

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAFAEL FÁVERO PEIXOTO JÚNIOR

**Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites
para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem
marrom em cana-de-açúcar**

Piracicaba

2011

RAFAEL FÁVERO PEIXOTO JÚNIOR

**Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites
para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem
marrom em cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Centro Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

**Piracicaba
2011**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Peixoto Júnior, Rafael Fávero

Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem marrom em cana-de-açúcar / Rafael Fávero Peixoto Júnior; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2011.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Basidiomycota 2. Diversidade genética 3. Ferrugem (Doença de planta)
4. Fitopatologia 5. Marcador molecular 6. Resistência genética vegetal I. Título

CDU 575.17:582.284

A minha querida mãe Rosa e as
minhas irmãs Claudinéia e Ioni,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho;

À Dra. Silvana Creste, pela co-orientação e por acreditar na minha capacidade, me ofereceu a oportunidade e as condições necessárias para desenvolvimento deste trabalho;

À FAPESP pela bolsa de estudo e financiamento do projeto através do BIOEn;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e ao Centro de Cana – IAC pela oportunidade oferecida;

À Dra. Luciana Rossini e ao Dr. Álvaro Sanguino, pela colaboração nas análises dos resultados e discussões científicas;

Aos técnicos do LAMP, Eduardo Fonseca, Myrian Raquel e Wlamir Godoy pelo apoio técnico;

Aos colegas de pós-graduação do LAMP, pelas trocas de experiências acadêmicas;

A bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei pela disponibilidade e ajuda;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Cana, especialmente a Thaís Fávero pela imensa colaboração e amizade durante o período de desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos Fernanda Raquel e Thiago Mezette, pela amizade verdadeira e cumplicidade tanto nos bons momentos quanto nos ruins;

Aos amigos de república, Diogo Henrique, Mateus Tercete, Osvaldo Pereira e Tales Costa e Silva, pela paciência e troca de experiências;

Aos amigos de Ribeirão Preto, Fábio Pio e Livia Montaldi pelos momentos de reflexão e discussão fundamentais no aprimoramento das minhas idéias;

Aos amigos de Alfenas, que mesmo distantes sempre estiveram presentes contribuindo com palavras de incentivo e perseverança;

A todos os funcionários, estagiários e pesquisadores do CENA e do Centro de Cana que de alguma forma contribuíram para a minha formação e realização deste projeto;

A minha família: Rosa minha mãe, Claudinéia e Ioni minhas irmãs e João e Luis meus cunhados, pelo amor incondicional e apoio;

E finalmente a todos que direta ou indiretamente exerceram contribuições no desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

PEIXOTO JÚNIOR, R. F. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *Puccinia melanocephala*, agente causador da ferrugem marrom em cana-de-açúcar.** 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Entre as doenças que trazem preocupações e podem causar prejuízos no setor canavieiro em todo o Brasil, destaca-se a ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* H. & P. Sydow. Essa doença ocorre em todas as regiões canavieiras do mundo, desde a Ásia e a África, de onde o complexo "*Sacharum* spp." é originário, até as Américas e Oceania. No Brasil, a ferrugem foi detectada, pela primeira vez em 1986, no município de Capivari-SP e logo em seguida em Pernambuco e Alagoas. Desde o primeiro surgimento no Brasil, a ferrugem tem sido mantida sob controle, com grande parte das cultivares apresentando resistência. O conhecimento acerca da estrutura populacional de *P. melanocephala* é necessário para desenvolver estratégias satisfatórias no controle desta doença e no desenvolvimento de cultivares resistentes. A variabilidade genética entre isolados pode ser avaliada por meio de marcador molecular microssatélite e os dados podem ser usados para monitorar as populações do patógeno. Este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio do desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida em locos de microssatélites, a variabilidade genética entre isolados de *P. melanocephala* bem como avaliar a patogenicidade de isolados de diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar. Primeiramente, os 44 isolados de ferrugem da cana foram identificados por microscopia utilizando estruturas morfológicas dos uredinósporos. Desse total, 34 foram identificadas como *P. melanocephala* e 10 como *Puccinia kuehni*. Por meio da construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites foram desenvolvidos 21 locos para ferrugem marrom, e desse total, 16 apresentaram ampliações satisfatórias e somente quatro foram polimórficos. A variabilidade genética dos isolados de *P. melanocephala* foi relativamente alta ($H_T = 0,650$). A análise de agrupamento não permitiu a separação dos isolados de *P. melanocephala* de acordo com sua região de origem. Os índices de diversidade ($D_{ST} = -0,039$) e divergência ($G_{ST} = -0,061$) genética observados sugerem que a variabilidade genética está igualmente distribuída nas regiões estudadas, ocorrendo uma única população heterogênea. As regiões de origem dos isolados utilizadas para avaliação de patogenicidade não apresentaram variações significativas na agressividade. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que o melhoramento genético da cana-de-açúcar para resistência a ferrugem marrom deve ser conduzido em locais com clima favorável a ocorrência do patógeno, que possivelmente representam a diversidade genética presente em diferentes regiões de cultivo.

