

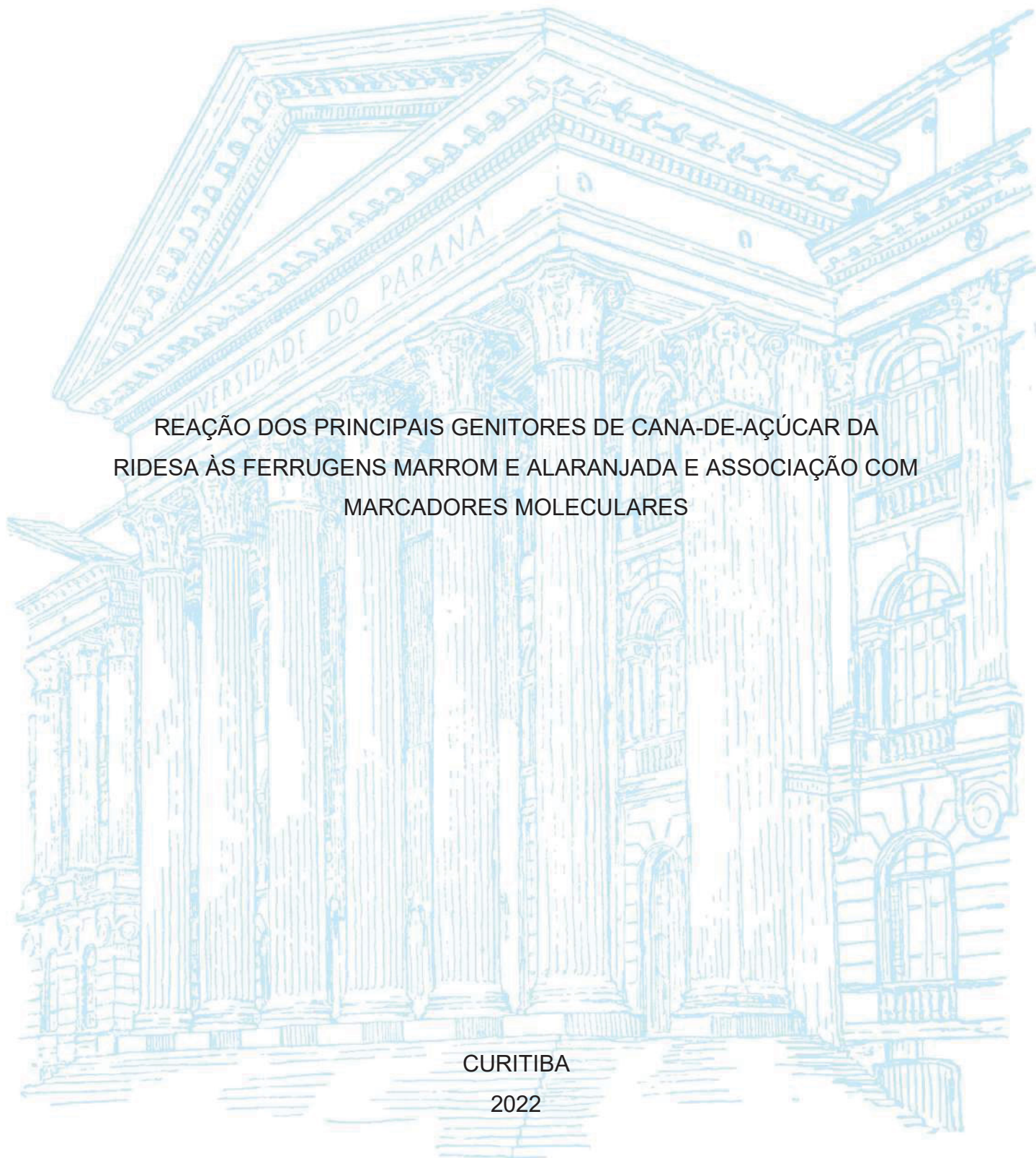
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANE BORELLA

REAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA  
RIDESA ÀS FERRUGENS MARROM E ALARANJADA E ASSOCIAÇÃO COM  
MARCADORES MOLECULARES

CURITIBA

2022



JULIANE BORELLA

REAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA  
RIDESA ÀS FERRUGENS MARROM E ALARANJADA E ASSOCIAÇÃO COM  
MARCADORES MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bepalhok Filho

Coorientadores: Prof. Dr. Bruno Portela Brasileiro

Profa. Dra Lucimeris Ruaro

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Borella, Juliane

Reação dos principais genitores de cana-de-açúcar da Ridesa às ferrugens marrom e alaranjada e associação com marcadores moleculares. / Juliane Borella. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bespalhok Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Portela Brasileiro.

Coorientador: Profa. Dra. Lucimeris Ruaro.

1. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético. 2. Germoplasma vegetal. I. Bespalhok Filho, João Carlos. II. Brasileiro, Bruno Portela. III. Ruaro, Lucimeris. IV. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação Agronomia (Produção Vegetal). V. Título.

Bibliotecário: Douglas Alex Jankoski CRB-9/1167



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JULIANE BORELLA** intitulada: **REAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA ÀS FERRUGENS MARROM E ALARANJADA E ASSOCIAÇÃO COM MARCADORES MOLECULARES**, sob orientação do Prof. Dr. JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Maio de 2022.

Assinatura Eletrônica

05/05/2022 15:17:47.0

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/05/2022 13:15:14.0

LUCIMERIS RUARO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/05/2022 13:26:48.0

BRUNO PORTELA BRASILEIRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/05/2022 20:04:24.0

ROBERTO GIACOMINI CHAPOLA

Avaliador Externo (PMGCA/UFSCAR)

Assinatura Eletrônica

05/05/2022 14:15:36.0

AMARO AFONSO CAMPOS DE AZEREDO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5601 - E-mail: [pgapv@ufpr.br](mailto:pgapv@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 181842

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 181842

**Dedico este trabalho aos meus pais e noivo,  
pessoas especiais que fizeram toda diferença  
para que eu obtivesse sucesso em meu  
trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família Caitano, Elenir e Junior por me mostrarem o caminho do bem, por apoiarem nas minhas decisões e estarem sempre presentes quando precisei.

Ao meu noivo Jonathan William Trautenmüller, pelo companheirismo em todos os momentos, por sempre acreditar em mim e incentivar a correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu orientador e amigo, professor João Carlos Bernaldo Filho, pelo apoio, paciência e dedicação para realização do trabalho. Obrigada pela amizade, confiança e ensinamentos.

Aos meus coorientadores professor Bruno Portela Brasileiro e professora Lucimeris Ruaro pela amizade e por auxiliarem no desenvolvimento da tese. Ao Amaro Afonso Campos de Azeredo, pela amizade e por contribuir no desenvolvimento do trabalho. Ao professor Ricardo Augusto de Oliveira pelo apoio e participação no trabalho.

A toda equipe da Estação Experimental de Paranavaí meu imenso agradecimento pelo apoio na implantação e coleta de dados do experimento, pela amizade, consideração.

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da Universidade Federal do Paraná pertencente à Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético - PMGCA / RIDESA / UFPR pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar os estudos necessários para a conclusão do Doutorado.

À CAPES, pela concessão da bolsa no período de realização do doutorado.

A todos os professores da Pós-Graduação que contribuíram com a minha qualificação profissional. Aos amigos do curso pelo companheirismo durante as atividades acadêmicas. Aos técnicos administrativos e funcionários da UFPR.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, durante essa caminhada, meu agradecimento.

Muito obrigada!

## RESUMO

O melhoramento genético da cana-de-açúcar é um processo longo que pode levar de 10 a 15 anos para o lançamento de uma nova variedade. A primeira etapa e de maior importância é a escolha dos genitores e cruzamentos. A caracterização do germoplasma disponível (genitores) representa uma estratégia importante para a etapa de seleção de genitores, pois possibilita seleção daqueles que apresentam características mais favoráveis, tendo assim, melhor aproveitamento do germoplasma. O trabalho teve como objetivo a caracterização dos principais genitores de cana-de-açúcar do Banco de Germoplasma da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) quanto a reação às ferrugens marrom e alaranjada e presença de marcadores moleculares ligados a resistência. Foram selecionados 63 genitores do Banco de Germoplasma da RIDESA, os que mais contribuíram com o desenvolvimento de clones promissores no período de 1970 a 2000. O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Paranavaí. O plantio foi realizado em março de 2019, sendo alocado em delineamento de blocos completos, com três repetições e utilizando linhas doadoras de inóculo as variedades CTC4 (suscetível a ferrugem marrom) e RB036145 (suscetível a ferrugem alaranjada). A campo foram feitas avaliações mensais de severidade para as ferrugens marrom e alaranjada, no ciclo de cana-planta, com auxílio de escala diagramática. Em laboratório foram feitas extrações de DNA a partir de amostras de folhas de cana-de-açúcar para avaliar a presença dos marcadores moleculares associados a resistência a ferrugem marrom (Bru1) e a ferrugem alaranjada (G1). A tese foi dividida em dois capítulos, o primeiro aborda a reação dos genitores a ferrugem marrom, o segundo trata da reação dos genitores a ferrugem alaranjada. Os resultados mostram que 58,7% dos genitores avaliados foram classificados como resistentes a ferrugem marrom sendo positivos para a presença do marcador Bru1, e em genitores classificados como intermediários foi observado evolução lenta da doença, indicando resistência quantitativa. Dos 63 genitores avaliados para ferrugem alaranjada, 68,25% foram classificados como resistentes, desses apenas 42,86% foram positivos para a presença do marcador G1, sendo observado redução no valor médio de severidade quando o marcador G1 esteve presente em genitores intermediários e suscetíveis. O trabalho fornece informações importantes sobre genitores potenciais para serem explorados em cruzamentos, visando resistência a doenças.

Palavras-chave: melhoramento genético, *Saccharum* spp, *Puccinia melanocephala*, *Puccinia kuehnii*, germoplasma.

## ABSTRACT

The genetic improvement of sugarcane is a long process that can take 10 to 15 years to release a new variety. The first and most important step is the choice of parents and crosses. The characterization of the available germplasm (parents) represents an important strategy for the parent selection stage, as it allows the selection of those with more favorable characteristics, thus having a better use of the germplasm. The aim of this work was to characterize the main sugarcane parents from the Interuniversity Network for the Development of the Sugar-Energy Sector (RIDESA) Germplasm Bank regarding the reaction to brown and orange rusts and the presence of molecular markers linked to resistance. Sixty-three parents were selected from the Germplasm Bank of the RIDESA, those who contributed most to the development of promising clones in the period from 1970 to 2000. The experiment was carried out in the Experimental Station of Paranavaí from March 2019 to August 2021, being allocated in a complete block design, with three replications and using inoculum donor lines of the CTC4 (susceptible to brown rust) and RB (susceptible to orange rust) inoculum varieties. In the field, monthly severity assessments were carried out for brown and orange rust in the cane-plant cycle and biometric evaluations at the end of the cane-plant and ratoon cane cycles. In the laboratory, DNA extractions were performed from sugarcane leaves to assess the presence of marks linked to resistance to brown (Bru1) and orange rust (G1). The thesis was divided into two chapters, the first one deals with the parents' reaction to brown rust and the second about the parents' reaction to orange rust. The results show that 58.7% of the evaluated parents were classified as resistant to brown rust, being positive for Bru1 and in parents classified as intermediate, a slow disease evolution was observed, indicating quantitative resistance. Of the 63 parents evaluated for orange rust, 68.25% were classified as resistant, of these only 42.86% were positive for G1, with a reduction in the mean value of severity when the G1 marker was present in intermediate and susceptible parents. The work provides important information about potential parents to be explored in crosses.

Keywords: genetic improvement, *Saccharum* spp, *Puccinia melanocephala*, *Puccinia kuehnii*, germplasm.



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 – DADOS MENSAIS PARA UMIDADE DO AR, TEMPERATURA MÉDIA, TEMPERATURA MÁXIMA, TEMPERATURA MÍNIMA E PRECIPITAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2019 A ABRIL DE 2020 NO CICLO DA CANA-PLANTA, NO MUNICÍPIO DE PARANAÍ.....20
- FIGURA 1.2 – CURVAS DE PROGRESSO DA FERRUGEM MARROM (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA PELOS SINTOMAS) DURANTE O PRIMEIRO CICLO DA CULTURA EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA, PARA GENITORES INTERMEDIÁRIOS (A E B) E SUSCETÍVEIS (C E D).....24
- FIGURA 1.3 – EVOLUÇÃO DA SEVERIDADE DA FERRUGEM MARROM (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA POR SINTOMAS) EM GENITORES INTERMEDIÁRIOS E SUSCETÍVEIS NO PRIMEIRO CICLO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....25
- FIGURA 1.4 – PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (BRU1) EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, UTILIZANDO OS PARES DE PRIMERS: a-R12H16, b-9020F4-RSAI, EM GEL DE AGAROSE 1,5%. LADDER 100PB (M), BRANCO (B), RB867515 (1), RB835486 (2), RB751194 (3), RB745464 (4), SP79-1011 (5), SP80-1842 (6), RB845210 (7), CO740 (8), SP80-3280 (9).....26
- FIGURA 2.1 – DADOS MENSAIS PARA UMIDADE DO AR, TEMPERATURA MÉDIA, TEMPERATURA MÁXIMA, TEMPERATURA MÍNIMA E PRECIPITAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2019 A MAIO DE 2020, NO CICLO DA CANA-PLANTA, NO MUNICÍPIO DE PARANAÍ.....37
- FIGURA 2.2 – CURVAS DE PROGRESSO DA DOENÇA PARA A FERRUGEM ALARANJADA (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA POR SINTOMAS) NOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA. OS GENITORES CLASSIFICADOS COMO

INTERMEDIÁRIOS FIGURAS (C e D) E SUSCETÍVEIS (A E B).....	40
FIGURA 2.3 – PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DO MARCADOR MOLECULAR G1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA. LADDER 100PB (M), RB91539 POSITIVO (1), RB83102 NEGATIVO (2), RB835019 POSITIVO (3), RB855536 POSITIVO (4), CTC 4 NEGATIVO (5), RB855511 POSITIVO (6), RB845210 CONTROLE NEGATIVO (7), RB855156 CONTROLE POSITIVO (8), RB72454 CONTROLE POSITIVO (9), BRANCO (B).....	41
FIGURA 2.4 – BOXPLOTS PARA SEVERIDADE (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR DE CANA-DE-AÇÚCAR COM SINTOMAS DE FERRUGEM ALARANJADA) DOS GRUPOS DE GENITORES INTERMEDIÁRIOS E SUSCETÍVEIS, POSITIVOS (+) E NEGATIVOS (-) PARA O MARCADOR MOLECULAR G1. O PONTO PRETO INDICA A SEVERIDADE MÉDIA GERAL DE CADA GRUPO E A LINHA DENTRO DOS BOXPLOTS INDICA A MEDIANA.....	43

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – CLASSIFICAÇÃO DA REAÇÃO A FERRUGEM MARROM NO CAMPO EM RESISTENTE (R), INTERMEDIÁRIO (I) E SUSCETÍVEL (S) E PRESENÇA (+) OU AUSÊNCIA (-) DOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 (M1) E 9020-F4-RSAI (M2), NOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADOS PELA RIDESA EM CRUZAMENTOS NAS DÉCADAS DE 1970 (70), 1980 (80), 1990 (90) E 2000 (00).....	22
TABELA 2.1 – REAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA À FERRUGEM ALARANJADA E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO MARCADOR MOLECULAR G1, NAS DÉCADAS DE 1970 (70), 1980 (80), 1990 (90) E 2000 (00).....	41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2 CAPÍTULO I: REAÇÃO À FERRUGEM MARROM E PRESENÇA DO GENE BRU1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA</b> ....	16
Resumo .....	16
Abstract .....	17
2.1 Introdução.....	18
2.2 Material e métodos .....	19
2.3 Resultados.....	22
2.4 Discussão .....	26
2.5 Conclusões.....	30
2.6 Referências .....	30
<b>3 CAPÍTULO II: REAÇÃO À FERRUGEM ALARANJADA E PRESENÇA DO MARCADOR MOLECULAR G1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA</b> .....	33
Resumo .....	33
Abstract .....	34
3.1 Introdução.....	35
3.2 Material e Métodos .....	36
3.3 Resultados.....	39
3.4 Discussão .....	43
3.5 Conclusões.....	47
3.6 Referências .....	48
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	51
<b>5 REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância no âmbito nacional devido a suas diferentes utilizações, seja para alimentação, produção de açúcar, etanol e geração de energia. Os programas de melhoramento genético possuem papel fundamental no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, buscando obter variedades que sejam mais favoráveis às diferentes condições de cultivo, maximizando a presença de características desejáveis, dando maior importância para variedades mais produtivas e resistentes a doenças (MORAIS et al., 2015), com objetivo de atender as demandas do mercado.

