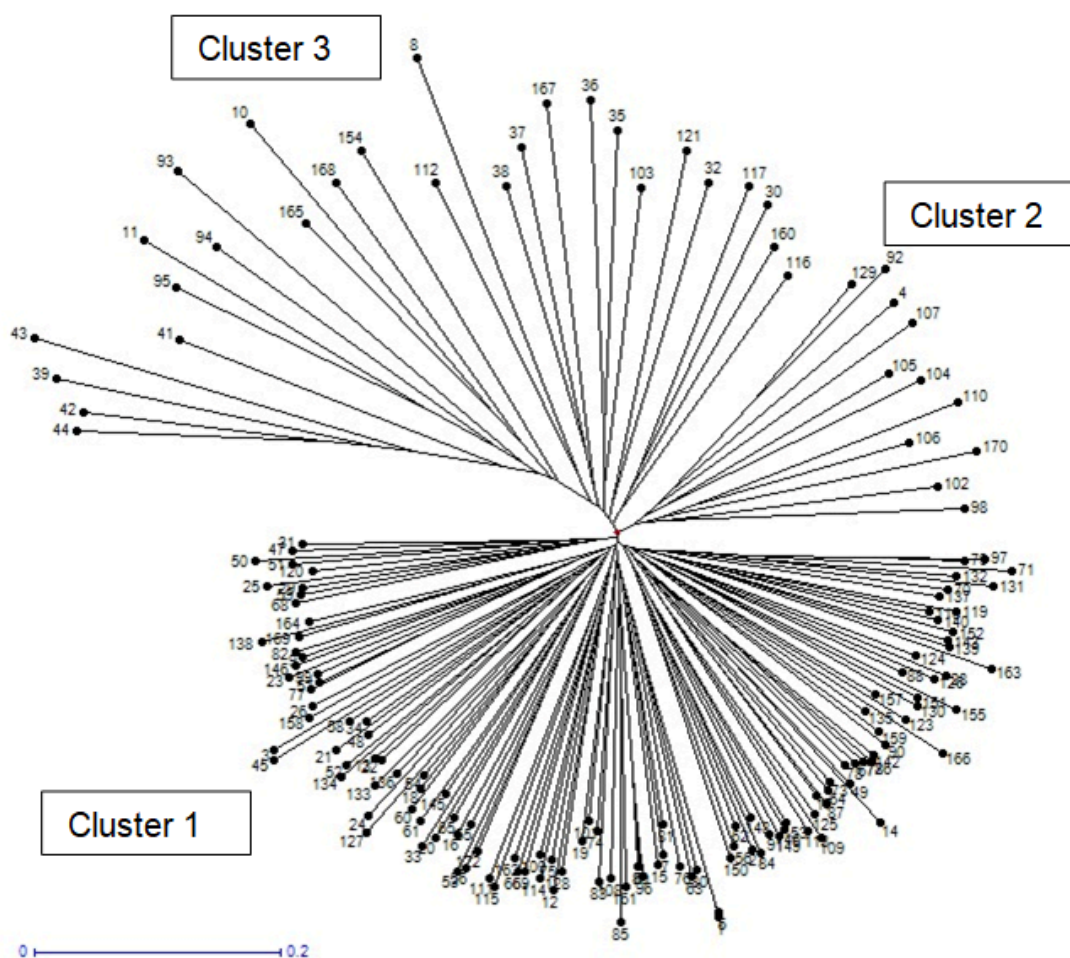


Figura 1. Agrupamento obtido pela análise “Neighbor Joining” realizada no software “DARwin”.

Na Figura 2 encontra-se a distribuição de frequência dos valores de dissimilaridade observados entre os 165 genótipos de cana-de-açúcar, utilizando uma matriz de dissimilaridade par a par. Essa análise, crucial para o entendimento da diversidade genética no painel em estudo, revela que a maior concentração dos valores de dissimilaridade está próxima de 0,6 (60%), indicando uma variação genética considerável entre os genótipos analisados. Valores de dissimilaridade máximos de até 0,85 foram observados, como nos pares 43-(IACBIO-277) com 28-(IACSP95-3028) e 43-(IACBIO-277) com 11-(IN84-82), enquanto o valor mínimo foi de 0,02, identificado entre os genótipos 1-(US571415) e 5-(IACSP04-6059). Além disso, valores médios de 0,54, 0,51 e 0,67, nos clusters 1, 2 e 3 respectivamente, foram observados.

Medeiros et al. (2020) avaliaram 254 acessos do complexo *Saccharum* e observaram dissimilaridades médias de 0,36, 0,25 e 0,29 dentro dos grupos estudados, com um valor máximo de 0,62 entre *S. spontaneum* e *S. officinarum*. Em comparação, o presente estudo apresentou uma variação genética ligeiramente maior, com valores máximos de dissimilaridade mais elevados (0,85 contra 0,62) e médias entre os clusters que indicam maior diversidade genética. Essa diferença pode estar relacionada ao painel genético mais diverso, sugerindo uma variação genética mais ampla, essencial para programas de melhoramento visando a introdução de novas características na cultura.

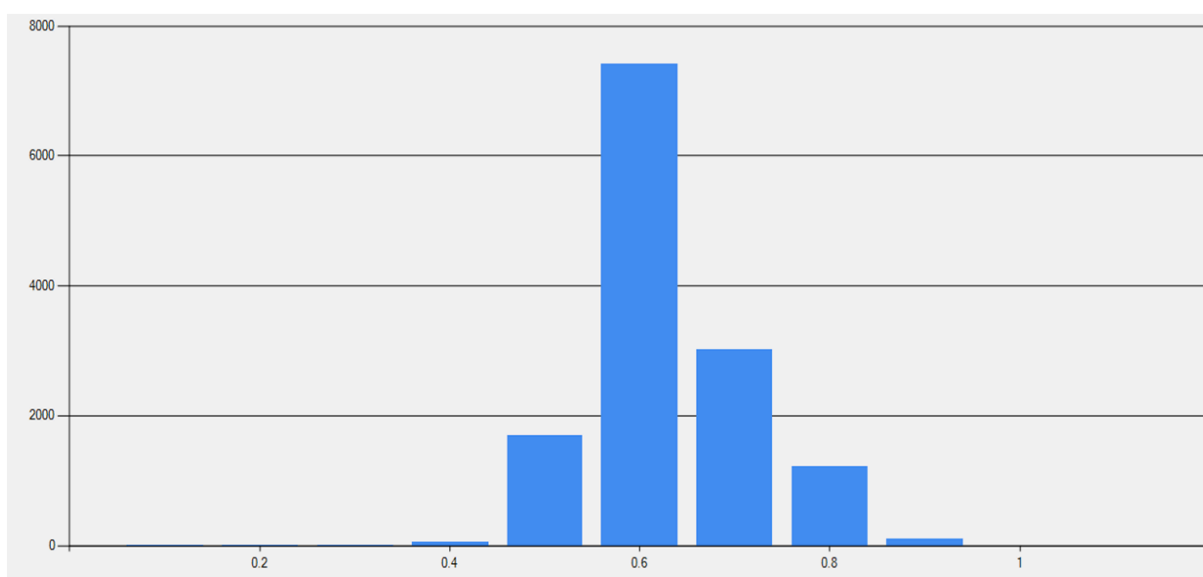


Figura 2. Distribuição da frequência dos valores de dissimilaridade observada a partir da matriz de dissimilaridade par a par entre os 165 genótipos de cana-de-açúcar (DARwin v6.0.13)

A proximidade genética entre certos genótipos foi evidente. No Cluster 1, por exemplo, os genótipos 169-POJ2878 e 138-KASSOER foram fortemente agrupados, com uma dissimilaridade de 0,36 (Tabela 5). Essa proximidade observada entre POJ2878 e KASSOER, com uma baixa dissimilaridade, é consistente com a história genética de ambos, já que POJ2878 é descendente direto de KASSOER, compartilhando a maioria dos alelos de seu antecessor, o que explica a baixa dissimilaridade. Essas cultivares, originárias das primeiras hibridações interespecíficas, tiveram um impacto significativo na indústria canavieira do século XX, sendo que POJ2878 é amplamente reconhecida como a "cana-maravilha" que

contribuiu significativamente para o pool genético de cultivares modernas, como discutido por Mutsaers (2007).

No Cluster 3, foram identificados genótipos do programa de melhoramento voltado para a produção de cana energia, denominados IACBIO, que compartilham os mesmos genitores, como é o caso dos irmãos completos 35-(IACBIO-232) e 36-(IACBIO-241), cuja dissimilaridade foi de 0,52, resultante do cruzamento entre RB855465 com GLAGAH (acesso de *S. spontaneum*). Outros genótipos, como 37-(IACBIO-257) e 38-(IACBIO-266), também mostraram alta similaridade, com uma dissimilaridade de 0,47, sendo oriundos de um policruzamento envolvendo NG26011 (genitor feminino) e um genitor masculino desconhecido. De forma semelhante, os genótipos 122-(IAC87-3396) e 100-(SP83-2847) que compartilham o genitor masculino SP70-1143, foram agrupados no cluster 1 com uma dissimilaridade de 0,54. A alta similaridade genética observada entre os genótipos IACBIO se deve ao fato de serem irmãos completos, o que significa que compartilham alelos idênticos por descendência nos marcadores SSR.