Palavras-chave: *Puccinia melanocephala*. Ferrugem marrom. Cana-de-açúcar. Marcador molecular. Microssatélite. SSR. Diversidade genética.

ABSTRACT

PEIXOTO JÚNIOR, R. F. **Development and characterization of microsatellite markers for *Puccinia melanocephala*, causal agent of sugarcane Brown rust.** 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Among the diseases that bring concerns and can cause losses in the sugarcane industry in Brazil, stands out the brown rust, caused by the fungus *Puccinia melanocephala* H. & P. Sydow. This disease occurs in all sugarcane regions of the world, from Asia and Africa, where the complex "Sacharum spp." originates, to the Americas and Oceania. In Brazil, the rust was detected for the first time in 1986 in the region of Capivari-SP and soon after in the Pernambuco and Alagoas. Since the first appearance in Brazil, the rust has been brought under control, with most of the cultivars showing resistance. The knowledge about the population structure of *P. melanocephala* is necessary to develop suitable strategies to control this disease and the development of resistant cultivars. The genetic variability between isolates can be assessed by means of microsatellite molecular markers and data can be used to monitor populations of the pathogen. The aim of this work was to develop a library enriched for microsatellite loci in *P. melanocephala* and assessment of pathogenicity of isolates from three different sugarcane regions producing. First, the 44 sugarcane rust isolates were identified by microscopy using morphological structures of urediniospores. Of this total, 34 were identified as *P. melanocephala* and 10 as *P. kuehni*. Through the construction of the library enriched with microsatellite loci were developed 21 loci brown rust of those, 16 had satisfactory PCR amplifications and only four were polymorphic. The genetic variability of isolates of *P. melanocephala* was relatively high ($H_T = 0.650$). The cluster analysis did not allow the separation of isolates of *P. melanocephala* according to their region of origin. The index of the genetic diversity ($D_{ST} = -0.039$) and genetic divergence ($G_{ST} = -0.061$) suggest that genetic variability is equally distributed in the regions studied, occurring only a heterogeneous population. The regions of origin of isolates used for pathogenicity assessment did not show significant variations in aggressiveness. The results obtained in this work show that the genetic improvement of sugarcane for resistance to brown rust should be conducted in areas with favorable weather for the occurrence of the pathogen, which may represent the genetic diversity present in different sugarcane regions.

Keywords: *Puccinia melanocephala*. Brown rust. Sugarcane. Molecular marker. Microsatellite. SSR. Genetic diversity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 Ferrugem marrom – <i>Puccinia melanocephala</i>	12
2.2 Ferrugem marrom e o melhoramento genético de cana-de-açúcar.....	16
2.3 Variabilidade genética de fitopatógenos.....	17
2.3.1 Mecanismos de variabilidade genética em fungos.....	18
2.3.2 Variabilidade genética em <i>P. melanocephala</i>	20
2.4 Marcadores moleculares do tipo Microsatélites.....	21
3 OBJETIVOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Coleta e identificação dos isolados de ferrugem.....	25
4.2 Biblioteca enriquecida com locos microsatélites.....	25
4.2.1 Extração de DNA.....	25
4.2.2 Construção da biblioteca.....	27
4.2.3 Sequenciamento dos insertos.....	30
4.2.4 Construção dos primers.....	32
4.3 Caracterização dos locos microsatélites.....	33
4.3.1 Extração de DNA dos isolados.....	33
4.3.2 Otimização e amplificação dos locos microsatélites.....	33
4.3.3 Avaliação dos locos microsatélites.....	34
4.3.4 Análise dos locos microsatélites.....	34
4.4 Caracterização da variabilidade patogênica de <i>P. melanocephala</i>	35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Coleta e identificação dos isolados de ferrugem	38
5.2 Biblioteca enriquecida com locos microsatélite.....	40
5.2.1 Análise das sequências	41
5.2.2 Caracterização dos locos microsatélites.....	45
5.2.3 Diversidade genética de <i>P. melanocephala</i>	48
5.3 Caracterização da variabilidade patogênica de <i>P. melanocephala</i>	52
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE	63

1 INTRODUÇÃO

Entre as doenças que podem trazer prejuízos no setor canavieiro em todo o Brasil destaca-se a ferrugem marrom causada pelo basidiomiceto *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd. A ferrugem marrom ocorre em todas as regiões canavieiras do mundo, desde a África e Ásia, de onde o complexo *Sacharum* spp. é originário, até as Américas e Oceania. No Brasil, ela foi detectada, pela primeira vez, em 1986, no Município de Capivari - São Paulo e logo em seguida nos estados de Pernambuco e Alagoas.