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) é uma organização envolvida no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, sendo composta por dez Universidades Federais, entre as quais a Universidade Federal do Paraná faz parte. A RIDESA consta com dois Bancos de Germoplasma: o da Estação de Floração e Cruzamento Serra do Ouro, localizado em Murici, Alagoas e o da Estação de Floração e Cruzamento de Devaneio, em Amaraji, Pernambuco. As sementes são geradas nessas estações de cruzamento e distribuídas para as Universidades para que possam ser conduzidas as etapas de seleção clonal.

Na cana-de-açúcar, a escolha dos genitores e o planejamento dos cruzamentos marcam o início de um longo processo de seleção que pode se estender de 10 a 15 anos (GAZAFFI et al., 2016). Portanto, para o sucesso das etapas de seleção, os genitores envolvidos nas hibridações devem apresentar características favoráveis, como alto teor de sacarose, elevada produtividade de colmos por hectare, resistência a doenças, tolerância a fatores abióticos, possibilitando assim, a obtenção de genótipos com caracteres favoráveis.

A resistência a doenças tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar, sendo a ferrugem marrom e a ferrugem alaranjada duas doenças de importância para a cultura, com potencial para causar danos econômicos quando presente nos canaviais, uma vez que a capacidade fotossintética das folhas fica reduzida, diminuindo assim a produtividade.

A ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* (Syd. & P. Syd), foi identificada pela primeira vez em 1978 na República Dominicana, e o primeiro relato no Brasil ocorreu em 1986, em Capivari/SP (AMORIM et al., 1987). A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* foi relatada pela primeira vez em 1890, na ilha de Java, por Krüger (RYAN e EGAN, 1989). Na Austrália, em 2000, a ferrugem alaranjada acarretou uma queda na produção de 24%, causando prejuízos de 210 milhões de dólares (MAGAREY et al., 2001). No Brasil o primeiro relato da ferrugem alaranjada ocorreu em Araraquara/SP em dezembro de 2009, e a doença se espalhou rapidamente em todo o país (BARBASSO et al., 2010).

De maneira geral os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar avaliam os clones para ferrugens a partir de infecção natural e com o auxílio de escala diagramática. O uso de marcadores moleculares ligados a genes de resistência representa uma importante ferramenta para utilização no processo de desenvolvimento de variedades resistentes, pois possibilita a seleção precoce de indivíduos, considerando apenas o genótipo, eliminando o efeito do ambiente.

Para a ferrugem marrom já se tem conhecimento do gene Bru1, que confere resistência à doença, e marcadores moleculares ligados a esse gene disponíveis para utilização (TAI et al., 1981; COSTET et al., 2012). Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar na China, Estados Unidos utilizaram os marcadores R12H16 e 9020F4 para avaliar a frequência de Bru1 no germoplasma, facilitando assim, a escolha das combinações de cruzamentos (GLYNN et al., 2013; LI et al., 2016). Para a ferrugem alaranjada também foi desenvolvido um marcador molecular, denominado G1, cuja eficiência foi de 71% no material que foi inicialmente testado (YANG et al., 2018). O mesmo marcador foi utilizado em trabalhos realizado com variedades brasileiras, onde foi possível observar diferenças quanto a eficiência do marcador na detecção de genótipos resistentes (FIER et al., 2020; HOEPERS et al., 2020).

O conhecimento da reação dos genitores às doenças a partir da caracterização, com a inclusão de informações moleculares, representa um papel importante na classificação e organização dos acessos de germoplasma em um programa de melhoramento, facilitando a escolha dos genitores na etapa de hibridação, tornando o processo mais eficiente, além do melhor

aproveitamento do material genético disponível, pois possibilitaria focar em cruzamentos específicos, aumentar o número de sementes por cruzamento e, conseqüentemente, a seleção de um maior número de clones promissores para caracteres de interesse.

Levando em consideração que muitos genitores do banco de germoplasma da RIDESA não possuem informações de reação a doenças, esse trabalho teve como objetivo a caracterização dos principais genitores de cana-de-açúcar do Banco de Germoplasma da RIDESA quanto a reação às ferrugens marrom e alaranjada e presença de marcadores moleculares ligados a resistência a fim de explorar essas informações na elaboração de estratégias de hibridações que maximizem a obtenção de progênies resistentes.

## 2 CAPÍTULO I: REAÇÃO À FERRUGEM MARROM E PRESENÇA DO GENE BRU1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA

Capítulo publicado na revista Sugar Tech com o título: “Reaction to Brown Rust and Presence of the Bru1 Gene in Brazil/RIDESA Sugarcane Parents”

### Resumo

A ferrugem marrom é uma importante doença que pode afetar a produção de cana-de-açúcar em variedades suscetíveis e tem influenciado os programas de melhoramento no processo de seleção clonal sendo que o Bru1 é um dos principais genes de resistência a essa doença. Portanto, o conhecimento da reação à ferrugem marrom nos genitores mais utilizados como parentais nas hibridações evitaria cruzamentos entre genótipos suscetíveis. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar a reação à ferrugem marrom no campo, o padrão de evolução da doença e a presença do gene Bru1 em genitores de cana-de-açúcar do programa de melhoramento genético da RIDESA. O experimento foi conduzido na estação experimental de Paranavaí onde 63 genitores foram plantados março de 2019 no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Foi avaliada a severidade da ferrugem marrom no campo em condições naturais de infecção e a presença do gene Bru1. Dos 63 genitores avaliados, 38 foram classificados como resistentes, 13 como intermediários e 12 como suscetíveis. Menores valores de severidade para ferrugem marrom foram observados em genitores intermediários com evolução lenta da doença em relação aos genitores suscetíveis, indicando resistência quantitativa. O Bru1 foi detectado em 58,7% dos genitores avaliados. A frequência relativa de Bru1 aumentou de 0% nos genitores usados na década de 1970 para 20%, 64,7% e 74,2% em 1980, 1990 e 2000, respectivamente.

Palavras-chave: *Saccharum* spp, *Puccinia melanocephala*, resistência a doenças, melhoramento de plantas



## Abstract

Brown rust is an important disease that can affect the production of sugarcane in susceptible varieties. Reaction to brown rust has influenced the improvement programs in the process of clonal selection. Bru1 is one of the main resistance genes for brown rust. Therefore, the knowledge of the reaction to brown rust in the genotypes most used as parents in hybridizations would avoid crosses between susceptible genotypes. In this sense, the objectives of this work were to evaluate the reaction to brown rust in the field and the pattern of disease evolution; and the presence of the Bru1 gene in sugarcane parents of the RIDESA genetic improvement program. The experiment was carried out at the Paranaíba experimental station, where 63 genotypes were planted in a randomized block design with three replications. The severity of brown rust in the field under natural infection conditions and the presence of the Bru1 gene were evaluated. Of the 63 genotypes evaluated, 38 were classified as resistant, 13 as intermediate and 12 as susceptible. Lower values of severity of brown rust were observed in intermediate genotypes with a slow evolution of the disease when compared with susceptible parents, indicating a quantitative resistance. Bru1 was detected in 58.7% of the evaluated genotypes. The frequency of Bru1 increased from 0% in the genotypes used as parents in the 1970s to 20%, 64,7% and 74,2% in the 1980, 1990 and 2000s, respectively.

Keywords: *Saccharum* spp., *Puccinia melanocephala*, resistance to disease, plant breeding

## 2.1 Introdução

Os canaviais enfrentam diversos desafios fitossanitários e as doenças aparecem como um dos principais fatores que podem limitar o desenvolvimento da cultura, causando sérios prejuízos. Dentre as doenças que afetam a cana-de-açúcar, a ferrugem marrom causada pelo patógeno *Puccinia melanocephala* (Syd. & P. Syd) está entre as principais, causando redução na produtividade (HOY e HOLLIER 2009; COSTET et al., 2012; LI et al., 2016).

Embora a ferrugem marrom possa ser controlada com o uso de fungicidas (HOY e HOLLIER, 2009), o controle é mais eficaz com o uso de variedades resistentes, além de ser benéfico ao meio ambiente. A maioria dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar tem usado a resistência à ferrugem marrom (determinada pela ausência de sintomas visíveis) como um dos principais critérios de melhoramento e seleção (GLYNN et al., 2013).

A resistência à ferrugem marrom é uma característica de alta herdabilidade na cana-de-açúcar (HOGARTH et al., 1993). Portanto, uma frequência maior de clones com o gene de resistência seria esperada em cruzamentos envolvendo genitores resistentes.

O Bru1, relatado como um dos principais genes de resistência à ferrugem marrom, demonstrou ser a causa da resistência a vários isolados de *Puccinia melanocephala* em diferentes países, e os marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4 mostraram-se altamente eficientes na previsão da presença da resistência à ferrugem marrom (TAI et al., 1981; HOGARTH et al., 1993; DAUGROIS et al., 1996; ASNAGHI et al., 2004; COSTET et al., 2012).

Programas de melhoramento de cana-de-açúcar na China, Estados Unidos da América e Argentina usaram esses marcadores para avaliar a frequência de Bru1 em germoplasma de cana-de-açúcar (ASNAGHI et al., 2004; GLYNN et al., 2013; RACEDO et al., 2013; PARCO et al., 2014; LI et al., 2016). No Brasil, esses marcadores também foram usados para identificar a presença ou ausência do gene Bru1 nas principais variedades cultivadas (BARRETO et al., 2017).

A caracterização de genitores quanto à reação à ferrugem marrom e a presença de Bru1 torna-se requisito fundamental para futuros avanços no melhoramento genético da cana-de-açúcar, no que diz respeito à resistência a

doenças. Esta caracterização auxiliará na escolha de genitores para hibridação com resistência e contribuirá para reduzir o número de genótipos eliminados na fase de seleção dos programas de melhoramento da cana-de-açúcar devido à suscetibilidade à ferrugem marrom.

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) é um consórcio de dez Universidades Federais do Brasil que tem como foco o melhoramento de variedades de cana-de-açúcar (variedades RB). No entanto, há poucas informações sobre a reação à ferrugem marrom e a presença de Bru1 na maioria dos genitores do banco de germoplasma da RIDESA (Serra do Ouro e Devaneio).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a reação à ferrugem marrom no campo e o padrão de evolução da doença; a presença do gene Bru1 nos principais genitores da cana-de-açúcar da RIDESA.

## **2.2 Material e Métodos**

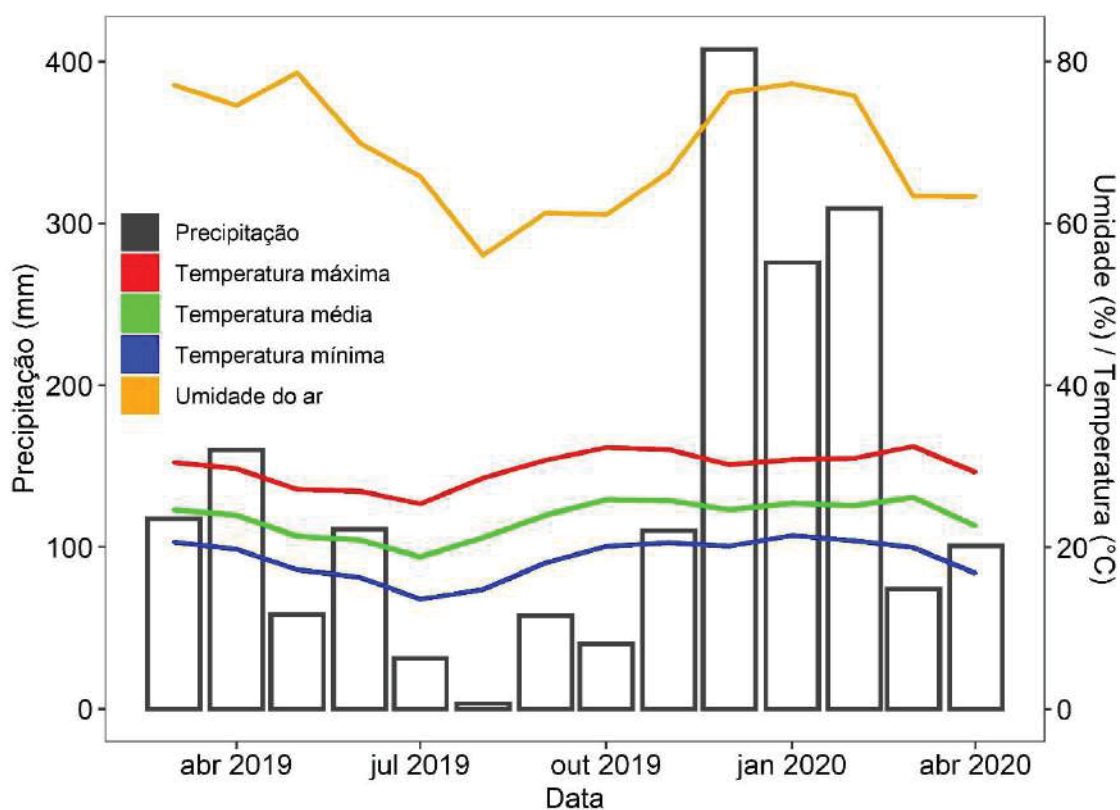
### **Avaliação de campo para resistência à ferrugem marrom**

Para avaliar a reação à ferrugem marrom em condições naturais de infecção, 63 genitores foram selecionados no Banco de Germoplasma da Serra do Ouro, localizado no município de Murici, estado de Alagoas (latitude 09° 13' S, longitude 35° 50' W e altitude 515 m). Esse Banco de Germoplasma atende ao programa de melhoramento RIDESA e, por sua localização e clima privilegiados, permite a floração natural da cana-de-açúcar necessária para realizar as hibridações previamente planejadas pelos pesquisadores da rede. Os genitores selecionados para estudo representam os parentais com maior participação nas hibridizações pela RIDESA nas décadas de 1970, 1980, 1990 e 2000.