Tabela 5. Medidas de dissimilaridades de 165 genótipos de cana-de-açúcar.

Pares de genótipos		
Genótipo 1	Genótipo 2	Dissimilaridade
43-IACBIO-277	28-IACSP95-3028	0,85
43-IACBIO-277	11-IN84-82	0,85
1-US571415	5-IACSP04-6059	0,02
169-POJ2878	138-KASSOER	0,36
35-IACBIO-232	36-IACBIO-241	0,52
37-IACBIO-257	38-IACBIO-266	0,47
122-IAC87-3396	100-SP83-2847	0,54

3.2.2 Análise de componentes principais (ACP)

A Análise de Componentes Principais (ACP) é outra ferramenta frequentemente utilizada, facilitando a identificação de padrões de variação genética e a redução da dimensionalidade dos dados (Jombart et al., 2010). A ACP indicou que os dois primeiros componentes (ACP1 e ACP2) explicaram 5,5% e 3,5% da

variabilidade, respectivamente, resultando em uma soma de 9% da variabilidade total observada entre os genótipos, com base nas medidas de dissimilaridade. Os valores explicados pelos componentes principais (PC1 = 5,5% e PC2 = 3,5%) embora sejam valores relativamente baixos, são comuns em estudos envolvendo culturas com genomas complexos, como a cana-de-açúcar, devido à sua natureza poliploide e à alta heterozigosidade. A cana-de-açúcar é uma cultura aloploiploide, com uma quantidade significativa de material genético repetitivo, o que resulta em variação genética dispersa entre muitos componentes principais.

Estudos anteriores, como o de Medeiros et al. (2020), que explicaram 17,8% da variabilidade ao incluir acessos do gênero *Erianthus*, indicam que a inclusão de acessos com maior diversidade genética pode aumentar a proporção de variação explicada. No entanto, quando apenas os acessos de *Saccharum* são analisadas, como nesse estudo, a variabilidade explicada pelos primeiros componentes diminui (12,7%). Isso destaca uma limitação intrínseca dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar, que frequentemente trabalham com uma base genética estreita. Em um estudo realizado por Khanbo et al. (2021), os dois primeiros componentes principais explicaram 5,62% e 5,22% da variação total, respectivamente. A análise não indicou uma separação clara entre as principais subpopulações, embora tenha identificado alguns subgrupos, o que é consistente com os achados de Manechini et al. (2018), onde os dois primeiros componentes explicaram 19,18% da variabilidade total, o que é superior ao encontrado neste estudo, mas ainda assim reflete uma situação em que a maior parte da diversidade genética é capturada em componentes adicionais. Manechini et al. (2018), também sugerem que, apesar de a ACP ser uma ferramenta útil para capturar diferenças genéticas, a complexidade genética da cana-de-açúcar requer a análise de múltiplos componentes para revelar toda a extensão da variabilidade genética.

A formação dos grupos principais na distribuição dos genótipos no gráfico de ACP reflete a presença de subpopulações geneticamente semelhantes, o que está em linha com o fato de que muitos dos genótipos analisados compartilham os mesmos genitores e/ou foram selecionados para características agrônômicas específicas, como a produção de açúcar e etanol. Além disso, o agrupamento da ACP foi semelhante ao da árvore filogenética. Os clones de cana-energia

IACBIO-232, IACBIO-241, IACBIO-257, IACBIO-266, IACBIO-270 (35, 36, 37, 38, 39) e os clones IACSP97-4048, IACSP98-2053, IACSP98-3011 (88, 89, 90) se posicionaram mais distantes do grupo maior, formando um segundo grupo, dividido em dois subgrupos. O que também corrobora com a análise filogenética, onde esses mesmos genótipos de cana-energia foram alocados no cluster 3, os clones 88, 89 e 90 no cluster 1.

A sobreposição genética observada entre os grupos no centro do gráfico indica redundância genética, um fator que pode impactar negativamente o progresso genético em futuras gerações de melhoramento. Uma base genética mais ampla é essencial para garantir maior potencial de resposta à seleção, especialmente em face das mudanças climáticas e novas demandas da indústria. Os resultados observados nesse estudo, onde os genótipos de cana-energia IACBIO e alguns clones de cana-de-açúcar foram posicionados mais distantes do grupo principal, podem ser explicados pela utilização de genitores com backgrounds genéticos distintos, algo que também foi observado por Medeiros et al. (2020), ao analisar as diferenças entre os grupos ancestrais e os melhorados.

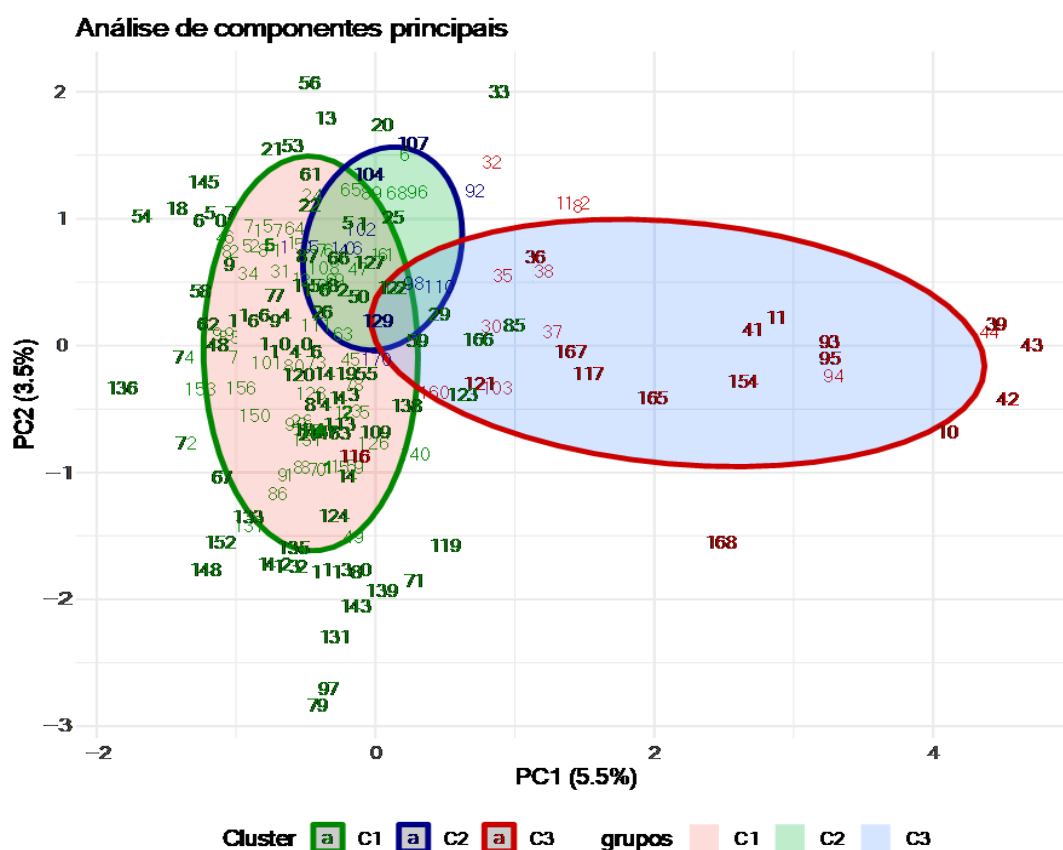


Figura 2. Análise de Componentes Principais de 165 genótipos de cana-de-açúcar com base na matriz de dissimilaridade (1-Jaccard).

3.2.3 Agrupamento Bayesiano (STRUCTURE)

O software STRUCTURE, permite a identificação da composição genética de subpopulações dentro de um painel de genótipos, sendo amplamente utilizado em estudos de diversidade e estrutura genética (Pritchard et al., 2000). O agrupamento Bayesiano indicou a presença de três subgrupos genéticos ($k = 3$) (9.71) (Figura 3A), confirmando a estrutura genética previamente observada nas análises de ACP e filogenética. Os valores de ΔK diminuíram drasticamente para valores de K maiores que 3 indicando que a presença de mais subgrupos não melhora significativamente a explicação da estrutura genética da população.

Em uma análise detalhada dos subgrupos (k), os genótipos estão representados por barras verticais, onde cada cor (verde, vermelho e azul), dentro de uma barra, representa a proporção de pertencimento a um dos três subgrupos genéticos (Figura 3B). A maioria dos genótipos pertenceu, predominantemente, a um único grupo (verde) diferenciando-se os genótipos 39, 42, 43 e 44 (IACBIO-270, IACBIO-275, IACBIO-277 e IACBIO-279) que se agruparam no subgrupo vermelho. Esses genótipos são clones aparentados e fazem parte do programa de melhoramento voltado para a produção de cana energia, identificados como IACBIO. Essa distinção já era esperada, dado o objetivo específico do programa de melhoramento, corroborando a análise filogenética, na qual esses clones foram alocados no cluster 3 por serem irmãos completos.

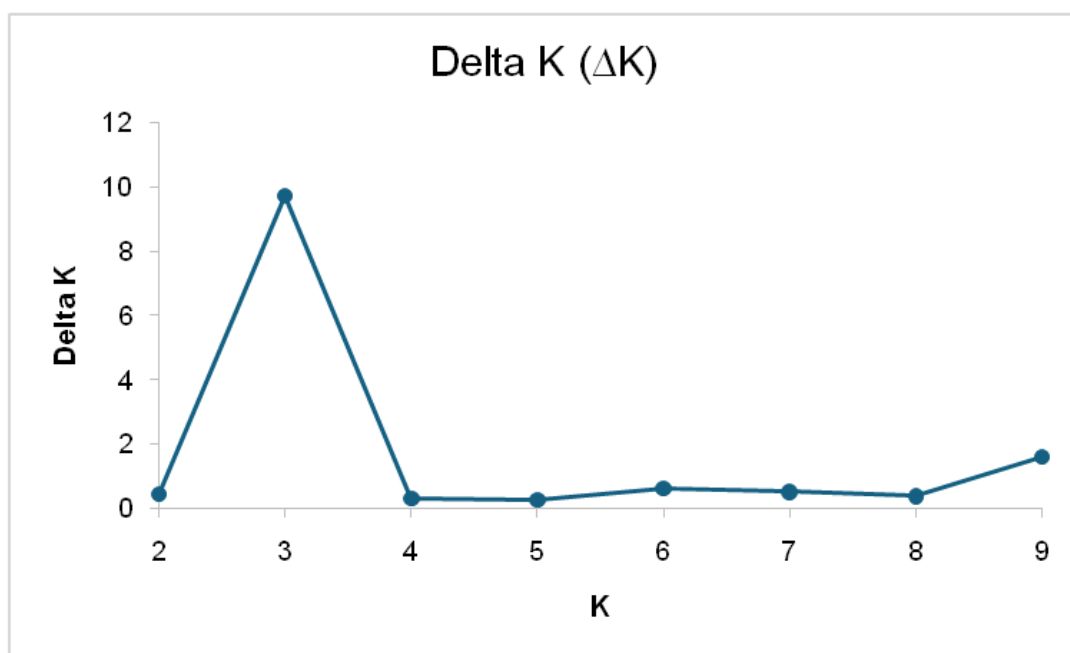
Os genótipos 8, 11, 35, 93 e 167 (NG5712, IN84-82, IACBIO-232, IJ76-293 e VERTIX-7) apresentaram proporções variáveis dos três subgrupos genéticos (verde, vermelho e azul). De fato, esses genótipos envolvem, em sua genealogia, as espécies *S. robustum* e *S. spontaneum*, ambas selvagens, que possuem alta diversidade genética, e no caso do desenvolvimento de cana-energia, são frequentemente utilizadas como genitores, como por exemplo, a cultivar IACBIO-232, resultante do cruzamento entre a RB855465 e o acesso de *S. spontaneum* GLAGAH. A incorporação desses genitores nas cultivares de cana-de-açúcar aumenta a variabilidade genética dos descendentes, resultando em

uma mistura de alelos provenientes de diferentes subgrupos genéticos, refletindo na contribuição dos 3 subgrupos encontrados neste estudo.

A predominância de genótipos no subgrupo verde reflete uma base genética comum, típica dos programas de melhoramento modernos, onde um número limitado de genitores é usado de forma repetida nos cruzamentos. A genealogia das cultivares modernas de cana-de-açúcar inclui menos de 20 clones de *S. officinarum*, como indicado por Raboin et al. (2008), e isso leva a uma diminuição da variabilidade genética dentro das populações de melhoramento. Essa estreita base genética tem implicações significativas para os programas de melhoramento. A redução da diversidade genética pode limitar o progresso genético, restringindo a capacidade de desenvolver variedades com características superiores, como maior resistência a doenças ou adaptação a novas condições ambientais. Um exemplo disso é o uso repetido de genitores com backgrounds genéticos semelhantes, como observado em vários dos genótipos analisados.

Para superar esse desafio, os programas de melhoramento têm utilizado genitores exóticos, como *S. spontaneum* e *S. robustum*, para introduzir novos alelos no pool genético, aumentando a variabilidade. O impacto dessa estratégia já pode ser observado nos genótipos de cana-energia, que exibem proporções variáveis de subgrupos genéticos, como no caso de IACBIO-232, que tem ascendência de *S. spontaneum*. No entanto, a incorporação de genótipos selvagens deve ser feita de forma equilibrada, de modo a manter a produtividade enquanto se amplia a variabilidade genética.

A



B

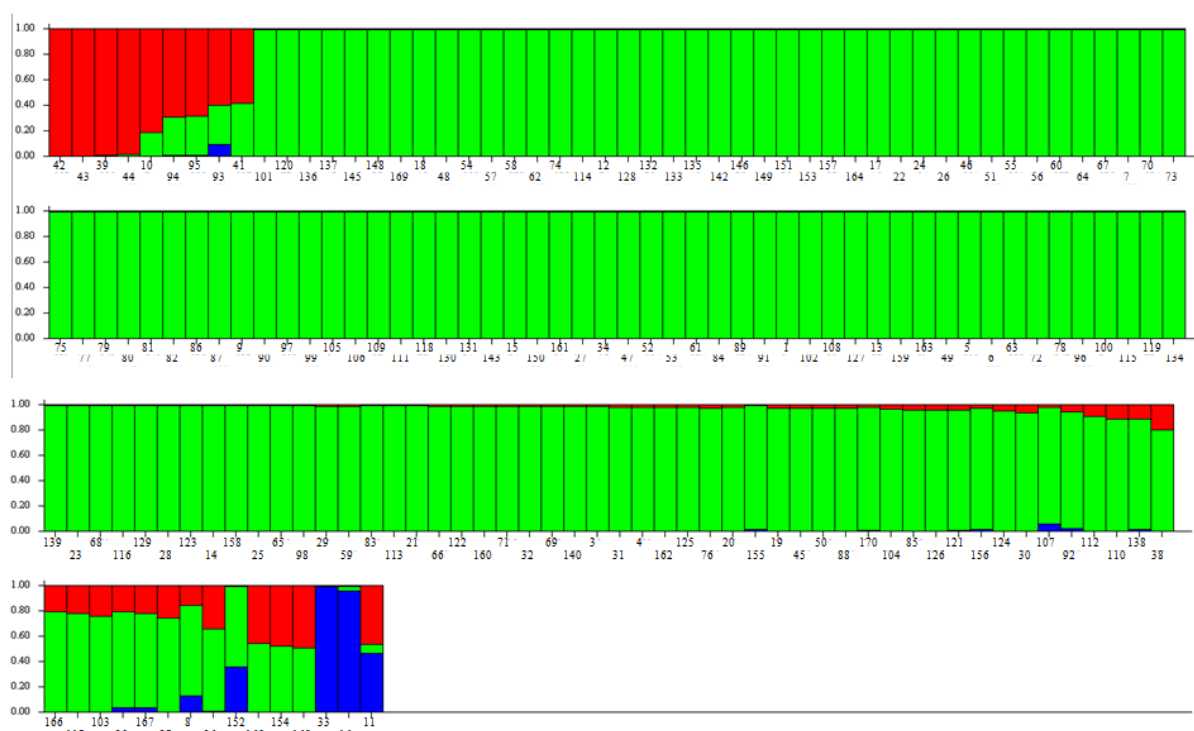


Figura 3: a) (delta k) Análise do melhor valor de K para os 165 genótipos, mostrando que o melhor valor para a inferência dos agrupamentos está em K=3; **b)** proporções de identidade entre os grupos para cada indivíduo. Cada linha vertical representa um indivíduo e as cores indicam a proporção de identidade de cada indivíduo para cada uma das subpopulações inferidas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A combinação das análises filogenéticas, de componentes principais (ACP) e de agrupamento Bayesiano (STRUCTURE) proporcionou uma visão abrangente da diversidade genética dos genótipos de cana-de-açúcar. A análise filogenética revelou clusters distintos, enquanto a ACP mostrou que os primeiros componentes capturam apenas parcialmente a variabilidade genética, devido à complexidade genética da cultura. O agrupamento Bayesiano confirmou a estrutura genética e destacou a predominância de um grupo comum, além de identificar genótipos com variabilidade adicional, resultante da inclusão de genitores selvagens.

Em conjunto, essas análises ressaltam a importância de utilizar múltiplas abordagens para compreender a diversidade genética em cana-de-açúcar. A integração dos resultados das diferentes metodologias fornece uma visão mais robusta da estrutura genética e da variabilidade, permitindo uma melhor interpretação dos padrões genéticos e uma fundamentação para estratégias de melhoramento. A combinação de diferentes ferramentas analíticas é essencial para abordar a complexidade genética e otimizar os programas de melhoramento, maximizando a diversidade e a adaptabilidade dos genótipos para atender às demandas futuras da indústria canavieira.

REFERÊNCIAS

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**, 17:281-282.

Burbano RC, da Silva MF, Coutinho AE, Gonçalves MC, dos Anjos IA, Anjos LO, Perecin D, Pinto LR (2022) Marker-trait association for resistance to sugarcane mosaic virus (SCMV) in a sugarcane (*Saccharum* spp.) panel. **Sugar Tech**, 24:1832-1844.

Cortes JD, Gutierrez AF, Hoy JW, Hale AL, Baisakh N (2024). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling smut resistance in Louisiana sugarcane using a bi-parental mapping population. **Plant Gene**, 37:100445.