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Paranaíba, pertencente à Universidade Federal do Paraná, com latitude 22°58' S, longitude 52°28' W e altitude de 503 m. O clima da região é classificado como Cfa de acordo com Köppen, com precipitação anual de 1200 a 1400 mm e temperatura média anual entre 22 e 23,8 °C (APARECIDO et al., 2016) e solo latossolo vermelho distrófico (SANTOS et al., 2013). Os dados diários de temperatura (°C)

e umidade relativa (%) (Figura 1.1) foram obtidos por meio de uma estação meteorológica automática, modelo DavisVantage PRO2, instalada no local do experimento.

FIGURA 1.1 – DADOS MENSAIS PARA UMIDADE DO AR, TEMPERATURA MÉDIA, TEMPERATURA MÁXIMA, TEMPERATURA MÍNIMA E PRECIPITAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2019 A ABRIL DE 2020 NO CICLO DA CANA-PLANTA, NO MUNICÍPIO DE PARANAÍ.



O plantio foi realizado em março de 2019, em delineamento de blocos casualizados com três repetições, sendo cada parcela constituída de dois sulcos de três metros espaçados a 1,4 m e plantio de 15 gemas por metro. A variedade CTC4, suscetível à ferrugem marrom, foi utilizada como linha infectora, sendo plantada a cada duas parcelas para aumentar a pressão do inóculo na área.

As avaliações para severidade da ferrugem marrom foram realizadas mensalmente no primeiro ciclo da cana, a partir de 120 dias após o plantio, com auxílio de escala diagramática desenvolvida por Amorim et al. (1987), totalizando dez avaliações. Em cada avaliação de severidade 10 folhas +3 de cada repetição foram escolhidas aleatoriamente, e as notas foram atribuídas à posição com a maior severidade da doença.

Os dados de severidade da doença foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada genitor, de acordo com Campbell e Madden (1990), e posteriormente a área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD<sub>r</sub>), conforme proposto por Fry (1978). Com os dados de severidade ao longo do tempo, foram obtidas curvas de progresso da doença. Os genitores foram classificados em resistente (AACPD<sub>r</sub> = 0), intermediário (0 > AACPD<sub>r</sub> < 12,29) e suscetível (AACPD<sub>r</sub> ≥ 12,29). Para a classificação foi utilizado o valor de AACPD<sub>r</sub> obtido no presente trabalho para a variedade CTC4, considerada suscetível à ferrugem marrom.

#### Detecção do gene Bru1 usando marcadores moleculares

Para detectar a presença de Bru1, o DNA foi extraído de amostras de tecido vegetal dos genitores avaliados. As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido, utilizando aproximadamente 0,3 g de tecido vegetal. A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo CTAB (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). Após as extrações, o DNA foi ressuspensão em 50 µL de água ultrapura e quantificado por espectrofotometria com o equipamento NanoDrop.

Os seguintes marcadores moleculares foram usados: R12H16 foi usado para amplificar um fragmento de 570 pb com os primers 5'-CTACGATGAACTACACCCTTGTC-3' (Forward) e 5'-CTTATGTTAGCGTGACCTATGGTC-3' (Reverso). O 9O20-F4 foi usado para realizar a amplificação com o par de primer 5'-TACATAATTTTAGTGGCACTCAGC-3' (Forward) e 5'-ACCATAATTCAATTCTGCAGGTAC-3' (Reverso) e, em seguida, os produtos de PCR com o par de primer 9O20- F4 foram digeridos com a enzima de restrição Rsa I para um fragmento específico de 200 pb (COSTET et al. 2012).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo: 4 µL de PCR MasterMix (Solis BioDyne) que já contém Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub> e oligonucleotídeos (dNTP's) em concentrações ótimas de uso, 10 Mm de primer forward e 10 Mm de primer reverso, 20 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume. O programa de

amplificação dos pares de primers foi realizado em termociclador conforme descrito por Costet et al. (2012).

O produto da PCR, utilizando o par de primers 9020-F4, foi submetido à digestão, utilizando 15 µL do mesmo, 5 U / µL da enzima RsaI, Buffer 1x e água ultrapura para completar o volume, de 20 µL. Os produtos foram incubados em um termociclador a 37°C por 2 h para produzir um fragmento específico de 200 pb.

Os produtos de amplificação utilizando os dois pares de primers R12H16 e 9020-F4 foram submetidos separadamente à eletroforese em gel de agarose 1,5%, a escala de 100 pb foi utilizada como marcador de peso molecular e visualizada em transluminador UV. A variedade RB867515 foi utilizada nas reações de amplificação como padrão positivo, por possuir o gene Bru1, conforme descrito na literatura (BARRETO et al., 2017). A variedade RB835486 foi usada como controle negativo.

### 2.3 Resultados

Diferenças na severidade da doença e sua evolução ao longo do tempo foram observadas nos genitores avaliados, os quais foram classificados em 3 grupos de resistência à ferrugem marrom. Dos 63 genitores avaliados, 38 foram classificados como resistentes, 13 intermediários e 12 suscetíveis (Tabela 1.1 e Figura 1.2).

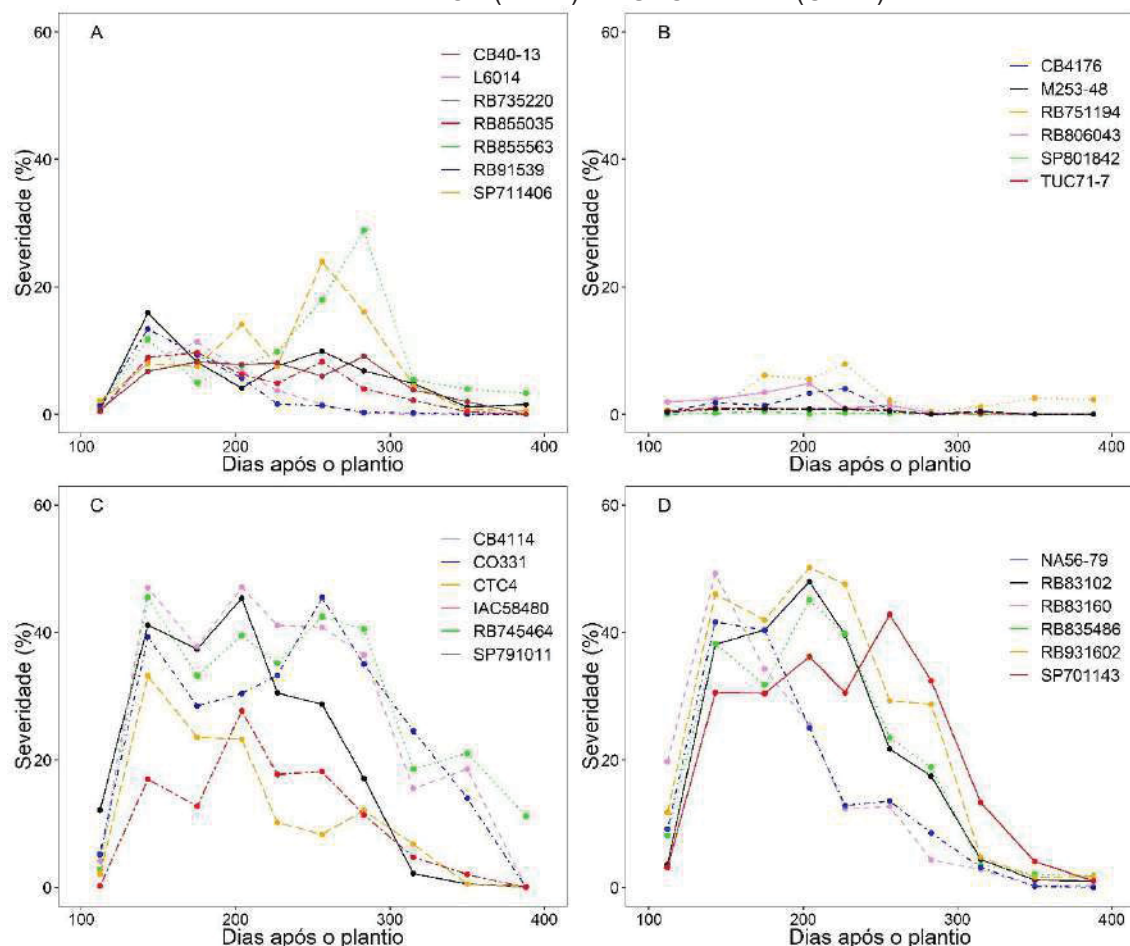
TABELA 1.1 - CLASSIFICAÇÃO DA REAÇÃO A FERRUGEM MARROM NO CAMPO EM RESISTENTE (R), INTERMEDIÁRIO (I) E SUSCETÍVEL (S) E PRESENÇA (+) OU AUSÊNCIA (-) DOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 (M1) E 9020-F4-RSAI (M2), NOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADOS PELA RIDESA EM CRUZAMENTOS NAS DÉCADAS DE 1970 (70), 1980 (80), 1990 (90) E 2000 (00).

Genitor	Genealogia		Décadas				M1	M2	AACPD <sub>r</sub>	Classificação
	♀	♂	70	80	90	00				
<b>M253-48</b>	B34104	M21340	x				-	-	0,53	I
<b>CO331</b>	CO213	CO214	x				-	-	25,97	S
<b>CB41-14</b>	?	?	x				-	-	29,16	S
<b>CB41-76</b>	POJ2878	?	x				-	-	1,24	I
<b>CO740</b>	P3247	P4775		x			+	+	0	R
<b>L60-14</b>	CP521	CP48103		x			-	-	3,3	I
<b>RB735220</b>	CB4495	?		x			-	-	6,28	I
<b>NA56-79</b>	CO419	CO419		x			-	-	15,49	S
<b>SP70-1143</b>	IAC4865	?		x			-	-	22,62	S
<b>SP71-1406</b>	NA56-79	?		x			-	-	8,47	I
<b>TUC71-7</b>	CP5268	CP62258		x	x		-	-	0,49	I
<b>IAC58-480</b>	POJ2878	CP44101		x			-	-	11,18	S

<b>CB40-13</b>	?	?	x			-	-	5,37	I
<b>RB72454</b>	CP5376	?	x	x	x	+	+	0	R
<b>RB735200</b>	CO331	?		x		+	+	0	R
<b>RB765418</b>	M25348	?		x		+	+	0	R
<b>RB835019</b>	RB72454	NA56-79		x		+	+	0	R
<b>RB835054</b>	RB72454	NA56-79		x		+	+	0	R
<b>RB835089</b>	RB72454	NA56-79		x		+	+	0	R
<b>RB835486</b>	L6014	?		x		-	-	20,88	S
<b>RB855453</b>	TUC71-7	?		x		+	+	0	R
<b>RB855563</b>	TUC71-7	SP70-1143		x		-	-	9,65	I
<b>SP79-1011</b>	NA56-79	CO775		x		-	-	21,05	S
<b>RB751194</b>	CB4049	?		x		-	-	2,88	I
<b>RB75126</b>	C278	?		x		+	+	0	R
<b>RB806043</b>	NA56-79	?		x		-	-	1,44	I
<b>RB855206</b>	RB72454	TUC71-7		x		+	+	0	R
<b>RB785148</b>	IAC47-31	?		x		+	+	0	R
<b>RB855002</b>	SP70-1143	RB72454		x		+	+	0	R
<b>BJ7504</b>	?	?			x	+	+	0	R
<b>CO62175</b>	CO951	CO419			x	+	+	0	R
<b>CTC4</b>	SP83-5073	?			x	-	-	12,29	S
<b>F150</b>	CO310	PT4352			x	+	+	0	R
<b>IAC862210</b>	CP5258	CO798			x	+	+	0	R
<b>RB72910</b>	?	?			x	-	-	0	R
<b>RB745464</b>	CP5376	?			x	-	-	29,59	S
<b>RB83102</b>	NA56-79	SP70-1143			x	-	-	21,39	S
<b>RB83160</b>	NA56-79	SP70-1143			x	-	-	15,72	S
<b>RB845210</b>	RB72454	SP70-1143			x	+	+	0	R
<b>RB855035</b>	L6014	SP70-1284			x	-	-	4,62	I
<b>RB855113</b>	SP70-1143	RB72454			x	+	+	0	R
<b>RB855536</b>	SP70-1143	RB72454			x	+	+	0	R
<b>RB867515*</b>	RB72454	?			x	+	+	0	R
<b>RB91539</b>	H59-9018	?			x	-	-	3,43	I
<b>RB928064</b>	SP70-1143	?			x	+	+	0	R
<b>RB931011</b>	RB83160	RB72454			x	+	+	0	R
<b>RB931530</b>	Q107	?			x	+	+	0	R
<b>RB931566</b>	RB721012	RB835089			x	+	+	0	R
<b>RB931602</b>	Q113	RB72454			x	-	-	25,87	S
<b>SP80-1816</b>	SP71-1088	H57-5028			x	+	+	0	R
<b>SP80-1842</b>	SP71-1088	H57-5028			x	-	-	0,11	I
<b>SP80-3280</b>	SP71-1088	H57-5028			x	+	+	0	R
<b>RB855156</b>	RB72454	TUC71-7			x	+	+	0	R
<b>RB93509</b>	RB72454	?			x	+	+	0	R
<b>SP83-2847</b>	HJ5741	SP70-1143			x	+	+	0	R
<b>RB9367</b>	RB72454	RB83102			x	+	+	0	R
<b>SP79-2233*</b>	H562954	?			x	+	+	0	R
<b>SP81-3250</b>	CP701547	SP71-1279			x	+	+	0	R
<b>SP85-3877</b>	H65606	?			x	+	+	0	R
<b>RB83594</b>	RB72454	B3337			x	+	+	0	R
<b>RB855511</b>	SP71-1406	?			x	+	+	0	R
<b>RB92606</b>	Q107	RB72454			x	+	+	0	R
<b>RB931013</b>	RB72454	RB83100			x	+	+	0	R

Área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD<sub>r</sub>).