Coutinho AE, da Silva MF, Perecin D, Carneiro R, Xavier MA, Landell MGA, Pinto LR (2022). Association mapping for sugarcane quality traits at three harvest times. **Sugar Tech**, 24:448-462.

D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao PS, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, 250:405-413.

D'Hont A, Glaszmann J (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proc. Int. Soc. Sugar. Technol.**, 24:556–559.

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

Fickett ND, Ebrahimi L, Parco AP, Gutierrez AV, Hale AL, Pontif MJ, Todd J, Kimbeng CA, Hoy JW, Ayala-Silva T (2020) An enriched sugarcane diversity panel for utilization in genetic improvement of sugarcane. **Sci. Rep.**, 10:13390.

Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, 11:94.

Khanbo S, Tangphatsornruang S, Piriyaongsa J, Wirojsirasak W, Punpee P, Klomsa-Ard P, Ukoskit K (2021) Candidate gene association of gene expression data in sugarcane contrasting for sucrose content. **Genomics**, 113:2813-2823.

Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I (2015) Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, 15:1179-1191.

Maccheroni W, Jordão H, Gaspari R, Moura G, Matsuoka S (2007) Development of a dependable microsatellite-based fingerprinting system for sugarcane. **Sugar Cane Intl** 27:8-13.

Manechini JRV, da Costa JB, Pereira BT, Carlini-Garcia LA, Xavier MA, Landell MGA, Pinto LR (2018) Unraveling the genetic structure of Brazilian commercial sugarcane cultivars through microsatellite markers. **PLoS One**, 13:e0195623.

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

Medeiros C, Balsalobre TWA, Carneiro MS (2020) Molecular diversity and genetic structure of *Saccharum* complex accessions. **PLoS One**, 15:e0233211.

Mutsaers H (2007) **Peasants, Farmers and Scientists: A Chronicle of Tropical Agricultural Science in the Twentieth Century**. Dordrecht: Springer, p. 608.

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:e110856.

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** 52:191-209.

Palhares AC, Rodrigues-Morais TB, et al. (2012) A novel linkage map of sugarcane with evidence for clustering of retrotransposon-based markers. **BMC Genet**, 13:51.

Pan Y-B (2010) Databasing molecular identities of sugarcane (*Saccharum* spp.) clones constructed with microsatellite (SSR) DNA markers. **American Journal of Plant Sciences**, 1:87-94.

Perera MF, Ostengo S, Malavera ANP, Balsalobre TWA, Onorato GD, Noguera AS, Hoffmann PH, Carneiro MS (2023). Genetic diversity and population structure of *Saccharum* hybrids. **PloS One**, 18:e0289504.

Pimenta RJG, Aono AH, et al. (2021) Genome-wide approaches for the identification of markers and genes associated with sugarcane yellow leaf virus resistance. **Scientific Reports**, 11:15730.

Piperidis G, Piperidis N, D'Hont A (2010) Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. **Mol. Genet. Genomics** 284:65–73.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155:945-959.

Raboin LM, Pauquet J, Butterfield M, D'Hont A, Glaszman JC (2008) Analysis of genome-wide linkage disequilibrium in the highly polyploid sugarcane. **Theor. Appl. Genet**, 116:701–714.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406-425.

Singh RK, Mishra SK, Singh SP, Mishra N, Sharma ML (2010) Evaluation of microsatellite markers for genetic diversity analysis among sugarcane species and commercial hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, 4:116-125.

Singh RK, Singh SP, Tiwari DK, Srivastava S, Singh SB, Sharma ML, Singh R, Mohapatra T, Singh NK (2013) Genetic mapping and QTL analysis for sugar yield-related traits in sugarcane. **Euphytica**, 191:333–353.

Wang T, Xu F, Wang Z, Wu Q, Cheng W, Que Y, Xu L (2023) Mapping of QTLs and screening candidate genes associated with the ability of sugarcane tillering and ratooning. **International Journal of Molecular Sciences**, 24:2793.

Xiong H, Chen Y, Gao SJ, Pan YB, Shi A (2022) Population structure and genetic diversity analysis in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) and six related *saccharum* species. **Agronomy**, 12:412.

CAPÍTULO 4 - Análise da curva de progresso do carvão da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação

RESUMO - A dinâmica do carvão, causado por *Sporisorium scitamineum*, é pouco explorada, apesar de seu impacto significativo na produtividade da cana-de-açúcar. Entender essa dinâmica e identificar genótipos resistentes é essencial para o manejo eficiente e programas de melhoramento genético. Esse estudo avaliou o progresso da doença em dezesseis genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação. As gemas foram inoculadas artificialmente pelo método de punctura e monitoradas por 198 dias. A resistência dos genótipos foi categorizada com base na Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença Relativa (AACPDR) em suscetíveis, moderadamente suscetíveis, resistentes e altamente resistentes. Modelos epidemiológicos (Monomolecular, Gompertz, Logístico e Exponencial) foram ajustados às curvas de progresso da doença utilizando análises de regressão linear e não linear. As curvas de progresso de carvão dos genótipos avaliados apresentaram, de forma geral, bons ajustes com os modelos matemáticos testados, com destaque para os modelos Monomoleculares e Gompertz, em concordância com estudos epidemiológicos anteriores da doença, em cana-de-açúcar.

Palavras-chave: modelos epidemiológicos, progresso da doença, *Saccharum*, *Sporisorium scitamineum*

CHAPTER 4 - Análise da curva de progresso do carvão da cana-de-açúcar em condições de casa de vegetação

ABSTRACT - The dynamics of smut, caused by *Sporisorium scitamineum*, are poorly explored despite its significant impact on sugarcane productivity. Understanding these dynamics and identifying resistant genotypes is essential for efficient management and breeding programs. This study evaluated disease progression in sixteen sugarcane genotypes under greenhouse conditions. Buds were artificially inoculated using the puncture method and monitored over 198 days. Genotype resistance was categorized based on the Relative Area Under the Disease Progress Curve (RAUDPC) as susceptible, moderately susceptible, resistant, and highly resistant. Epidemiological models (Monomolecular, Gompertz, Logistic, and Exponential) were fitted to disease progression curves using linear and nonlinear regression analyses. The smut disease progression curves of the evaluated genotypes generally showed good fits with the tested mathematical models, with emphasis on the Monomolecular and Gompertz models, in agreement with previous epidemiological studies of the disease in sugarcane.

Keywords: disease progression, epidemiological models, *Saccharum*, *Sporisorium scitamineum*

1 INTRODUÇÃO

O carvão, causado pelo fungo *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbr., M. Stoll & Oberw., anteriormente chamado de *Ustilago scitaminea* (Stoll et al., 2003), é uma das principais doenças da cana-de-açúcar em todo o mundo. Devido à falta de outros métodos eficientes de controle, o desenvolvimento de variedades resistentes ainda é o principal meio de controle da doença. *S. scitamineum* é um fungo biotrófico que causa perdas de rendimento e baixa qualidade da cana-de-açúcar em quase todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar do mundo (Bhuiyan et al., 2021). Os esporídios haplóides de tipos opostos (MAT-1 e MAT-2) se fundem para formar uma hifa dicariótica diplóide, que invade o tecido apical da planta, resultando em atrofiamento e perfilhamento (Yan et al., 2016). O patógeno então faz com que a planta produza uma estrutura semelhante a um chicote ('sorus'), no ápice da planta, contendo tecido vegetal e hifas do fungo, dentro das quais encontram-se os teliosporos de coloração preta (Marques et al., 2018; Agisha et al., 2021). Esses teliosporos se dispersam, principalmente pelo vento e infectam novos tecidos meristemáticos, causando uma nova onda de doença.

Além dos chicotes, as plantas infectadas geralmente exibem crescimento reduzido e produzem colmos finos e delgados, com nós amplamente espaçados (Lee-Lovick, 1978). Apresentam também, perfilhamento excessivo, com brotos mais finos e eretos, além de folhas menores e mais estreitas (Comstock, 2000). A importância dessa doença torna-se ainda mais evidente quando consideramos que, em áreas afetadas, as perdas podem chegar a 100%, especialmente em cultivares suscetíveis. A redução no rendimento e na qualidade da cana-de-açúcar varia amplamente nas diferentes áreas de cultivo de cana-de-açúcar no mundo e depende principalmente das raças do patógeno presente, das variedades de cana-de-açúcar e das condições ambientais prevalentes (Lee-Lovick, 1978).

A incidência da doença, baseada no comportamento do fungo em condições epidêmicas, pode ser analisada por meio de curvas de progresso. Dada sua relevância e o impacto econômico causado, é essencial realizar estudos que avaliem essas curvas para uma melhor compreensão da doença. Curvas de progresso mostram a relação entre a proporção da doença e o tempo, e é geralmente traçada

com dados acumulados de incidência da doença ao longo de um período de tempo (Van der Plank, 1963). Em uma única imagem é capturada a interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente (Kranz, 1974).

Estudos de análise da curva do progresso de doenças em plantas são realizados com a utilização de modelos matemáticos. Dependendo do modelo utilizado, essa curva pode indicar diversos parâmetros, como o início da epidemia, a quantidade inicial de inóculo, a velocidade de desenvolvimento da doença, o formato da curva, a área sob a curva, as quantidades máxima e final de doença, e a duração da epidemia (Bergamin Filho, 1995). Os modelos mais empregados incluem o modelo logístico, o modelo de Gompertz e o modelo monomolecular. Cada um desses modelos oferece uma perspectiva distinta sobre a taxa de progresso e o comportamento da epidemia ao longo do tempo (Bergamin Filho e Amorim, 1996). O modelo monomolecular se ajusta bem às doenças de juro simples (Van der Plank, 1963). Por outro lado, os modelos logísticos (Van der Plank, 1963) e de Gompertz (Kranz, 1974), conhecidos por mostrarem melhor ajustes às doenças de juro compostos, são utilizados com frequência para compreender epidemias de doenças de plantas.

Considerando que são escassas as informações sobre a dinâmica do carvão na cana-de-açúcar, este trabalho objetivou a avaliação do progresso do carvão em genótipos de cana-de-açúcar em casa de vegetação e a sua representação em modelos matemáticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Dezesseis genótipos foram selecionados a partir de um painel composto por 165 genótipos, os quais foram inoculados artificialmente pelo método de punctura e avaliados em casa de vegetação por 198 dias. Com base na avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença Relativa (AACPDR), tomando como referência o genótipo mais suscetível do painel, os mesmos foram classificados em: suscetíveis (CO213, IAC16-2134, IAC16-2144, IA66-6); moderadamente suscetíveis

(IACSP04-3150, IACBIO-279, VERTIX7, IAC16-2140); resistentes (IAC16-2053, IACSP97-4039, IACSP-2430, IACSP94-4004); altamente resistentes (SES205A, IACSP96-2008, IACSP04-6035, IACCTC05-9534). A seguir é descrito como foi conduzido o ensaio para avaliação da reação dos genótipos ao carvão.

2.3 Ensaio Casa de vegetação

O ensaio foi conduzido no Centro de Cana do Instituto Agronômico (IAC/APTA), em Ribeirão Preto - SP, de março de 2022 a maio de 2023. Gemas individuais de cada genótipo, extraídas de colmos com 10 meses de idade, foram selecionadas utilizando a metodologia de mudas pré-brotadas (MPB) (Landell et al., 2012). Antes do plantio, as gemas foram inoculadas artificialmente pelo método de punctura (Matsuoka et al., 1986; Ferreira e Comstock, 1989). Para a inoculação, preparou-se uma suspensão de esporos do fungo *S. scitamineum* ($4,5 \times 10^5$ esporos/mL) com germinação superior a 90%, utilizando 0,2 g de teliósporos, 1,5 ml de água destilada e 2 µl de Tween 80. As gemas foram perfuradas com agulhas hipodérmicas de 25 x 0,70 mm, e após a inoculação, plantadas em bandejas plásticas de 50 células, em formato quadrado com volume de 136 ml cada, com substrato composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico, resíduos orgânicos agroindustriais classe A e calcário (Carolina Soil Classe XVI), e incubada em câmara de brotação a 30°C e umidade relativa acima de 85%, por 48 horas. A temperatura foi então ajustada para 35°C por uma semana para promover a brotação. As bandejas foram transferidas para a casa de vegetação, onde foram irrigadas por aspersão 15 minutos, duas vezes ao dia, até o final das avaliações.

2.4 Avaliação e obtenção dos dados

2.4.1 Avaliação da Incidência do Carvão

As avaliações iniciaram dois meses após o plantio das gemas inoculadas, quando os primeiros sinais da doença apareceram nos genótipos, e continuaram semanalmente durante 198 dias. A cada avaliação, os genótipos com chicotes foram

removidos da casa de vegetação e descartados para prevenir infestações secundárias.

A incidência da doença, expressa como a porcentagem de plantas com chicotes, foi calculada com base na relação entre o número de plantas com chicote e o número total de plantas em cada parcela. A fórmula utilizada foi:

Incidência da doença (%) = (Nº de plantas com chicote/total de gemas brotadas) x 100.

2.4.2 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD)

Com base nas avaliações semanais da incidência de chicotes, foi calculada a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD), utilizando a equação de de Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

em que: AACPD = área abaixo da curva de progresso da doença; y_i = proporção da doença na i -ésima observação, t_i = tempo na i -ésima observação (em dias); e n = número total de observações em um tempo t .

A AACPD foi determinada em cada avaliação até o término do ciclo de leituras do experimento (maio de 2023). Esses valores foram usados para calcular a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença Relativa (AACPDR).

2.4.3 Diferenças esperadas preditas (DEPs) e modelos epidemiológicos

Um subgrupo de 16 genótipos anteriormente selecionado, consistiu em três genótipos com maior AACPDR da classe suscetível, juntamente com o padrão de suscetibilidade, o IAC6-66, e quatro genótipos com maior AACPDR para as classes restantes de reação ao carvão.

Os dados de incidência acumulada de carvão destes subgrupos foram analisados pelo Proc Mixed do SAS, com blocos e dias após a emissão do primeiro chicote fixos e genótipos aleatórios para obtenção das diferenças esperadas preditas (DEPs), que são os efeitos positivos ou negativos na média geral do

subgrupo para cada genótipo, enquanto as médias dos três blocos da incidência acumulada da doença por avaliação e por genótipo foram obtidas pelo Proc GLM do SAS.

Com as médias de incidência acumulada de carvão dos genótipos suscetíveis e moderadamente suscetíveis foi realizado o ajuste aos modelos Exponencial, Monomolecular, Logístico e Gompertz, em suas formas linearizadas e não-linearizadas, usando o pacote R epifitter (Alves e Del Ponte, 2021).

A escolha dos melhores modelos se baseou no coeficiente de determinação (R^2), desvio padrão residual (residual standard deviation, RSE), e o coeficiente de correlação de concordância de Lin (Lin's concordance correlation coefficient, CCC). Os gráficos de progresso da doença ajustado ao melhor modelo para cada genótipo foram obtidos por meio dos pacotes R ggplot2, dplyr e cowplot.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diferenças esperadas preditas (DEPs)

Os efeitos de cada um dos 16 genótipos em relação à média geral do subgrupo estão demonstrados na Figura 1. Para os genótipos da classe de reação suscetível, há uma expectativa de aumento na incidência acumulada de carvão, com DEPs variando de + 0,12 a + 0,29. Os genótipos moderadamente suscetíveis apresentaram em sua maioria efeitos negativos, com DEPs variando de -0,04 a -0,06, sendo o genótipo IACBIO-279 uma exceção, apresentando de DEP de + 0,2.

Todos os genótipos das classes de reação resistente e altamente resistente possuem efeitos negativos para incidência acumulada de chicotes, sendo os genótipos altamente resistentes os com valores DEP mais negativos, de -0,11 a -0,12.

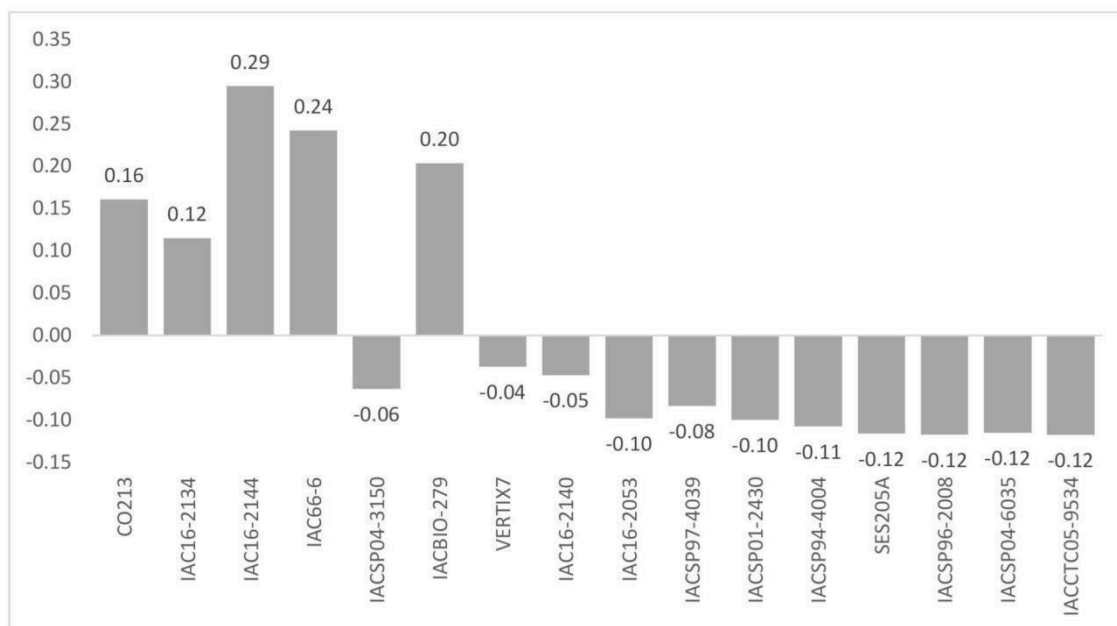


Figura 1. Diferença esperada predita (DEP) de 16 genótipos de cana-de-açúcar classificados em quatro categorias de reação ao carvão. Suscetíveis: CO213, IAC16-2134, IAC16-2144, IAC66-6; Moderadamente suscetíveis: IACSP04-3150, IACBIO-279, VERTIX7, IAC16-2140; Resistentes: IAC16-2053, IACSP97-4039, IACSP-2430, IACSP94-4004; Altamente resistentes: SES205A, IACSP96-2008, IACSP04-6035, IACCTC05-9534.