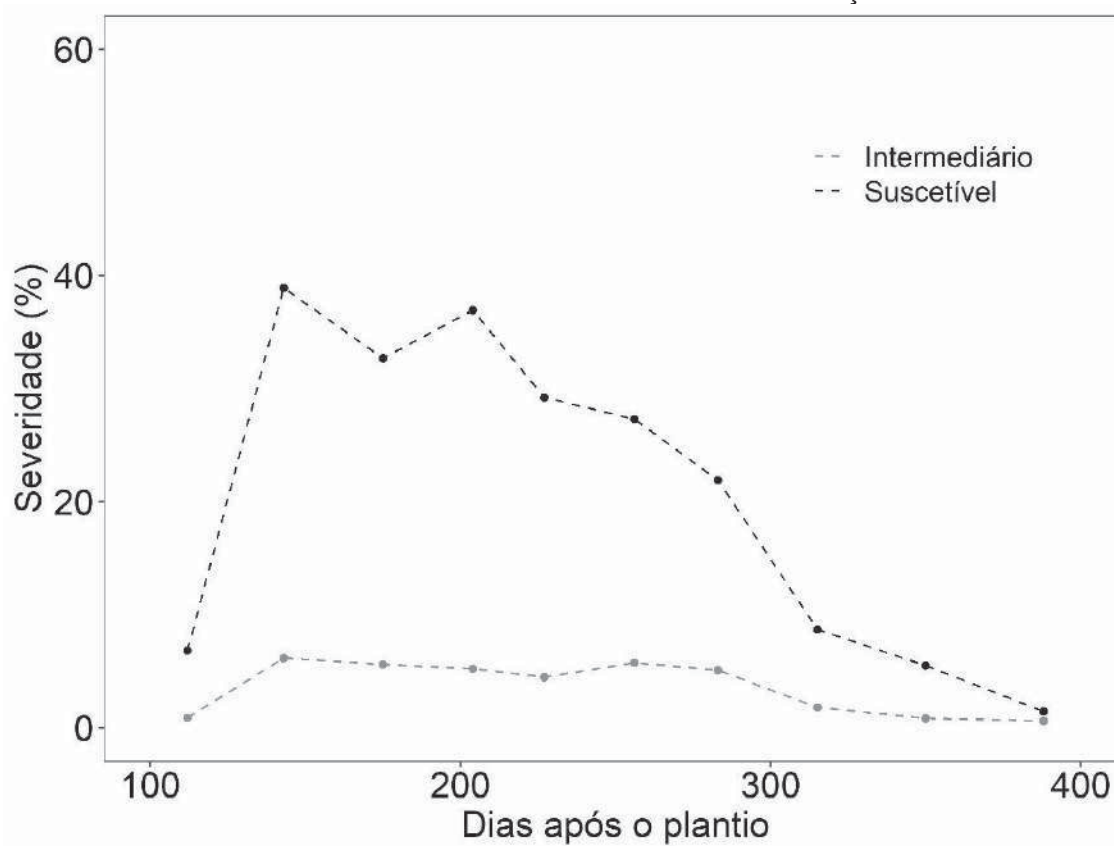
FIGURA 1.2 - CURVAS DE PROGRESSO DA FERRUGEM MARROM (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA PELOS SINTOMAS) DURANTE O PRIMEIRO CICLO DA CULTURA EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA, PARA GENITORES INTERMEDIÁRIOS (A E B) E SUSCETÍVEIS (C E D).



A evolução da doença nos genitores intermediários ocorreu de forma lenta, e baixos valores de severidade foram observados ao longo do tempo, o valor médio máximo para esses genitores foi de 7,81% da área foliar afetada pelos sintomas, observado aos 5 meses. Em vez disso, a evolução da doença nos genitores suscetíveis foi rápida e o valor médio da severidade máxima foi de 38,90%, também aos 5 meses (Figura 1.3).

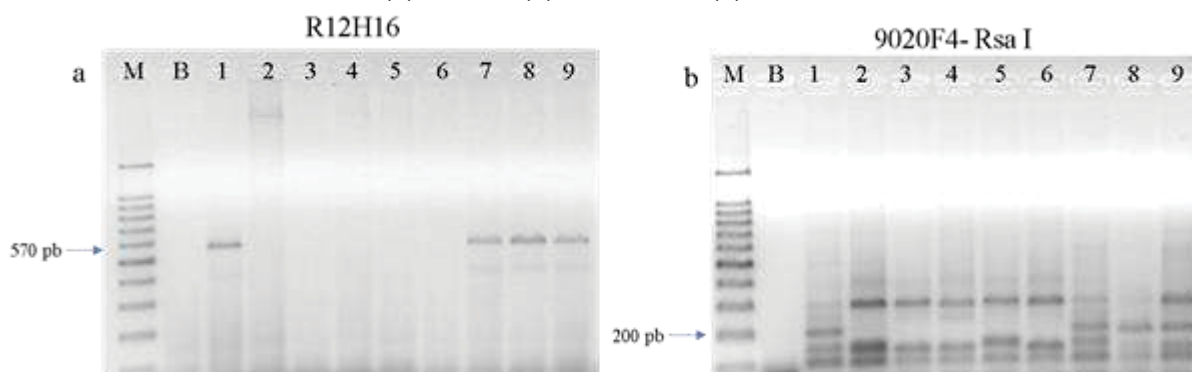


FIGURA 1.3 - EVOLUÇÃO DA SEVERIDADE DA FERRUGEM MARROM (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA POR SINTOMAS) EM GENITORES INTERMEDIÁRIOS E SUSCETÍVEIS NO PRIMEIRO CICLO DA CANA-DE-AÇÚCAR.



O gene *Bru1* foi identificado em 37 dos 63 genitores avaliados, o que corresponde a 58,7% (Tabela 1.1 e Figura 1.4). Os genitores resistentes não apresentaram sintomas da doença no campo, sendo positivos para os dois pares de primers, apenas o RB72910 (resistente) que não apresentou marcas ligadas ao gene *Bru1*. Todos os genitores classificados como intermediários (I) e suscetíveis (S) à ferrugem marrom foram negativo para ambos os pares de primers.

FIGURA 1.4 - PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM (BRU1) EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, UTILIZANDO OS PARES DE PRIMERS: a-R12H16, b-9020F4-RSAI, EM GEL DE AGAROSE 1,5%. LADDER 100PB (M), BRANCO (B), RB867515 (1), RB835486 (2), RB751194 (3), RB745464 (4), SP79-1011 (5), SP80-1842 (6), RB845210 (7), CO740 (8), SP80-3280 (9).



Um aumento na frequência de genitores positivos para o gene Bru1 foi observado durante os anos 1970 à 2000. A menor frequência de Bru1 foi observada nos genitores em 1970 (0%) seguido das décadas de 1980, 1990 e 2000, (20%), (64,7%) e (74,2%), respectivamente. Para a reação à doença em campo, na década de 70, 25% eram intermediários e 75% suscetíveis, na década de 1980, 20% eram resistentes, 50% intermediários e 30% suscetíveis, na década de 90, 65% resistentes, 23% intermediários e 12% suscetíveis e na década de 2000, 77% resistentes, 9% intermediários e 14% suscetíveis. Dois genitores são repetidos em duas ou mais décadas, TUC71-7 nas décadas de 1980 e 1990 e RB72454 nas décadas de 1980, 1990 e 2000.

## 2.4 Discussão

O percentual de genitores positivos para Bru1 (58,7%), nos principais genitores da RIDESA, indica que esta é uma das principais fontes de resistência à ferrugem marrom, mas ainda é um percentual baixo se comparado aos estudos de Costet et al. (2012) que identificaram que 86% dos 194 genótipos testados foram positivos para os pares de primers R12H16 e 9020-F4-Rsal e apenas 14% foram negativos para Bru1.

O genitor RB72910 não apresentou sintomas da doença no campo embora não possua o gene Bru1, sugerindo que possivelmente possui um gene de resistência qualitativo alternativo. Este genitor pode ser utilizado em cruzamentos futuros como forma de melhorar a diversidade de genes de

resistência à ferrugem marrom e em estudos para desenvolver novos marcadores moleculares ligados a esse gene de resistência qualitativo alternativo.

Alguns estudos já demonstraram a possibilidade da resistência à ferrugem marrom estar relacionada a outros genes, como no estudo de Raboin et al. (2006), onde os autores verificaram a presença de um segundo gene de resistência na cana-de-açúcar denominado Bru2. Em um estudo mais recente sobre herança de resistência à ferrugem marrom realizado por Zhang et al. (2019) usando germoplasma selvagem *Erianthus rockii* 'Yundian 95-19' e *Erianthus rockii* 'Yundian 95-20', espécies que apresentam resistência à ferrugem marrom, observaram alta frequência de resistência em populações autofecundadas e identificaram a ausência de marcas ligadas ao Bru1. Os resultados do trabalho de Zhang et al. (2019) também indicam um gene de resistência à ferrugem marrom diferente nessas espécies.

Na década de 1970, apenas 4 genitores foram avaliados e, embora não tenham sido observados indivíduos resistentes, esse fato pode ter ocorrido devido ao efeito da baixa amostragem. Porém, nas décadas seguintes, e com maior número de genitores avaliados, houve diminuição dos clones com resposta intermediária e suscetível, resultando no aumento do número de genitores resistentes à ferrugem marrom (Tabela 1.1). Além disso, em 1970, o Banco de Germoplasma de Cana da Serra do Ouro continha apenas 220 acessos de diferentes origens do mundo, e realizava em torno de 75 cruzamentos (BARBOSA, 2018). Atualmente, possui 3.065 acessos, onde são realizados cerca de 3.000 cruzamentos por ano (CURSI et al., 2021), fato que faz com que o número de genitores principais utilizados na década de 1970 seja menor. O aumento da frequência do gene de resistência (Bru1) nos genitores ao longo das décadas coincide com a chegada da ferrugem marrom ao Brasil, seguindo o primeiro relato em 1986 (AMORIM et al., 1987), portanto, os programas de melhoramento passaram a utilizar os genitores e selecionar clones com ausência de sintomas de doença no campo.

O genitor mais importante em termos de geração de novas variedades foi o RB72454 (resistente à ferrugem marrom e positivo para Bru1) e foi utilizado em cruzamentos durante as décadas de 1980, 1990 e 2000. RB72454 foi progenitor de 17 novos genótipos, 16 dos quais eram resistentes à ferrugem

marrom, mesmo quando o outro pai era suscetível (NA5679 e SP70-1143, por exemplo). Isso mostra que mesmo um genótipo suscetível a ferrugem marrom pode ser usado se cruzado com um genótipo resistente. Ao contrário, o cruzamento de genitores suscetíveis à ferrugem marrom (NA5679 X SP70-1143) gerou genótipos suscetíveis (RB83102 e RB83160) e deve ser evitado.

No presente estudo, observou-se menor severidade para acessos intermediários e maior severidade para acessos suscetíveis, além de diferentes padrões de progressão da doença (Figura 1.3). Os genitores intermediários apresentam um padrão de evolução que indica resistência quantitativa, diferente dos suscetíveis. Em um tipo de resistência quantitativa, graus intermediários de resistência são observados e o progresso da doença tende a ser gradativo diferente do que ocorre na resistência do tipo qualitativa (CAMARGO, 2018). Na resistência qualitativa, o reconhecimento do patógeno ocorre no início da relação patógeno hospedeiro, de forma rápida, não permitindo a infecção, ao contrário do que ocorre no sistema de defesa de uma planta com resistência quantitativa em que o reconhecimento ocorrerá após a infecção (MACIEL e DANELLI 2018).

O controle genético da ferrugem marrom foi relatado como monogênico, ou seja, uma característica do tipo qualitativa (DAUGROIS et al., 1996). No entanto, em estudo realizado por Chu et al. (1979), os autores relataram tendência de herdabilidade do tipo quantitativo para a ferrugem marrom, sugerindo que o caráter de suscetibilidade provavelmente não é determinado por um único gene. No estudo de Ramdoyal et al. (2000) os autores sugerem a possibilidade da existência de outros genes com efeitos menores atuando de forma quantitativa na resistência à ferrugem marrom.

A severidade média máxima para acessos intermediários e suscetíveis no presente estudo foi observada aos 5 meses (Figura 1.4). Segundo Tokeshi e Rago (2016) a suscetibilidade do hospedeiro à ferrugem marrom varia de acordo com o estado de desenvolvimento, sendo maior entre 2 e 6 meses. Ido et al. (2006) relatou que os maiores escores de severidade foram observados aos quatro meses de idade no ciclo da cana-planta para a ferrugem marrom. A ocorrência da ferrugem marrom é mais intensa em temperaturas amenas e em épocas de maior umidade relativa do ar, com maior susceptibilidade da cultura na primeira metade do seu ciclo vegetativo, especificamente entre dois e oito

meses de idade, ou seja, é uma doença que ataca a planta jovem (IDO et al., 2006).

O conhecimento da evolução da doença ao longo do tempo torna-se importante para a caracterização do germoplasma, pois permite a identificação de genótipos com reação intermediária de resistência, e caso ocorresse um ano atípico, uma avaliação ao longo do tempo seria capaz de absorver as variações, de forma diferente se considerarmos apenas um período para avaliar a reação à ferrugem marrom.

Se fosse considerada apenas a presença de Bru1 para a escolha dos genitores a serem utilizados nos cruzamentos, visando resistência à ferrugem marrom, os genitores intermediários não seriam escolhidos, por serem negativos para o gene, estaríamos reduzindo a possibilidade de obtenção de resistência quantitativa, que do ponto de vista do melhoramento genético tende a ser mais durável. Portanto, a identificação de genitores intermediários e sua utilização em cruzamentos aumentaria as chances de obtenção de indivíduos com resistência quantitativa.

Além disso, genitores intermediários podem ser usados como fonte de estudos para identificar QTLs. Muitos programas de melhoramento de arroz já visam incorporar resistência quantitativa ou poligênica em variedades de arroz (ASHKANI et al., 2015). O uso de fontes adicionais de resistência à ferrugem marrom evitaria o efeito 'Boom and Bust' e ajudaria a preservar a durabilidade da resistência conferida pelo gene Bru1 (GLYNN et al., 2013).

A caracterização dos acessos presentes nos bancos de germoplasma se torna fundamental no programa de melhoramento genético, pois contribui para seleção de genitores que participarão de cruzamentos. Uma caracterização mais abrangente envolvendo todos os acessos presentes no Banco de Germoplasma da Serra do Ouro facilitaria a escolha das combinações durante as hibridizações, e contribuiria para a identificação de possíveis fontes alternativas de resistência à ferrugem marrom, evitando possíveis problemas relacionados à dependência de apenas um gene de resistência.

## 2.5 Conclusões

O Bru1 está presente em 58,7% dos principais genitores utilizados pelo programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar RIDESA, sendo mais frequente nos genitores utilizados nas décadas de 1990 (64,7%) e 2000 (74,2%) em relação às décadas de 1980 e 1970.

A severidade da ferrugem marrom nos genitores intermediários foi menor, com evolução lenta da doença, o que indica resistência quantitativa a esta doença.