3.2 Curvas de progresso da doença e avaliação dos modelos epidemiológicos

Para a análise da curva de progresso e avaliação dos modelos de evolução da doença foram considerados somente os genótipos suscetíveis e moderadamente suscetíveis, visto que nas classes resistente e altamente resistentes a incidência da doença foi muito baixa.

A incidência da doença, baseada no comportamento do patógeno em condições epidêmicas, pode ser representada por meio de curvas de progresso. Assim, a construção de modelos que descrevem o progresso da doença ao longo do tempo pode ser útil para estimar a doença e as tomadas de decisão para o manejo (Campbell e Madden, 1990).

Os melhores modelos obtidos para os genótipos suscetíveis e moderadamente suscetíveis foram, em sua maioria, consistentes entre as análises de regressão linear (Tabela 1) e não linear (Tabela 2), com exceção do genótipo

suscetível IAC16-2144, ajustando-se ao modelo Monomolecular na primeira análise e ao Gompertz na segunda.

Tabela 1. Ajuste a modelos epidemiológicos de curvas de progresso de carvão em cultivares suscetíveis e moderadamente suscetíveis por meio de análise de regressão linear, com estimativas de taxa de infecção (r) e inóculo inicial (y_0).

Genótipos	Modelos	CC C	R ²	RSE	r	Erro padrão	y_0	y_0 linearizad o	Erro padrão
CO213 ^a	1	0,98	0,96	0,073	5,84E-03	1,96E-04	-8,64E-02	-8,29E-02	1,97E-02
CO213 ^a	2	0,94	0,89	0,283	1,40E-02	7,65E-04	1,10E-02	-1,51E+00	7,68E-02
CO213 ^a	3	0,80	0,67	1,339	3,31E-02	3,62E-03	1,21E-02	-4,40E+00	3,63E-01
CO213 ^a	4	0,73	0,58	1,345	2,73E-02	3,64E-03	1,33E-02	-4,32E+00	3,65E-01
IAC16-2134 ^a	2	0,97	0,95	0,273	2,08E-02	7,37E-04	1,15E-05	-2,43E+00	7,40E-02
IAC16-2134 ^a	1	0,96	0,91	0,135	7,62E-03	3,65E-04	-2,90E-01	-2,54E-01	3,66E-02
IAC16-2134 ^a	3	0,90	0,81	1,747	6,27E-02	4,73E-03	1,91E-04	-8,56E+00	4,74E-01
IAC16-2134 ^a	4	0,86	0,75	1,839	5,50E-02	4,97E-03	2,46E-04	-8,31E+00	4,99E-01
IAC16-2144 ^a	1	0,96	0,93	0,224	1,40E-02	6,06E-04	-3,80E-01	-3,22E-01	6,08E-02
IAC16-2144 ^a	2	0,96	0,92	0,455	2,65E-02	1,23E-03	1,92E-04	-2,15E+00	1,24E-01
IAC16-2144 ^a	3	0,86	0,75	2,052	6,21E-02	5,55E-03	9,07E-04	-7,00E+00	5,57E-01
IAC16-2144 ^a	4	0,78	0,63	2,110	4,81E-02	5,71E-03	1,25E-03	-6,68E+00	5,72E-01
IAC6-66 ^a	1	0,95	0,90	0,128	6,64E-03	3,46E-04	-1,36E-02	-1,35E-02	3,48E-02
IAC6-66 ^a	2	0,88	0,79	0,447	1,50E-02	1,21E-03	1,89E-02	-1,38E+00	1,21E-01
IAC6-66 ^a	3	0,71	0,55	1,921	3,71E-02	5,19E-03	1,09E-02	-4,50E+00	5,21E-01
IAC6-66 ^a	4	0,64	0,47	1,887	3,05E-02	5,10E-03	1,12E-02	-4,49E+00	5,12E-01
IACSP04-3150 ^b	2	0,94	0,90	0,232	1,18E-02	6,28E-04	1,64E-05	-2,40E+00	6,30E-02
IACSP04-3150 ^b	1	0,94	0,88	0,031	1,44E-03	8,37E-05	-5,32E-02	-5,18E-02	8,40E-03
IACSP04-3150 ^b	3	0,89	0,80	1,551	5,34E-02	4,19E-03	6,83E-05	-9,59E+00	4,21E-01
IACSP04-3150 ^b	4	0,88	0,79	1,563	5,20E-02	4,23E-03	7,20E-05	-9,54E+00	4,24E-01
IACBIO-279 ^b	1	0,90	0,82	0,126	4,65E-03	3,41E-04	6,73E-02	6,96E-02	3,42E-02
IACBIO-279 ^b	2	0,79	0,65	0,608	1,42E-02	1,64E-03	1,08E-02	-1,51E+00	1,65E-01
IACBIO-279 ^b	3	0,69	0,52	2,485	4,49E-02	6,72E-03	2,92E-03	-5,83E+00	6,74E-01
IACBIO-279 ^b	4	0,65	0,49	2,389	4,02E-02	6,46E-03	2,73E-03	-5,90E+00	6,48E-01
VERTIX ^{7b}	1	0,97	0,95	0,020	1,42E-03	5,35E-05	-2,46E-02	-2,43E-02	5,37E-03

VERTIX7 ^b	2	0,89	0,80	0,307	1,06E-02	8,30E-04	3,79E-04	-2,06E+00	8,33E-02
VERTIX7 ^b	3	0,81	0,68	1,809	4,57E-02	4,89E-03	3,84E-04	-7,86E+00	4,91E-01
VERTIX7 ^b	4	0,80	0,67	1,806	4,43E-02	4,88E-03	3,94E-04	-7,84E+00	4,90E-01
IAC16-2140 ^b	1	0,92	0,85	0,025	1,02E-03	6,66E-05	-4,73E-03	-4,72E-03	6,69E-03
IAC16-2140 ^b	2	0,83	0,71	0,344	9,36E-03	9,30E-04	6,52E-04	-1,99E+00	9,33E-02
IAC16-2140 ^b	3	0,77	0,63	1,915	4,29E-02	5,18E-03	4,66E-04	-7,67E+00	5,20E-01
IAC16-2140 ^b	4	0,76	0,62	1,901	4,18E-02	5,14E-03	4,69E-04	-7,67E+00	5,16E-01

a :Genótipo suscetível ao carvão; b: genótipo moderadamente suscetível ao carvão; 1: Monomolecular; 2: Gompertz ; 3: Logístico; 4:Exponencial; CCC: coeficiente de correlação de concordância de Lin; RSE: desvio padrão residual.

Tabela 2. Ajuste a modelos epidemiológicos de curvas de progresso de carvão em cultivares suscetíveis e moderadamente suscetíveis por meio de análise de regressão não linear, com estimativas de taxa de infecção (r) e inóculo inicial (y0).

Genótipos	Modelos	CCC	R ²	RSE	r	Erro padrão	y0	Erro padrão
CO213 ^a	1	0,98	0,95	0,050	5,83E-03	2,26E-04	-8,91E-02	1,70E-02
CO213 ^a	2	0,96	0,93	0,060	1,21E-02	6,79E-04	3,46E-02	8,28E-03
CO213 ^a	3	0,93	0,88	0,080	1,83E-02	1,40E-03	7,67E-02	1,19E-02
CO213 ^a	4	0,87	0,80	0,106	9,45E-03	9,08E-04	1,20E-01	1,66E-02
IAC16-2134 ^a	2	0,98	0,97	0,049	1,77E-02	8,41E-04	1,02E-03	6,69E-04
IAC16-2134 ^a	3	0,97	0,94	0,071	2,71E-02	1,80E-03	2,55E-02	5,66E-03
IAC16-2134 ^a	1	0,92	0,87	0,101	6,02E-03	4,39E-04	-1,73E-01	3,51E-02
IAC16-2134 ^a	4	0,91	0,86	0,107	1,33E-02	1,12E-03	6,73E-02	1,24E-02
IAC16-2144 ^a	2	0,99	0,99	0,047	3,26E-02	1,58E-03	3,72E-05	4,77E-05
IAC16-2144 ^a	3	0,99	0,98	0,064	5,14E-02	3,56E-03	1,32E-02	3,88E-03
IAC16-2144 ^a	1	0,94	0,89	0,121	1,11E-02	8,00E-04	-2,26E-01	4,88E-02
IAC16-2144 ^a	4	0,83	0,74	0,191	9,67E-03	1,12E-03	1,73E-01	2,95E-02
IAC6-66 ^a	1	0,97	0,95	0,058	7,39E-03	3,13E-04	-7,14E-02	2,10E-02
IAC6-66 ^a	2	0,95	0,90	0,080	1,32E-02	9,34E-04	6,01E-02	1,45E-02
IAC6-66 ^a	3	0,91	0,84	0,101	1,86E-02	1,72E-03	1,12E-01	1,79E-02
IAC6-66 ^a	4	0,81	0,71	0,135	7,81E-03	9,11E-04	1,80E-01	2,37E-02
IACSP04-3150 ^b	2	0,99	0,98	0,013	7,81E-03	2,77E-04	2,00E-03	5,30E-04
IACSP04-3150 ^b	3	0,98	0,96	0,017	1,93E-02	9,34E-04	8,46E-03	1,31E-03
IACSP04-3150 ^b	4	0,97	0,95	0,019	1,68E-02	8,81E-04	1,04E-02	1,57E-03