## 2.6 Referências

- AMORIM, L. et al. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-Açúcar (*Puccinia melanocephala*). Boletim Técnico Copersucar, São Paulo, n.39:13-16, 1987.
- APARECIDO, L.E.O. et al. Climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(4):405-417, 2016.
- ASHKANI, S. et al. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of disease resistance in rice crop. *Frontiers in Plant Science* 6, 2015.
- ASNAGHI, C. et al. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 108 (4):759-764, 2004.
- BARBOSA, G.V.S. Inovações tecnológicas desenvolvidas em Alagoas para o setor canavieiro- Maceió: Fapeal: Imprensa Oficial Graciliano Ramos, 136p, 2018.
- BARRETO, F.Z. et al. Validação de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, 43(1):36-40, 2017.
- CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In *Manual de Fitopatologia*, 5th ed São Paulo: Agronômica Ceres, 1, 85–92, 2018.
- CAMPBELL, C. L. MADEN, L.V. Madden. *Introduction to plant disease epidemiology*, 532 p, 1990.
- CHU, T.L., J.L.; SERAPION, AND J.L. RODRIGUEZ. Varietal reaction and inheritance trends of susceptibility of sugarcane to rust (*Puccinia*

*melanocephala* h. & p. Svd). Journal of Agriculture of University of Puerto Rico 66: 99–108, 1979.

COSTET, L. et al. Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. Theoretical and Applied Genetics, New York, 125:825-836, 2012.

CURSI, D.E. et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular genetics in Brazil. Sugar Tech, 2021.

DAUGROIS, J.H. et al. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. Theoretical and Applied Genetics, New York, 92:1059-1064, 1996.

FERREIRA, M.E.; D. GRATTAPAGLIA. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.

FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide affects for integrated control of potato late blight. Phytopathology, 68:1650-1655, 1978.

GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; MC CORKLE, K. Screening for resistance to brown rust of sugarcane: Use of Bru1 resistance gene prospects and challenges. Journal American Society of Sugar Cane Technologists, Belle Glade, 32:82, 2013.

HOGARTH, D.M.; RYAN, C.C.; TAYLOR, P.W.J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugarcane. Field Crops Research, 34:187-193, 1993.

HOY, J.W.; HOLLIER, C.A. Effect of brown rust on sugarcane yield in Louisiana. Plant Disease, 11:1171-1174, 2009.

IDO, O.T. et al. Incidência e severidade da ferrugem em clones de cana-de-açúcar no Estado do Paraná. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, 36(3):159-163, 2006.

LI, W.F. et al. Molecular detection of Bru1 gene and identification of brown rust resistance in Chinese sugarcane germplasm. Sugar Tech, 19(2): 183-190, 2016.

MACIEL, L.N.; DANELLI, A.L.D. Resistência genética de plantas a fungos. In: Dallagnol, L.J. (Org.). Resistência Genética de Plantas Patógenos. Pelotas: Editora UFPEL, 2018. P. 359-393.

PARCO, A.S. et al. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene Bru1 and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. Plant Breeding, Berlin, 3(4):1-6, 2014.

RABOIN, L.M. et al. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using biparental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust

resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 112:1382-1391, 2006.

RACEDO, J. et al. Bru1 gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. *Euphytica*, Wageningen, 191(4):429-436, 2013.

RAMDOYAL, K. et al. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 557–563, 2000.

SANTOS, H.G. et al. Sistema Brasileiro de Classificação de solos. 3.ed. Brasília, EMBRAPA, 353p, 2013.

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

TOKESHI, H.; RAGO, A. DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 4th ed. Ouro Fino—MG: Agronômica Ceres, 2, 219–231, 2016.

ZHANG, R.Y. et al. Genetic analysis of sugarcane brown rust resistance genes in wild sugarcane germplasm *Erianthus rockii* 'Yundian 95-19' and *Erianthus rockii* 'Yundian 95-20'. *Plant Genetic Resources*, 17(5):460-463, 2019.



### 3 CAPÍTULO II: REAÇÃO À FERRUGEM ALARANJADA E PRESENÇA DO MARCADOR MOLECULAR G1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA

Capítulo publicado na revista *Genetics and Molecular Research (GMR)* com o título “Resistance to orange rust associated with the G1 molecular marker in parentes of Brazilian RB sugarcane varieties”

#### Resumo

A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, causa diminuição de produtividade na cultura da cana-de-açúcar. A seleção de genótipos resistentes às principais doenças é um dos objetivos dos programas de melhoramento. Portanto, a caracterização fenotípica e molecular dos genitores envolvidos nos cruzamentos é fundamental para a obtenção de novas variedades de cana-de-açúcar. Os objetivos do trabalho foram avaliar a reação à ferrugem alaranjada no campo e o padrão de evolução da doença, a presença do marcador molecular G1 e a acurácia na predição do fenótipo resistente nos principais genitores de cana-de-açúcar da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA). Para o experimento foram utilizados 63 genitores de cana-de-açúcar conservados no banco de germoplasma da RIDESA, para a escolha foi levado em consideração aqueles que mais participaram de cruzamentos no período de 1970 a 2000. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos completos com três repetições e utilizando como linha infectora a variedade RB036145 (suscetível a ferrugem alaranjada). Foram realizadas onze avaliações de severidade com auxílio de escala diagramática. A partir dos dados de severidade da doença foi calculado a área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD<sub>r</sub>), e os genitores foram classificados como resistentes, intermediários e suscetíveis, levando em consideração o valor de AACPD<sub>r</sub> da variedade SP79-2233 (suscetível à ferrugem alaranja) e da variedade RB867515 (resistente à ferrugem alaranjada). Dos 63 genitores de cana-de-açúcar avaliados 43 foram classificados como resistentes, sendo 27 positivos para o marcador G1; 10 como intermediários, sendo 7 positivos para G1 e 10 como suscetíveis, sendo 4 positivos para o marcador. 68% dos genitores foram classificados como resistentes, 16% como intermediários e 16% como suscetíveis. O marcador molecular G1 apresentou precisão de seleção de 62,8% em predizer o fenótipo resistente, sendo uma importante ferramenta para a caracterização do germoplasma.

Palavras-chave: seleção assistida por marcadores; melhoramento de plantas; *Puccinia kuehnii*; *Saccharum* spp.

## Abstract

Orange rust caused by the fungus *Puccinia kuehnii* causes high productivity losses in sugarcane crops. The selection of genotypes resistant to major diseases is one of the aims of breeding programs. Therefore, the phenotypic and molecular characterization of the parents involved in the crosses is essential to obtain new sugarcane varieties. The objectives of this work were to evaluate the reaction to orange rust in the field and the pattern of disease evolution, the presence of the molecular marker G1 and the accuracy in the prediction of the resistant phenotype in the main sugarcane parents of the Interuniversity Network for Development of the Sugarcane Energy Sector (RIDESA) and discuss strategies to improve the selection for this disease. For the experiment, 63 sugarcane parents conserved in the RIDESA germplasm bank were used. For the choice, those who participated most in crossings in the period from 1970 to 2000 were considered. The experiment was carried out in a complete block design with three replications and using the variety RB036145 (susceptible to orange rust) as infective line. Eleven severity assessments were performed using a diagrammatic scale. From the disease severity data, the relative area under the disease progress curve (rAUDPC) was calculated, and the genotypes were classified as resistant, intermediate, and susceptible, taking into account the rAUDPC value of the SP79-2233 variety (susceptible to orange rust) and of the variety RB867515 (resistant to orange rust). Of the 63 sugarcane parents evaluated, 43 were classified as resistant, being 27 positive for the G1 marker; 10 as intermediates, being 7 positive for G1 and 10 as susceptible, being 4 positive for the marker. 68% of parents were classified as resistant, 16% as intermediate and 16% as susceptible. The molecular marker G1 showed an accuracy of 62.8% in predicting the resistant phenotype, being an important tool for the characterization of germplasm.

Key words: marker-assisted selection; plant breeding; *Puccinia kuehnii*; *Saccharum* spp.

### 3.1 Introdução

A ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler, é uma doença de importância econômica nos principais países produtores de cana-de-açúcar, por causar redução na produtividade em cultivares suscetíveis devido a formação de pústulas nas folhas e consequente redução da taxa fotossintética (ZHAO et al., 2011). O primeiro surto de ferrugem alaranjada foi na Austrália em 2000, e a cultivar Q124 respondia por 45% da safra, o fato da mesma ser suscetível a ferrugem alaranjada ocasionou consequências devastadoras a produção de cana-de-açúcar (MAGAREY et al., 2001). No Brasil, a ferrugem alaranjada foi relatada pela primeira vez no final de 2009 (BARBASSO et al., 2010). A variedade de cana-de-açúcar RB72454 mais amplamente plantada no Brasil entre 1995 e 2010 (CURSI et al., 2021) teve que ser substituída devido à sua suscetibilidade à ferrugem alaranjada (BRAGA JÚNIOR et al., 2011; BARBOSA et al., 2012).

O uso de variedades resistentes é um dos principais métodos de controle das doenças que afetam a cultura da cana-de-açúcar. O uso de variedades resistentes facilita o manejo da cultura e reduz os custos de produção por não utilizar agroquímicos, além de não agredir o meio ambiente. A resistência a doenças está entre as características mais importantes do programa de melhoramento da cana-de-açúcar da RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (MORAIS et al., 2015). O programa de melhoramento de cana-de-açúcar da RIDESA geralmente avalia a reação de cultivares de cana-de-açúcar às ferrugens marrom e alaranjada a partir da infecção natural no campo. Nas avaliações de doenças, são utilizadas escalas diagramáticas e as notas para severidade atribuídas visualmente (ARAÚJO et al., 2013, KLOSOWSKI et al., 2013a).

Marcadores moleculares associados a alelos de resistência podem ser extremamente úteis na identificação de genótipos resistentes nos estágios iniciais de programas de melhoramento e podem ser usados no processo de seleção assistida por marcador (MAS) (ALZATE-MARIN et al., 2005). Além disso, pode ser usado para indicar genitores em potencial para cruzamentos futuros (FIER et al., 2020) e organização do germoplasma. A classificação de genótipos por técnicas moleculares em cana-de-açúcar tem sido utilizada para

resistência à ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) (BARRETO et al., 2017).

O marcador molecular G1 associado à resistência da cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada foi o primeiro marcador a ser publicado e, apresentou eficiência de 65,8% na predição de fenótipos resistentes, a partir de estudos de mapeamento de uma população segregante F1 obtida do cruzamento entre os clones CP95-1039 (resistente) e CP88-1762 (suscetível) (YANG et al., 2018). Fier et al. (2020) relataram uma eficiência de avaliação em prever resistência à ferrugem alaranjada de 71,43% usando o marcador molecular G1 ao avaliar 24 cultivares comerciais brasileiras, enquanto Hoepers et al. (2020), observaram eficiência na predição do fenótipo resistente de 22,86% utilizando clones ainda em fase de seleção e cultivares comerciais.

A caracterização do germoplasma quanto à reação às principais doenças é uma medida que auxilia na seleção dos genitores, uma vez que focaria em cruzamentos específicos, permitindo aumentar o número de sementes por cruzamento e, conseqüentemente, a seleção de um maior número de clones promissores. Considerando que o banco de germoplasma de cana-de-açúcar da RIDESA carece de informações sobre a reação à ferrugem alaranjada, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a reação à ferrugem alaranjada no campo e o padrão de evolução da doença, a presença do marcador molecular G1 e a acurácia na predição do fenótipo resistente nos principais genitores de cana-de-açúcar da RIDESA.

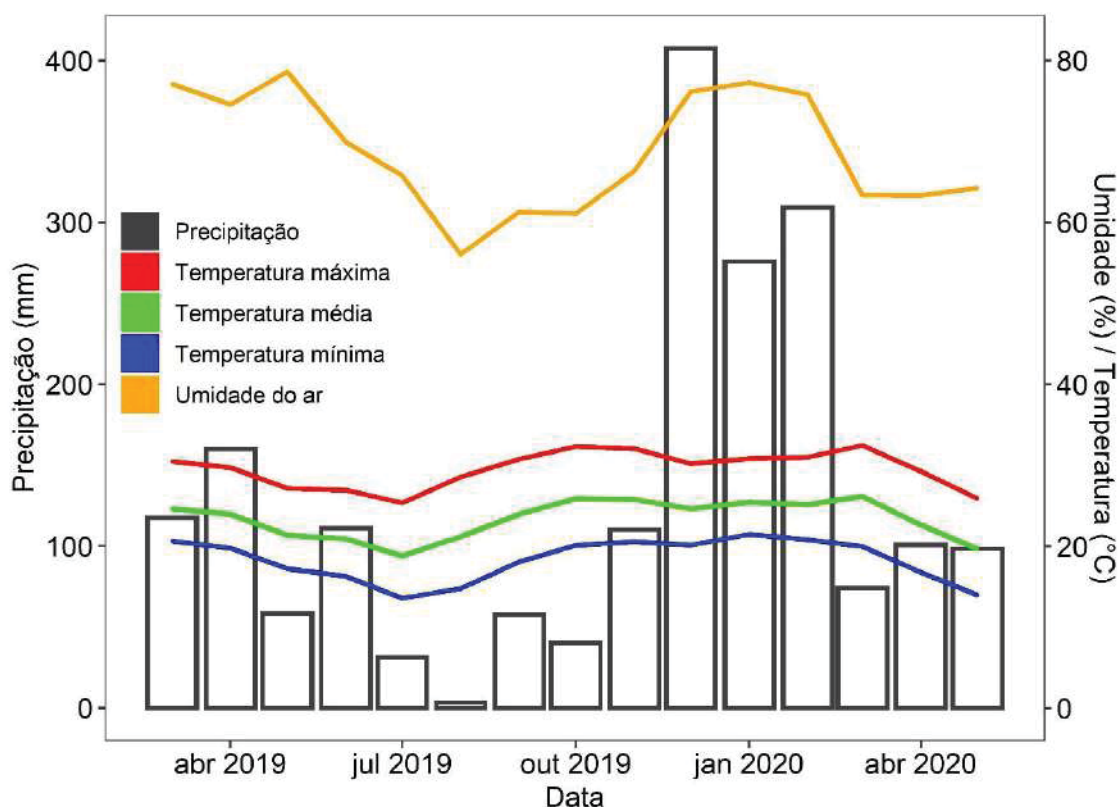
### **3.2 Material e Métodos**

O experimento de campo foi conduzido na Estação Experimental de Paranaíba (latitude 22°58' S, longitude 52°28' W e altitude de 503 m), pertencente à Universidade Federal do Paraná, de março de 2019 a maio de 2020. O clima da região é classificado como Cfa segundo Köppen, com precipitação anual de 1.200 a 1.400 mm e temperatura média anual entre 22 e 26 °C (APARECIDO et al. 2016), solo de Latossolo Vermelho distrófico, com relevo liso e ondulado (SANTOS et al. 2013). Os dados de temperatura (°C), precipitação (mm) e umidade relativa (%) (Figura 2.1) foram obtidos em uma

estação meteorológica automática, modelo Davis Vantage PRO2, localizada no local do experimento.

Para o experimento, foram utilizados 63 genótipos, pertencentes ao banco de germoplasma da RIDESA, localizado no município de Murici, estado de Alagoas (latitude 09° 13 'S, longitude 35° 50' W e altitude 515 m). Os genótipos selecionados para estudo representam os genitores que mais contribuíram para o desenvolvimento de clones promissores pela RIDESA nas décadas de 1970, 1980, 1990 e 2000.

FIGURA 2.1 – DADOS MENSAIS PARA UMIDADE DO AR, TEMPERATURA MÉDIA, TEMPERATURA MÁXIMA, TEMPERATURA MÍNIMA E PRECIPITAÇÃO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2019 A MAIO DE 2020, NO CICLO DA CANA-PLANTA, NO MUNICÍPIO DE PARANAÍ.