IACSP04-3150 ^b	1	0,93	0,87	0,028	1,37E-03	8,34E-05	-4,73E-02	8,06E-03
IACBIO-279 ^b	1	0,92	0,85	0,082	5,74E-03	3,99E-04	-1,10E-02	2,80E-02
IACBIO-279 ^b	2	0,85	0,75	0,106	9,24E-03	1,00E-03	1,03E-01	2,30E-02
IACBIO-279 ^b	3	0,80	0,69	0,119	1,32E-02	1,70E-03	1,44E-01	2,36E-02
IACBIO-279 ^b	4	0,73	0,61	0,133	6,81E-03	9,84E-04	1,82E-01	2,49E-02
VERTIX7 ^b	1	0,97	0,94	0,018	1,43E-03	5,55E-05	-2,55E-02	5,23E-03
VERTIX7 ^b	2	0,93	0,88	0,027	5,37E-03	3,83E-04	1,82E-02	3,81E-03
VERTIX7 ^b	3	0,90	0,84	0,032	1,25E-02	1,10E-03	2,80E-02	4,50E-03
VERTIX7 ^b	4	0,88	0,82	0,034	1,07E-02	9,93E-04	3,07E-02	4,78E-03
IAC16-2140 ^b	1	0,92	0,86	0,022	1,05E-03	6,68E-05	-7,48E-03	6,33E-03
IAC16-2140 ^b	2	0,84	0,75	0,030	4,03E-03	4,34E-04	2,44E-02	5,20E-03
IAC16-2140 ^b	3	0,80	0,70	0,033	9,91E-03	1,23E-03	3,16E-02	5,46E-03
IAC16-2140 ^b	4	0,79	0,69	0,034	8,76E-03	1,13E-03	3,33E-02	5,58E-03

a: Genótipo suscetível ao carvão; b: genótipo moderadamente suscetível ao carvão; 1: Monomolecular; 2: Gompertz; 3: Logístico; 4: Exponencial; CCC: coeficiente de correlação de concordância de Lin; RSE: desvio padrão residual.

O ajuste de curvas de progresso às formas linearizadas dos modelos Monomolecular, Gompertz, Logístico e Exponencial é uma abordagem comumente empregada devido a sua facilidade de implementação e interpretação (Xu et al., 2006; Madden et al., 2007; Alves e Del Ponte, 2021). Por outro lado, o ajuste às formas não linearizadas dos modelos epidemiológicos envolve menos premissas e sua crescente disponibilidade frente aos avanços na capacidade de processamento computacional vem tornando essa abordagem mais atraente para os estudos de epidemiologia (Xu et al., 2006). Dessa forma, foi dado maior enfoque nos melhores modelos indicados pela análise de regressão não linear.

Assim, considerando a análise de regressão não linear (Tabela 2), os modelos que melhor se ajustaram às curvas de progresso para os genótipos suscetíveis CO213 e IAC6-66, e moderadamente suscetíveis IACBIO-279, VERTIX7 e IAC16-2140 foram o Monomolecular, seguido pelo Gompertz, devido aos maiores valores R^2 e CCC, e aos menores RSE. Por outro lado, os genótipos suscetíveis IAC16-2134 e IAC16-2144, e o moderadamente suscetível IACSP04-3150, apresentaram melhores ajustes ao modelo de Gompertz seguido pelo Logístico, de

acordo com os valores R^2 , CCC e RSE. Considerando o melhor modelo para cada um dos oito genótipos testados, a maior taxa de infecção (r) foi observada para IAC16-2144, seguido por IAC16-2134, IACSP04-3150, IAC6-66, CO213, IACBIO-279, VERTIX7 e IAC16-2140. As estimativas de inóculo inicial (y_0) para os modelos que melhor se ajustaram a cada um dos genótipos revelaram maiores valores para IACSP04-3150, IAC16-2134, IAC16-2144, IAC16-2140, IACBIO-279, VERTIX7, IAC6-66 e CO213.

Nota-se que os genótipos que melhor se ajustaram ao modelo de Gompertz apresentaram maiores valores r e Y_0 , o que não possui uma correspondência exata com os valores de DEP da Figura 1, e com as curvas de progresso da doença apresentadas nas Figuras 1 e 2, principalmente ao compararmos o cultivar suscetível IAC6-66 e o moderadamente suscetível IACSP04-3150.

Assumindo o modelo de Gompertz para todos os genótipos, os valores r passaram a ter mais coerência biológica, com o cultivar IAC16-2144 possuindo maior valor r , seguido por IAC16-2134, IAC6-66, CO213, IACBIO-279, IACSP04-3150, VERTIX7 e IAC16-2140. Já os valores y_0 estimados pelo modelo Gompertz foram maiores para IACBIO-279, seguido por IAC6-66, CO213, IAC16-2140, VERTIX7, IACSP04-3150, IAC16-2134 e IAC16-2144. Uma ressalva para este comparativo, usando somente o modelo de Gompertz, consiste nos baixos valores R^2 para os genótipos IACBIO-279 e IAC16-2140, estando em torno de 0,75. No entanto, mesmo o modelo Monomolecular apresentou valores R^2 em torno de 0.85 para estes dois genótipos, evidenciando a natureza aproximativa do ajuste das curvas de progresso da doença aos modelos matemáticos. Outro ponto a ser levado em consideração é o paralelo entre as estimativas de y_0 e as condições experimentais envolvendo inoculação artificial pelo método de punctura e condução em casa de vegetação. Em tese, todos os genótipos receberam a mesma pressão de inóculo, sendo as diferenças observadas em y_0 atribuídas às respostas diferenciadas dos genótipos à inoculação com *S. scitamineum*.

Curvas do progresso da doença foram geradas (Figura 1 e 2) com o tempo de avaliação no eixo X e a incidência da doença no eixo Y, com os modelos que melhor se ajustaram para cada genótipo, conforme mostrado na Tabela 2.

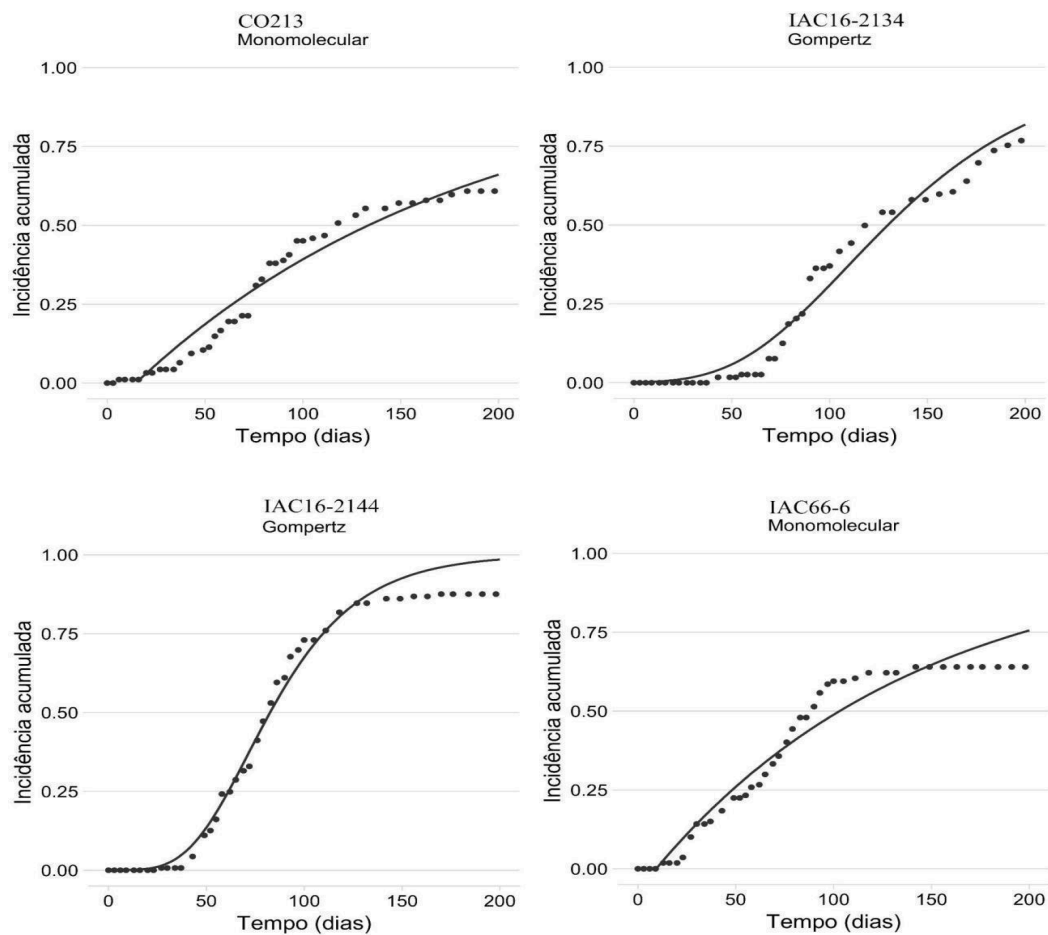


Figura 1. Progresso da incidência acumulada de genótipos suscetíveis ao carvão ajustado ao melhor modelo epidemiológico de acordo com análise de regressão não linear.