O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 63 genitores (tratamentos) e três repetições. O plantio foi realizado em março de 2019, cada parcela foi composta de dois sulcos de três metros com espaçamento de 1,4 m e plantio de 15 gemas por metro. Para aumentar a concentração de inóculo da ferrugem alaranjada na área, o clone RB036145 (suscetível à ferrugem alaranjada) foi utilizado como linha doadora, estando presente a cada duas parcelas.

Foram realizadas avaliações mensais para severidade da ferrugem alaranjada, usando uma escala diagramática desenvolvida por Klosowski et al. (2013a) cujas pontuações variam de 1 a 9, 1 (0,06%), 2 (0,14%), 3 (0,36%), 4 (0,89%), 5 (2,17%), 6 (5,18%), 7 (11,87 %), 8 (24,9%) e 9 (45%), da área foliar afetada por sintomas. As avaliações de severidade foram iniciadas em julho de 2019, totalizando 11 avaliações. A severidade da doença foi determinada na folha +3, em dez plantas por repetição, e as notas foram atribuídos à posição com a maior severidade da doença.

A partir dos dados de severidade, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada para cada genitor (SHANER e FINNEY, 1977). Além da AACPD, foi obtida a área abaixo da curva de progresso da doença relativa (AACPD<sub>r</sub>), dividindo o valor de AACPD pelo tempo de epidemia conforme proposto por Fry (1978). Os genitores foram classificados em resistente (AACPD<sub>r</sub> ≤ 0,02), intermediário (0,02 < AACPD<sub>r</sub> > 1,87) e suscetível (AACPD<sub>r</sub> ≥ 1,87). Para a classificação foi utilizado o valor de AACPD<sub>r</sub> obtido no presente trabalho para as variedades SP79-2233 e RB867515, consideradas suscetível à ferrugem alaranjada e resistente à ferrugem alaranjada, respectivamente (Garcés et al. 2014; Klosowski et al., 2015; Chapola et al., 2016; Fier et al., 2020).

O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), onde, 0,3 g de folhas jovens, sem a nervura central de cada genitor foram maceradas com nitrogênio líquido. Os DNAs extraídos foram ressuspensos em 50 µL de água ultrapura e a concentração das amostras foram feitas com o equipamento NanoDrop (ND-1000 UV-VIS). Após a quantificação, 5 µL do DNA de cada amostra foi diluído em água ultrapura até a concentração de 120 ng/µL, e então utilizado para realizar a PCR.

Amostras de DNA foram submetidas à PCR e as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, seguindo o protocolo GoTaq Master Mix (Promega) contendo: 1 x GoTaq Master Mix, 1 µl de cada um dos primers na concentração de 10 mM, 3 µl de molde de DNA na concentração de 120 ng/µl e água ultrapura para completar o volume. O marcador molecular G1 foi utilizado para amplificar um fragmento de 970 pb, de acordo com o programa descrito por Yang et al. (2018), sendo, a mistura da reação incubada a 95 °C por 5 min, seguido de cinco ciclos de 60 segundos de desnaturação a 96 °C e 5 minutos de anelamento a

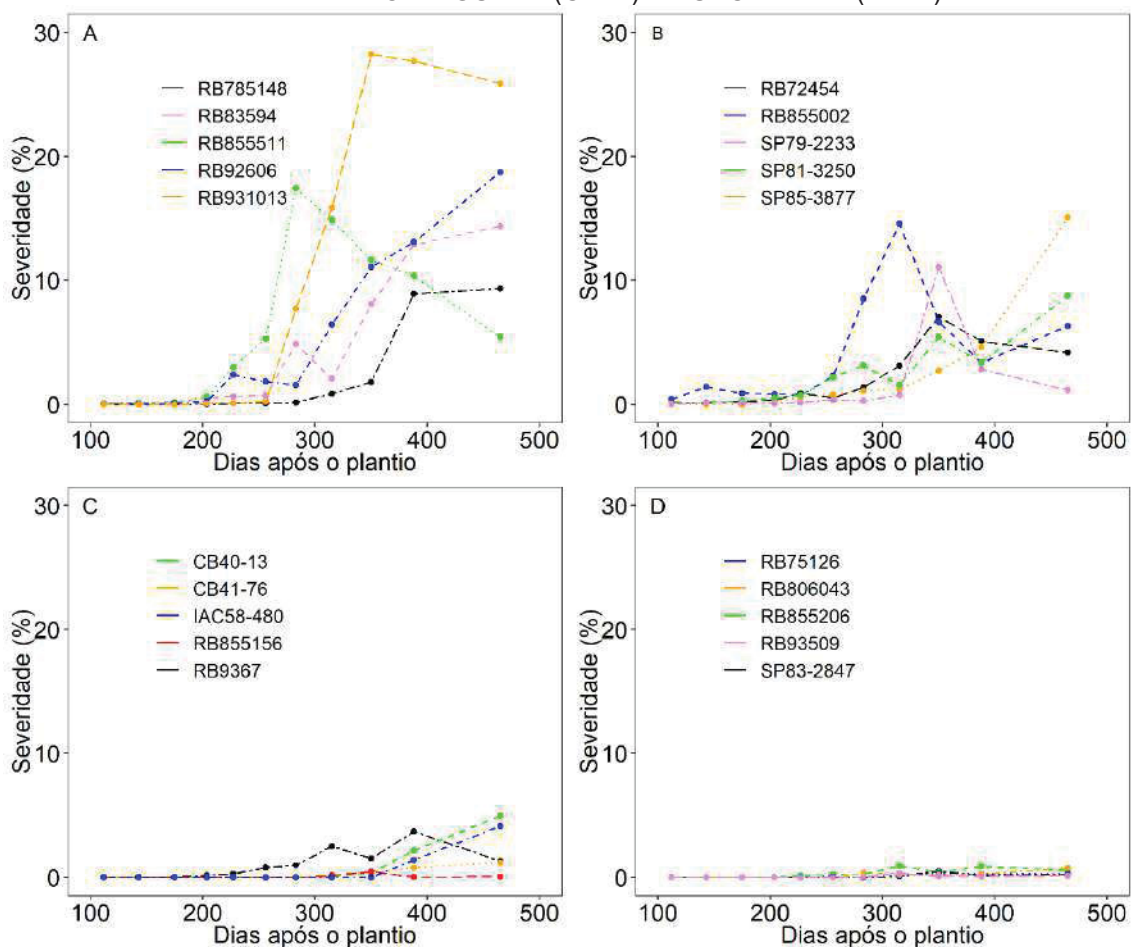
68°C com uma diminuição de 2 °C a cada ciclo, e 1 minuto de extensão a 72 °C; Durante outros cinco ciclos, a temperatura de anelamento começou a 58 °C durante 2 minutos com um decréscimo de 2 °C para cada ciclo; A PCR continuou durante 25 ciclos adicionais de 60 segundos a 96 °C, 1 minuto a 50 °C e 1 minuto a 72 °C com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os seguintes pares de primers foram utilizados: Forward: 5'ACCATGGAAATCCATACGTC3 '(Forward) e 5'GGCCAACACTTAGGCCAATA3' (Reverse). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com gel vermelho (Biotium®), utilizando a escala de 100 pb como marcador de peso molecular. As cultivares RB855156 e RB72454 foram utilizadas como controle positivo e a cultivar RB845210 como controle negativo (FIER et al., 2020).

A precisão da seleção do marcador molecular G1 em prever o fenótipo resistente foi obtida a partir dos dados de reação dos genitores. Para tal, a soma do número de genitores classificados como resistentes e positivos para G1 foi dividido pelo número de genitores resistentes multiplicando o resultado por 100 (YANG et al., 2018a).

### **3.3 Resultados**

A curva de progresso da ferrugem alaranjada em genitores intermediários e suscetíveis é mostrada na Figura 2.2. Os primeiros sintomas da ferrugem alaranjada foram observados em julho de 2019, aos quatro meses após o plantio, ocorrendo aumento da severidade no final de novembro, nos genitores suscetíveis (Figura 2.2 A e B). Os maiores valores de severidade foram observados a partir do mês de janeiro para a maioria dos genitores. Nos genitores intermediários (Figura 2.2 C e D) foi observado menor intensidade da doença e evolução lenta da doença.

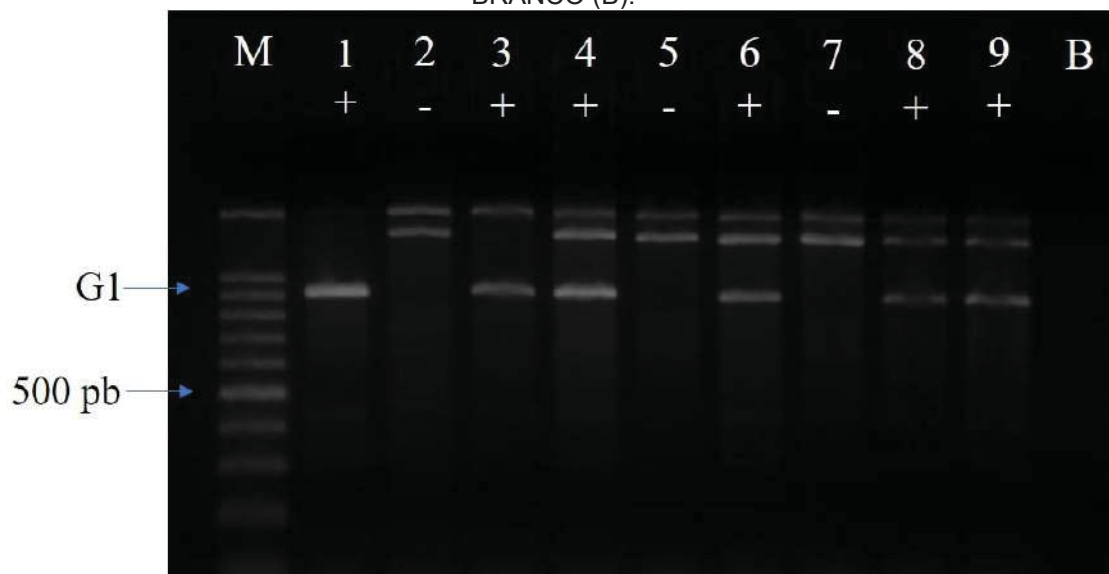
FIGURA 2.2 - CURVAS DE PROGRESSO DA DOENÇA PARA A FERRUGEM ALARANJADA (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR AFETADA POR SINTOMAS) NOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA. OS GENITORES CLASSIFICADOS COMO INTERMEDIÁRIOS FIGURAS (C e D) E SUSCETÍVEIS (A E B).



Os genitores que apresentaram o fragmento referente ao marcador molecular G1, amplificado por PCR com tamanho esperado de 970 pb, foram classificados como positivos (+). Os genitores que não amplificaram o fragmento correspondente ao marcador foram classificados como negativos (-) para o G1 (Figura 2.3).



FIGURA 2.3 - PADRÃO ELETROFORÉTICO EM GEL DE AGAROSE (1%) DO MARCADOR MOLECULAR G1 EM GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA. LADDER 100 PB (M), RB91539 POSITIVO (1), RB83102 NEGATIVO (2), RB835019 POSITIVO (3), RB855536 POSITIVO (4), CTC 4 NEGATIVO (5), RB855511 POSITIVO (6), RB845210 CONTROLE NEGATIVO (7), RB855156 CONTROLE POSITIVO (8), RB72454 CONTROLE POSITIVO (9), BRANCO (B).



Os resultados referentes à classificação da reação à ferrugem alaranjada, severidade máxima e presença do marcador molecular G1 (+) nos principais genitores da cana-de-açúcar estão apresentados na (Tabela 2.1). Dos 63 genitores avaliados em campo, 43 (68%) foram classificados como resistente à ferrugem alaranjada, 10 (16%) como intermediário e 10 (16%) como suscetível. Dos 43 genitores classificados como resistentes à ferrugem alaranjada, 27 (63%) apresentaram o fragmento relacionado ao marcador molecular G1, 7 (70%) dos 10 classificados como intermediários e 4 (40%) dos 10 classificados como suscetíveis, foram positivos para o marcador. A frequência de genitores resistentes nas décadas de 1970, 1980, 1990 e 2000 foi de 75%, 70%, 67%, 68% respectivamente.

TABELA 2.1 - REAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENITORES DE CANA-DE-AÇÚCAR DA RIDESA À FERRUGEM ALARANJADA E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DO MARCADOR MOLECULAR G1, NAS DÉCADAS DE 1970 (70), 1980 (80), 1990 (90) E 2000 (00).

Genitor	Genealogia		Décadas				G1	AACPD <sub>r</sub>	Severidade Máxima	Classificação
	♀	♂	70	80	90	00				
<b>M253-48</b>	B34104	M21340	x				+	0	0	R
<b>CO331</b>	CO213	CO214	x				+	0	0	R
<b>CB41-14</b>	?	?	x				-	0	0	R
<b>CB41-76</b>	POJ2878	?	x				+	0,31	1,18	I

<b>CO740</b>	P3247	P4775	x	+	0	0	R		
<b>L60-14</b>	CP521	CP48103	x	+	0	0	R		
<b>RB735220</b>	CB4495	?	x	+	0	0	R		
<b>NA56-79</b>	CO419	CO419	x	+	0	0	R		
<b>SP70-1143</b>	IAC4865	?	x	-	0	0	R		
<b>SP71-1406</b>	NA56-79	?	x	+	0	0	R		
<b>TUC71-7</b>	CP5268	CP62258	x	x	+	0	0	R	
<b>IAC58-480</b>	POJ2878	CP44101	x	+	0,55	4,12	I		
<b>CB40-13</b>	?	?	x	+	0,93	4,95	I		
<b>RB72454</b>	CP5376	?	x	x	x	+	2,74	7,04	S
<b>RB735200</b>	CO331	?	x	-	0	0	R		
<b>RB765418</b>	M25348	?	x	+	0	0	R		
<b>RB835019</b>	RB72454	NA56-79	x	+	0	0	R		
<b>RB835054</b>	RB72454	NA56-79	x	+	0	0	R		
<b>RB835089</b>	RB72454	NA56-79	x	+	0	0	R		
<b>RB835486</b>	L6014	?	x	-	0	0	R		
<b>RB855453</b>	TUC71-7	?	x	+	0	0	R		
<b>RB855563</b>	TUC71-7	SP70-1143	x	+	0	0	R		
<b>SP79-1011</b>	NA56-79	CO775	x	+	0	0	R		
<b>RB751194</b>	CB4049	?	x	+	0	0	R		
<b>RB75126</b>	C278	?	x	+	0,11	0,29	I		
<b>RB806043</b>	NA56-79	?	x	-	0,19	0,75	I		
<b>RB855206</b>	RB72454	TUC71-7	x	+	0,38	0,89	I		
<b>RB785148</b>	IAC47-31	?	x	-	2,76	9,33	S		
<b>RB855002</b>	SP70-1143	RB72454	x	+	4,53	14,57	S		
<b>BJ7504</b>	?	?		x	-	0	0	R	
<b>CO62175</b>	CO951	CO419	x	-	0	0	R		
<b>CTC4</b>	SP83-5073	?	x	-	0	0	R		
<b>F150</b>	CO310	PT4352	x	+	0	0	R		
<b>IAC862210</b>	CP5258	CO798	x	-	0	0	R		
<b>RB72910</b>	?	?	x	-	0	0	R		
<b>RB745464</b>	CP5376	?	x	+	0	0	R		
<b>RB83102</b>	NA56-79	SP70-1143	x	-	0	0	R		
<b>RB83160</b>	NA56-79	SP70-1143	x	+	0	0	R		
<b>RB845210</b>	RB72454	SP70-1143	x	-	0	0	R		
<b>RB855035</b>	L6014	SP70-1284	x	+	0	0	R		
<b>RB855113</b>	SP70-1143	RB72454	x	-	0	0	R		
<b>RB855536</b>	SP70-1143	RB72454	x	+	0	0	R		
<b>RB867515*</b>	RB72454	?	x	+	0,02	0,20	R		
<b>RB91539</b>	H59-9018	?	x	+	0	0	R		
<b>RB928064</b>	SP70-1143	?	x	-	0	0	R		
<b>RB931011</b>	RB83160	RB72454	x	+	0	0	R		
<b>RB931530</b>	Q107	?	x	+	0,01	0,06	R		
<b>RB931566</b>	RB721012	RB835089	x	+	0	0	R		
<b>RB931602</b>	Q113	RB72454	x	-	0	0	R		
<b>SP80-1816</b>	SP71-1088	H57-5028	x	-	0	0	R		
<b>SP80-1842</b>	SP71-1088	H57-5028	x	-	0	0	R		
<b>SP80-3280</b>	SP71-1088	H57-5028	x	+	0	0	R		
<b>RB855156</b>	RB72454	TUC71-7	x	+	0,07	0,45	I		
<b>RB93509</b>	RB72454	?	x	-	0,06	0,33	I		
<b>SP83-2847</b>	HJ5741	SP70-1143	x	-	0,11	0,46	I		
<b>RB9367</b>	RB72454	RB83102	x	+	1,31	3,70	I		
<b>SP79-2233*</b>	H562954	?	x	-	1,87	11,07	S		
<b>SP81-3250</b>	CP701547	SP71-1279	x	-	2,77	8,76	S		
<b>SP85-3877</b>	H65606	?	x	-	3,00	15,09	S		
<b>RB83594</b>	RB72454	B3337	x	+	5,27	14,38	S		
<b>RB855511</b>	SP71-1406	?	x	+	7,06	17,42	S		
<b>RB92606</b>	Q107	RB72454	x	-	6,38	18,74	S		
<b>RB931013</b>	RB72454	RB83100	x	-	12,47	28,25	S		

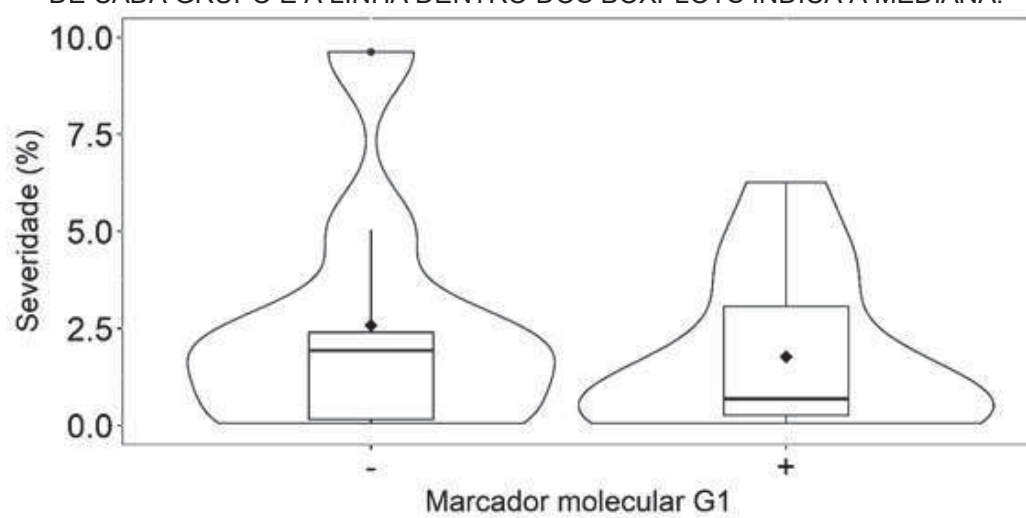
\* SP79-2233 padrão suscetível, RB867515 padrão resistência; AACPD<sub>r</sub> – área abaixo da curva de progresso da doença relativa.

A porcentagem de genitores positivos para o marcador molecular G1 é de 60%. Esse resultado sugere que a presença do marcador é frequente entre os

principais genitores de cana-de-açúcar da RIDESA, nas décadas de 1970 à 2000.

A acurácia da seleção (eficiência em predizer o fenótipo resistente) do marcador G1 foi de 62,8% com 27 genótipos resistentes à ferrugem alaranjada (fenotípica e genotípica) entre os 43 genótipos resistentes (Tabela 2.1). Considerando a severidade dos genitores pertencentes aos grupos intermediário e suscetível, houve redução de 31,4% no valor médio da severidade quando o marcador molecular G1 estava presente, diminuindo de 3% para 2%, conforme análise descritiva (Figura 2.4).

FIGURA 2.4 - BOXPLOTS PARA SEVERIDADE (PORCENTAGEM DA ÁREA FOLIAR DE CANA-DE-AÇÚCAR COM SINTOMAS DE FERRUGEM ALARANJADA) DOS GRUPOS DE GENITORES INTERMEDIÁRIOS E SUSCETÍVEIS, POSITIVOS (+) E NEGATIVOS (-) PARA O MARCADOR MOLECULAR G1. O PONTO PRETO INDICA A SEVERIDADE MÉDIA GERAL DE CADA GRUPO E A LINHA DENTRO DOS BOXPLOTS INDICA A MEDIANA.



### 3.4 Discussão

A caracterização da reação do germoplasma às principais doenças é extremamente útil para programas de melhoramento. A utilização de marcadores moleculares como ferramenta neste processo de caracterização também é importante, pois aumenta a informação do germoplasma, facilitando a escolha dos genitores (GUIMARÃES et al., 2016).

A ocorrência da ferrugem alaranjada depende das condições ambientais, sendo observado maior severidade em condições de alta umidade e temperatura do ar quente (MINCHIO et al., 2017) e do estágio de desenvolvimento, observada

em plantas adultas (GARCIA et al., 2007, BRAITHWAITE et al., 2009). Nos genitores suscetíveis foi observado aumento da curva de progresso da doença no final de novembro e maiores severidades da doença a partir de janeiro, corroborando com os trabalhos de Valeriano et al. (2021), Chapola et al. (2016) e Araújo et al. (2013).

Os genitores de cana-de-açúcar com reação intermediária (Figura 2 C e D) apresentaram menor severidade para ferrugem alaranjada e a evolução da doença tendeu a ocorrer de forma mais lenta ao longo do tempo em relação aos genitores com reação suscetível (Figura 2.2 A e B), indicativo de resistência horizontal / quantitativa. A resistência quantitativa é definida como um tipo de resistência que afeta tanto o início da doença quanto a velocidade de desenvolvimento, resistência fenotipicamente incompleta e caracterizada por intensidade reduzida da doença, mas não ausência, quando comparada a genótipos mais suscetíveis (AMORIM et al., 2018).

A porcentagem de genitores resistentes à ferrugem alaranjada em condições de campo observada neste trabalho foi de 68%, indicando que embora a doença tenha surgido no Brasil em dezembro de 2009, uma grande porcentagem de genitores resistentes já estava sendo utilizada nas combinações de cruzamentos de cana-de-açúcar pela RIDESA. Isso contribuiu para que a doença não causasse danos na produtividade com o seu surgimento no Brasil, pois um número maior de variedades já era resistente e as suscetíveis foram rapidamente substituídas (FIER et al., 2020). A chegada da ferrugem alaranjada na Colômbia, em julho de 2010 também fez com que clones suscetíveis fossem rapidamente eliminados dos experimentos, sendo que as cultivares comerciais mais plantadas eram resistentes a doença (CADAVID et al., 2012).

Embora a ferrugem alaranjada tenha surgido no Brasil em 2009 (BARBASSO et al., 2010), podemos observar que a maioria dos genitores utilizados em cruzamentos nas décadas de 1970 e 1980 eram resistentes a doença, esse número se manteve estável nas décadas seguintes. Em trabalho realizado por Borella et al. (2021) que avaliaram a resistência à ferrugem marrom no mesmo grupo de genótipos, foi observado aumento na frequência de genótipos resistentes no decorrer das décadas.

O genitor RB72454 (suscetível à ferrugem alaranjada e positivo para o marcador molecular G1) é o genitor mais importante da RIDESA, tendo

participado de cruzamentos nas décadas de 1980, 1990 e 2000, desempenhando importante papel no desenvolvimento de novas cultivares. Neste estudo, RB72454 participou de 17 combinações de cruzamentos como genitor (feminino ou masculino) e deu origem a 9 genótipos resistentes. Um exemplo de sucesso em que a progenitora RB72454 participou como mãe foi a cultivar RB867515 (resistente à ferrugem alaranjada e positivo para o marcador G1). Isso reforça a possibilidade de considerar o uso de genitores suscetíveis à ferrugem alaranjada em combinações de cruzamento quando eles apresentam outras características favoráveis, como foi o caso do RB72454 (KLOSOWSKI et al., 2013b, YANG et al., 2018).

Para 12 (doze) genitores foi possível rastrear a presença do marcador G1 em seus progenitores. Seis desses genitores vieram de cruzamentos onde ambos os progenitores eram positivos para o marcador G1 e todos eles também eram positivos. Destes seis, 4 apresentaram reação resistente (RB835019, RB835054, RB835089 e RB931011) enquanto dois apresentaram reação intermediária à ferrugem alaranjada (RB855206 e RB855156).

Para os outros seis genitores, um progenitor foi positivo e o outro negativo para o marcador G1. Metade desses genitores (3) eram positivos para o G1 e metade (3) eram negativos. Em relação à reação à ferrugem alaranjada, cinco genitores foram resistentes (RB83102, RB83160, RB845210, RB855113 e RB855536) e um foi suscetível (RB855002). Assim, parece que o (s) gene (s) de resistência associados ao marcador G1 estão envolvidos na resistência quantitativa e que mais de uma cópia (alelo) do gene de resistência ligado ao marcador G1 pode aumentar os níveis de resistência à ferrugem laranja, como sugerido por Fier et al. (2020).

Yang et al. (2018) relataram que a resistência fornecida pelo marcador G1 é quantitativa e uma resistência mais forte foi alcançada se combinada com outros loci (efeito aditivo). Esta pode ser a causa da razão pela qual em cruzamentos entre o progenitor RB72454 (susceptível à ferrugem alaranjada e positivo para G1) e o progenitor NA56-79 (resistente e positivo para G1) apenas genitores positivos foram observados, enquanto genitores negativos foram observados entre RB72454 e SP70-1143 (resistente à ferrugem alaranja e negativo para G1).

O marcador molecular G1 foi desenvolvido por pesquisadores na Sugarcane Field Station em Canal Point, a partir de estudos oriundos de uma população segregante obtida pelo cruzamento dos clones de cana-de-açúcar (CP95-1039 e CP88-1762) e apresentou eficiência de 65,8% (YANG et al., 2018). No trabalho de Fier et al. (2020), utilizando o marcador molecular G1, em cultivares de cana-de-açúcar Brasileiras observaram eficiência na predição de resistência de 71,43%, indicando que este marcador poderia ser utilizado para seleção assistida em programas de melhoramento da cana-de-açúcar. Já em trabalho realizado por Hoepers et al. (2020), os autores não validaram o marcador molecular G1 por ter apresentado acurácia de 22,86% na predição do fenótipo resistente à ferrugem alaranjada, utilizando clones selecionados em programa de melhoramento brasileiro e cultivares comerciais de cana-de-açúcar. Para o grupo de genitores utilizado neste estudo, o marcador molecular G1 apresentou precisão de seleção de 62,8% na predição de genitores resistentes, resultado semelhante ao obtido por Yang et al. (2018) e Fier et al. (2020) e superior ao obtido por Hoepers et al. (2020).

A ausência do marcador molecular G1 em genitores resistentes à doença (como SP70-1143, RB735200, RB835486, RB845210, CTC4, RB83102, SP80-1842), e a presença do marcador G1 em genitores intermediários e suscetíveis, sugere que outros genes podem estar relacionados à resistência à ferrugem alaranjada e que a única presença do marcador G1 não é suficiente para trazer resistência à doença. Klosowski et al. (2013b) e Yang et al. (2018) já relataram a possibilidade de herança quantitativa para a ferrugem alaranjada, em que a resposta de resistência é baseada na interação do efeito de vários genes, cada um contribuindo quantitativamente para o nível de resistência da planta, que pode ser influenciado pelo ambiente.

Em trabalho realizado por Klosowski et al. (2013b) com a ferrugem alaranjada, os autores observaram que a reação de progênies de cruzamentos envolvendo genitores resistentes não sustentou a hipótese de segregação 3:1 que condiciona a presença de um principal gene de resistência, diferentemente do que Daugrois et al. (1996), com o gene Bru1 para ferrugem marrom. Em um estudo de Yang et al. (2019), os autores sugeriram que a resistência à ferrugem alaranjada era quantitativa com a contribuição de vários genes. Além disso, outros QTLs associados à resistência à ferrugem alaranjada foram identificados, o

que concorda com a teoria de que vários genes estão envolvidos na resposta da cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada (YANG et al., 2018, YANG et al., 2019). Outros marcadores moleculares associados à resistência da cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada foram relatados por McCord et al. (2019), em experimento com genótipos da coleção de germoplasma da Sugarcane Research Station no Canal Point (Flórida, Estados Unidos).

No presente estudo, o marcador G1 demonstrou alta eficiência na predição de genitores resistentes à ferrugem alaranjada (62,8%) e por ser eficaz na redução da severidade da doença, mostrando-se uma ferramenta útil para ser utilizada na caracterização de germoplasma de cana-de-açúcar, complementando as informações das avaliações de campo e contribuindo para a seleção de genitores para cruzamentos. Mais estudos devem ser desenvolvidos no sentido de compreender a herança da resistência à ferrugem alaranjada e os mecanismos ligados à resposta de resistência, assim como novos estudos a fim de investigar novas fontes de resistência à doença.

### **3.5 Conclusões**

Dos principais genitores utilizados pelo programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar da RIDESA, 68% foram classificados como resistentes a ferrugem alaranjada. O marcador molecular G1 apresentou precisão de seleção de 62,8% na predição do fenótipo resistente sendo uma ferramenta valiosa para caracterização do germoplasma.