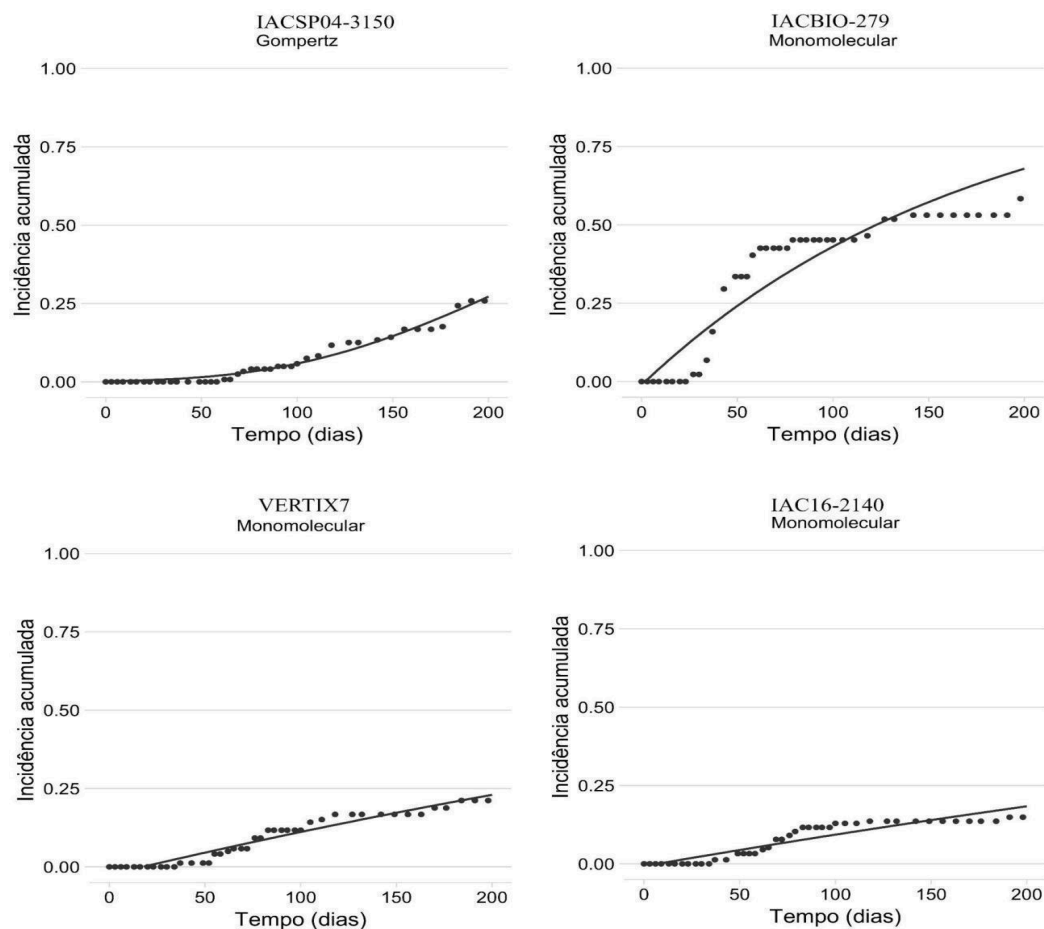


Figura 2. Progresso da incidência acumulada de genótipos moderadamente suscetíveis ao carvão ajustado ao melhor modelo epidemiológico de acordo com análise de regressão não linear.

Os gráficos ilustram a evolução da doença (dados acumulados), considerando a incidência de chicotes em cada genótipo. A progressão da doença nos genótipos avaliados apresentou comportamentos distintos entre e dentro dos grupos suscetíveis e moderadamente suscetíveis, refletindo diferentes dinâmicas de infecção ao longo do tempo. De forma geral, os genótipos suscetíveis demonstraram um avanço mais acelerado da doença nos estágios iniciais, com taxas de infecção que atingem um platô em níveis mais elevados. A estabilização, nesse caso, ocorre de forma gradual e se prolonga até o final do período avaliado, mostrando a alta vulnerabilidade desses genótipos ao patógeno. Por outro lado, os genótipos moderadamente suscetíveis apresentaram um progresso mais lento e contínuo, com curvas que indicam menor intensidade na taxa de infecção, consistentes com o

modelo monomolecular. Em alguns casos, a estabilização foi atingida antes do final do período de avaliação, sugerindo maior capacidade de contenção natural ou menor severidade da doença nesses genótipos.

Os modelos Gompertz e Monomolecular se destacaram na descrição das curvas, com o Gompertz associado a infecções rápidas e uma estabilização precoce, e o Monomolecular ajustando-se melhor a progressões lineares e constantes. As diferenças nos padrões observados reforçam a influência do genótipo na dinâmica do progresso da doença, mesmo em condições controladas de inoculação artificial.

Através dessa análise também é possível observar que o modelo monomolecular forneceu, na maioria das vezes, melhor ajuste para incidência do carvão da cana-de-açúcar, corroborando, em parte, com os achados de Amorim (1989) e Momol (1986). Amorim descreve a predominância do modelo monomolecular na descrição da progressão da doença, em cana-soca. E como já destacado por Momol (1986), o modelo monomolecular pode capturar com maior precisão o comportamento da doença em genótipos que apresentam progressões mais lentas e constantes, como observadas neste estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As curvas de progresso de carvão dos genótipos avaliados apresentaram, de forma geral, bons ajustes com os modelos matemáticos testados, com destaque para os modelos Monomolecular e Gompertz, em concordância com estudos epidemiológicos anteriores da doença em cana-de-açúcar. Os resultados do presente capítulo fornecem subsídios para a compreensão da evolução do carvão em genótipos suscetíveis e moderadamente suscetíveis de cana-de-açúcar sob condições experimentais de inoculação artificial por punctura e condução em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- Agisha VN, Ashwin NMR, Vinodhini RT, Nalayani K, Ramesh Sundar A, Malathi P, Viswanathan R (2021) Protoplast-mediated transformation in *Sporisorium scitamineum* facilitates visualization of in planta developmental stages in sugarcane. **Molecular Biology Reports**, 48:7921-7932.
- Alves KS, Del Ponte EM (2021) Analysis and simulation of plant disease progress curves in R: introducing the epifitter package. **Phytopathology Research**, 3:1-13.
- Amorim L (1989) **Epidemiologia do carvão (*Ustilago scitaminea*, Syd.) da cana-de-açúcar: curvas anuais e poliéticas de progresso da doença**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Bergamin Filho A (1995) Curvas de progresso da doença. In: Bergamin Filho A, Kimati H, Amorim L (Eds.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 602-625.
- Bergamin Filho A, Amorim L (1996) O fitopatossistema temperado. In: **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 99-126.
- Bhuiyan SA, Magarey RC, McNeil MD, Aitken KS (2021) Sugarcane smut, caused by *Sporisorium scitamineum*, a major disease of sugarcane: a contemporary review. **Phytopathology** 111:1905–1917.
- Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley & Sons, 523p.
- Comstock JC (2000) Smut. In: Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Sauntally AS (Eds.) **A Guide to Sugarcane Diseases**. Montpellier: CIRAD/ISCCT Publishers, p. 181–185.
- Ferreira SA, Comstock JC (1989) Smut. In: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie Jr AG, Hughes CG (Eds.) **Diseases of Sugarcane – Major Disease**. Amsterdam: Elsevier, p. 211-229.
- Kranz J (1974) The role and scope of mathematical analysis and modeling in epidemiology. In: **Epidemics of plant diseases: mathematical analysis and modeling**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 7-54.
- Landell MGA, Campana MP et al. (2012) **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agronômico de Campinas, 17p. (IAC. Documentos, 109).
- Lee-Lovick GL (1978) Smut of Sugarcane-*Ustilago scitaminea*. **Review of Plant Pathology**, 57:181-188.

Madden LV, Hughes G, Van den Bosch F (2007). The study of plant disease epidemics. St. Paul: The American Phytopathological Society, 432 p.

Marques JPR, Hoy JW, Appezzato-da-Glória B, Viveros AFG, Vieira MLC, Baisakh N (2018) Sugarcane cell wall-associated defense responses to infection by *Sporisorium scitamineum*. **Frontiers in Plant Science**, 9:698.

Matsuoka S, Sordi RA, Masuda Y, Arizona H (1986) Reliability and feasibility of the needle-bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clones. In: Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technology, 19:375-385.

Momol MT (1986) **Epidemiological Studies of Sugarcane Smut**. 71 f. Tese de doutorado, University of Florida, Gainesville.

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, 67:1051-1056.

Stoll M, Piepenbring M, Begerow D, Oberwinkler F (2003) Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. **Canadian Journal of Botany**, 81:976–984.

Van der Plank JE (1963) Plant diseases: epidemics and control. New York: Academic Press, 349p.

Xu X (2006) Modeling and interpreting disease progress in time. In: Cooke BM, Jones DG, Kaye B (Eds.) **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Springer, p. 215–238.

Yan MX, Zhu GN, et al. (2016) The mating-type locus b of the sugarcane smut *Sporisorium scitamineum* is essential for mating, filamentous growth and pathogenicity. **Fungal Genetics and Biology**, 86:1-8.