### 3.6 Referências

- ALZATE-MARIN, A.L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira* 30: 333–342, 2005.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia Volume I Princípios e conceitos. 5ª Ed, Editora Agronômica Ceres Ltda, 2018.
- APARECIDO, L.E.O. et al. Climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia*, v.40, n.4, p.405-417, 2016.
- ARAÚJO, K.L. et al. Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.39, p.271-275, 2013.
- BARBASSO, D. et al. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. *Plant Disease*, St. Paul, v.94, p.1170, 2010.
- BARBOSA, M.H.P. et al. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: The Brazilian experience in network research with RIDESA. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 87–98, 2012.
- BARRETO, F.Z. et al. Validação de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica* 43: 36-40, 2017.
- BRAGA, J. et al. Evolução das áreas cultivadas com variedades de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos vinte anos. *STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba 30: 46–50, 2011.
- BRAITHWAITE, K.S. et al. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian Plant Pathology*, Collingwood, v. 38, n. 4, p. 380-388, 2009.
- BORELLA, J. et al. Reaction to brown rust and presence of the Bru1 gene in Brazil/RIDESA sugarcane parents. *Sugar Tech*, 2021.
- CADAVID M, ÁNGEL J.C, VICTORIA J.I. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Colombia. *Plant Disease*, v.96, n 1, p 143, 2012.
- CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; MASSOLA, N.S. Reaction of sugarcane cultivars to orange rust (*Puccinia kuehnii*) and methods for rapid identification of resistant genotypes. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v.41, p.139-146, 2016.
- CURSI, D.E. et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular genetics in Brazil. *Sugar Tech*, 2021.



- DAUGROIS J.H. et al. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.92, p.1059-1064, 1996.
- DE MORAIS, L.L. et al. Breeding of sugarcane. In *Industrial crops: Breeding for bioenergy and bioproducts*, eds. Von Mark V. Cruz, and David A. Dierig, 2015, p. 29–42.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.
- FIER, I. et al. Field resistance and molecular detection of the orange rust resistance gene linked to G1 marker in Brazilian cultivars of sugarcane. *Summa Phytopathologica* 46: 92–97, 2020.
- FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide affects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68:1650-1655. 1978.
- GARCÉS, F.F. et al. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Ecuador. *Plant Disease* 98(6):848, 2014.
- GARCIA, E.O. et al. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*. vol.33, no.2, p.152-156, 2007.
- GUIMARÃES, C.T et al. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém, A e Caixeta, E. *Marcadores moleculares*, p129-177, 2016.
- HOEPERS, L.M.L. et al. Validation of the G1 molecular marker associated with resistance to orange rust in Brazilian sugarcane genotypes. *Sugar Tech*, v.23, p.108-117, 2020.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v.38, p.166-171, 2013a.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Inheritance of resistance to orange rust (*Puccinia kuehnii*) in sugarcane families from crosses between parents with different orange rust reactions. *Sugar Tech*, New Delhi, v.15, p.379-383, 2013b.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Reação de cultivares e época de avaliação da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Bioscience Journal* 31: 489–498, 2015.
- MAGAREY, R.C. et al. Orange rust, a major pathogen affecting crops of Q124 in Queensland in 2000. *Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technology*, v.23, p.274-280, 2001.

MCCORD, P.; GLYNN, N.; COMSTOCK, J. Identifying markers for resistance to sugarcane orange rust (*Puccinia kuehni*) via selective genotyping and capture sequencing. *Euphytica* 215: 150, 2019.

MINCHIO, C.A, FANTIN, L.H, OLIVEIRA K.B, ROCHA J.A, CANTERI M. Morphological changes of the Uredinospore of *Puccinia kuehni* germ tube in function of temperature. *Agronomy Science Biotechnology* 3:19–24, 2017.

SANTOS, H.G. et al. Sistema Brasileiro de Classificação de solos. 3.ed. Brasília, EMBRAPA, 353p, 2013.

SHANER, G.; Finney, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051–1056, 1977.

VALERIANO, T.T.B.; ROLIM, G.S.; MANICI, L.M.; GIUSTARINI, L.; BREGAGLIO, S. A process-based model to simulate sugarcane orange rust severity from weather data in Southern Brazil. *International Journal of Biometeorology*, 65:2037–2051, 2021.

YANG, X. et al. Identifying quantitative trait loci (QTLs) and developing diagnostic markers linked to orange rust resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Frontiers in Plant Science* 9: 350, 2018.

YANG, X. et al. Genome-Wide association studies identified resistance loci to orange rust and yellow leaf virus diseases in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Phytopathology*, v.109, n.4, p. 623-631, 2019.

ZHAO, D, GLYNN, N.C, GLAZ, B, COMSTOCK, J.C, SOOD, S. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease*. 95(6):640-647, 2011. doi: 10.1094/PDIS-10-10-0762.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento dos cruzamentos e a escolha dos genitores são etapas que garantem o sucesso dos programas de melhoramento genético. O cruzamento entre genitores que apresentem características agrônomicas de interesse comercial como alta produtividade, resistência a doenças e alto teor de açúcares, aumentam as chances de desenvolvimento de cultivares superiores.

Existem diferentes técnicas que podem ser utilizadas para facilitar as etapas de seleção clonal, no entanto, a escolha inapropriada do germoplasma (genitores) talvez seja o fator limitante para aumento dos ganhos genéticos. O conhecimento da reação dos genitores presentes nos bancos de germoplasma tanto para fatores bióticos quanto abióticos, a partir da caracterização, é uma estratégia importante para os programas de melhoramento genético, a fim de facilitar a etapa de seleção, priorizando cruzamentos entre genitores superiores, além de possibilitar o melhor aproveitamento do germoplasma disponível.

Estudos de variabilidade genética existente entre os genitores utilizados em cruzamento é outro ponto importante para organização do germoplasma, sendo fundamental que exista variabilidade genética, de forma que possibilite a recombinação e se obtenha indivíduos superiores, gerando ganhos genéticos devido à maior heterozigose.

Uma caracterização mais abrangente, envolvendo todos os acessos pertencentes ao banco de germoplasma da RIDESA, com a inclusão de caracteres morfo agrônomicos de importância e outras doenças como o carvão, devido a sua importância para o estado do Paraná, pode contribuir para o programa de melhoramento genético.

Em complemento, estudos de variabilidade genética também podem ser realizados, com a utilização de técnicas estatísticas que possibilitem melhor organização e visualização do germoplasma, a exemplo da técnica de Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen.

## 5 REFERÊNCIAS GERAIS

AMORIM, L. et al. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). Boletim Técnico Copersucar, São Paulo, n.39:13-16, 1987.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia volume I princípios e conceitos. 5ª Ed, Editora Agronômica Ceres Ltda, 2018.

ALZATE-MARIN, A.L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças com ênfase em feijoeiro e soja. Fitopatologia Brasileira 30: 333–342, 2005.

APARECIDO, L.E.O. et al. Climate classifications for climatic zoning in the State of Paraná, Brazil. Ciência e Agrotecnologia, 40(4):405-417, 2016.

ARAÚJO, K.L. et al. Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.39, p.271-275, 2013.

ASHKANI, S. et al. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of disease resistance in rice crop. Frontiers in Plant Science 6, 2015.

ASNAGHI, C. et al. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, New York, 108 (4):759-764, 2004.

BARBASSO, D. et al. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. Plant Disease, St. Paul, v.94, p.1170, 2010.

BARBOSA, M.H.P. et al. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: The Brazilian experience in network research with RIDESA. Crop Breeding and Applied Biotechnology 12: 87–98, 2012.

BARBOSA, G.V.S. Inovações tecnológicas desenvolvidas em Alagoas para o setor canavieiro- Maceió: Fapeal: Imprensa Oficial Graciliano Ramos, 136p, 2018.

BARRETO, F.Z. et al. Validação de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom em cana-de-açúcar. Summa Phytopathologica 43: 36-40, 2017.

BRAGA, J. et al. Evolução das áreas cultivadas com variedades de cana-de-açúcar no Brasil nos últimos vinte anos. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba 30: 46–50, 2011.

BRAITHWAITE, K.S. et al. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian Plant Pathology*, Collingwood, v. 38, n. 4, p. 380-388, 2009.

BORELLA, J. et al. Reaction to brown rust and presence of the Bru1 Gene in Brazil/RIDESA sugarcane parents. *Sugar Tech*, 2021.

CADAVID M, ÁNGEL J.C, VICTORIA J.I. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Colombia. *Plant Disease*, v.96, n 1, p 143, 2012.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In *Manual de Fitopatologia*, 5th ed São Paulo: Agronômica Ceres, 1, 85–92, 2018.

CAMPBELL, C. L. MADEN, L.V. Madden. *Introduction to plant disease epidemiology*, 532 p, 1990.

CHAPOLA, R.G.; HOFFMANN, H.P.; MASSOLA, N.S. Reaction of sugarcane cultivars to orange rust (*Puccinia kuehnii*) and methods for rapid identification of resistant genotypes. ***Tropical Plant Pathology***, Brasília, v.41, p.139-146, 2016.

CHU, T.L., J.L.; SERAPION, AND J.L. RODRIGUEZ. Varietal reaction and inheritance trends of susceptibility of sugarcane to rust (*Puccinia melanocephala* h. & p. Svd). *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 66: 99–108, 1979.

COSTET, L. et al. Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 125:825-836, 2012.

CURSI, D.E. et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular genetics in Brazil. *Sugar Tech*, 2021.

CURSI, D.E. et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular genetics in Brazil. *Sugar Tech*, 2021.

DAUGROIS, J.H. et al. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 92:1059-1064, 1996.

FERREIRA, M.E.; D. GRATTAPAGLIA. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, Brasília: Embrapa Cenargen, 1995.

FIER, I. et al. Field resistance and molecular detection of the orange rust resistance gene linked to G1 marker in Brazilian cultivars of sugarcane. *Summa Phytopathologica* 46: 92–97, 2020.

FRY, W.E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide affects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology*, 68:1650-1655, 1978.

- GARCÉS, F.F. et al. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Ecuador. *Plant Disease* 98(6):848, 2014.
- GARCIA, E.O. et al. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. *Summa Phytopathologica*. vol.33, no.2, p.152-156, 2007.
- GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; MC CORKLE, K. Screening for resistance to brown rust of sugarcane: Use of Bru1 resistance gene prospects and challenges. *Journal American Society of Sugar Cane Technologists*, Belle Glade, 32:82, 2013.
- GUIMARÃES, C.T et al. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas. In: Borém, A e Caixeta, E. Marcadores moleculares, p129-177, 2016.
- HOEPERS, L.M.L. et al. Validation of the G1 molecular marker associated with resistance to orange rust in Brazilian sugarcane genotypes. *Sugar Tech*, v.23, p.108-117, 2020.
- HOGARTH, D.M.; RYAN, C.C.; TAYLOR, P.W.J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugarcane. *Field Crops Research*, 34:187-193, 1993.
- HOY, J.W.; HOLLIER, C.A. Effect of brown rust on sugarcane yield in Louisiana. *Plant Disease*, 11:1171-1174, 2009.
- IDO, O.T. et al. Incidência e severidade da ferrugem em clones de cana-de-açúcar no estado do Paraná. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 36(3):159-163, 2006.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v.38, p.166-171, 2013a.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Inheritance of resistance to orange rust (*Puccinia kuehnii*) in sugarcane families from crosses between parents with different orange rust reactions. *Sugar Tech*, New Delhi, v.15, p.379-383, 2013b.
- KLOSOWSKI, A.C. et al. Reação de cultivares e época de avaliação da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Bioscience Journal* 31: 489–498, 2015.
- LI, W.F. et al. Molecular detection of Bru1 gene and identification of brown rust resistance in chinese sugarcane germplasm. *Sugar Tech*, 19(2): 183-190, 2016.
- MACIEL, L.N.; DANELLI, A.L.D. Resistência genética de plantas a fungos. In: Dallagnol, L.J. (Org.). Resistência Genética de Plantas Patógenos. Pelotas: Editora UFPEL, 2018. P. 359-393.

- MAGAREY, R.C. et al. Orange rust, a major pathogen affecting crops of Q124 in Queensland in 2000. Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technology, v.23, p.274-280, 2001.
- MCCORD, P.; GLYNN, N.; COMSTOCK, J. Identifying markers for resistance to sugarcane orange rust (*Puccinia kuehnii*) via selective genotyping and capture sequencing. Euphytica 215: 150, 2019.
- MINCHIO, C.A, FANTIN, L.H, OLIVEIRA K.B, ROCHA J.A, CANTERI M. Morphological changes of the Urediniospore of *Puccinia kuehnii* germ tube in function of temperature. Agronomy Science Biotechnology 3:19–24, 2017.
- MORAIS, L.L. et al. Breeding of sugarcane. In Industrial crops: Breeding for bioenergy and bioproducts, eds. Von Mark V. Cruz, and David A. Dierig, 2015, p. 29–42.
- PARCO, A.S. et al. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene Bru1 and implications for the Louisiana sugarcane breeding program. Plant Breeding, Berlin, 3(4):1-6, 2014.
- RABOIN, L.M. et al. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using biparental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. Theoretical and Applied Genetics, New York, 112:1382-1391, 2006.
- RACEDO, J. et al. Bru1 gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. Euphytica, Wageningen, 191(4):429-436, 2013.
- RAMDOYAL, K. et al. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. Theoretical and Applied Genetics 100: 557–563, 2000.
- RYAN, C. C.; EGAN, B. T. Rust. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE JUNIOR, A. G.; HUGHES, C. G. **Diseases of sugarcane**. Amsterdam: Elsevier, p. 189-210, 1989.
- SANTOS, H.G. et al. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília, EMBRAPA, 353p, 2013.
- SHANER, G.; Finney, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox wheat. Phytopathology 67: 1051–1056, 1977.
- TAI, P.Y.P.; MILLER, J.D.; DEAN, J.L. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. Field Crops Research, 4:261-268, 1981.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR. IN: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 4th ed. Ouro Fino—MG: Agrônômica Ceres, 2, 219–231, 2016.

VALERIANO, T.T.B.; ROLIM, G.S.; MANICI, L.M.; GIUSTARINI, L.; BREGAGLIO, S. A process-based model to simulate sugarcane orange rust severity from weather data in Southern Brazil. *International Journal of Biometeorology*, 65:2037–2051, 2021.

YANG, X. et al. Identifying quantitative trait loci (QTLs) and developing diagnostic markers linked to orange rust resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Frontiers in Plant Science* 9: 350, 2018.

YANG, X. et al. Genome-Wide association studies identified resistance loci to orange rust and yellow leaf virus diseases in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Phytopathology*, v.109, n.4, p. 623-631, 2019.

ZHANG, R.Y. et al. Genetic analysis of sugarcane brown rust resistance genes in wild sugarcane germplasm *Erianthus rockii* 'Yundian 95-19' and *Erianthus rockii* 'Yundian 95-20'. *Plant Genetic Resources*, 17(5):460-463, 2019.

ZHAO, D, GLYNN, N.C, GLAZ, B, COMSTOCK, J.C, SOOD, S. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease*. 95(6):640-647, 2011. doi: 10.1094/PDIS-10-10-0762.