Atualmente, o estado de São Paulo é responsável por 60,9% da produção de cana-de-açúcar no Brasil (safra 2008/2009). O restante da produção (39,1%), exceto Acre e Santa Catarina, está distribuído nos outros estados brasileiros com destaque para Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (ÚNICA, 2011).

Basicamente, o controle é feito com plantio de cultivares resistentes, pois, o uso de fungicidas não é viável economicamente, além de não ser ambientalmente favorável (RYAN; EGAN, 1989). Variedades intermediárias e até as suscetíveis podem ser plantadas no Brasil, desde que estejam em áreas de escape do patógeno (FIGUEIREDO, 2001).

No Brasil, ainda não foi relatado claramente a existência de raças de *P. melanocephala*. Recentemente, Rago (2005) observou uma maior agressividade de isolados de *P. melanocephala* coletadas em Jaú-SP. Entretanto, em outros países, já foram feitos estudos sobre a sua variabilidade. Shine, Comstock e Dean (2005) relataram a existência de 4 raças do patógeno em Louisiana, Estados Unidos. Entretanto, Taylor (1992) descreveu a ausência de raças desse fungo na Austrália. O entendimento da diversidade genética deste fungo e os processos que afetam sua mudança são importantes para desenvolver estratégias satisfatórias no controle desta doença e no desenvolvimento de cultivares resistentes.

O uso de marcadores de DNA, na análise da dinâmica de patógenos de plantas, provém de seus altos níveis de precisão e está revolucionando a análise da diversidade genética de fitopatógenos (MILGROOM; FRY, 2003). Sequências simples repetidas (SSR) ou microssatélites são sequências relativamente abundantes em microrganismos e estão distribuídas por todo o genoma (WEISING et al., 1995). Podem ser usados para mapeamento genômico, estudos de diversidade genética, evolucionários e de populações, assim como análises de *fingerprinting* e *pedigree* (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). O conteúdo de informação de locos SSR é alto justamente por se tratar de sequências de alta taxa evolutiva. Quanto à acessibilidade, apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de *primers* informativos, que serão utilizados na reação da

PCR para amplificar alelos de cada loco. No entanto, uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (BUSO, 1998).

Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é cultivada em grandes extensões e, portanto, sujeita às mais variadas combinações entre populações de *P. melanocephala* e condições edafoclimáticas, torna-se extremamente importante conhecer o grau de diversidade genética deste patógeno. Essa informação é de fundamental importância para que os programas de melhoramento não corram o risco de lançarem cultivares consideradas resistentes e que, na presença de variantes mais agressivos do patógeno, se comportem como suscetível. Desta maneira, se faz necessário o conhecimento da diversidade genética de *P. melanocephala* nas principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ferrugem marrom – *Puccinia melanocephala*

Entre as doenças que trazem preocupações e podem trazer prejuízos no setor canavieiro em todo o Brasil destaca-se a ferrugem marrom causada pelo basidiomiceto *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd., ordem *Uredinales* e família *Pucciniaceae*. A *P. melanocephala* é originária da Ásia, e foi descrita primeiramente na Índia em 1907 (Figura 1) em *Erianthus ravennae* (CUMMINS, 1971; SATHE, 1971). Posteriormente, foi observada em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em 1949, mas sendo classificada como *Puccinia erianthi* Padw. & Khan. (EGAN, 1979). Mais tarde os dois fungos foram reconhecidos como sendo o mesmo organismo e os dois nomes considerados sinônimos. Porém, *melanocephala* recebeu maior prioridade do que *erianthi* (CUMMINS, 1971; EGAN, 1979).

Basicamente, a ferrugem ocorre em todas as regiões canavieiras do mundo, desde a África e Ásia, de onde o complexo *Saccharum* spp. é originário, até as Américas e Oceania. Em julho de 1978, *P. melanocephala* foi identificada na República Dominicana, marcando o início da epidemia nas Américas. Acredita-se que a ferrugem marrom chegou até as Américas via correntes de ventos vindos de Camarões na África, a fonte de inóculo mais próxima. Até 1978, este fungo estava presente em locais dispersos na África e na Ásia se manifestando em áreas localizadas, não apresentando danos significativos (PURDY; LIU; DEAN, 1983). Somente em 1978, quando introduzida no Caribe foi considerada realmente uma doença de importância econômica (RALOFF, 2001). Neste mesmo ano, a ferrugem marrom foi detectada em Queensland, Austrália, espalhando-se rapidamente em todas as áreas de cultivo de cana-de-açúcar, afetando severamente as principais variedades cultivadas (TAYLOR, 1992). O motivo da chegada da ferrugem marrom na Austrália pode ser atribuída a capacidade dos ventos das monções, através do oceano Índico, terem carregado inóculos de uma fonte próxima (WHITTLE; HOLDER, 1980). Em 2007, o patógeno foi detectado na Etiópia (KELLY et al., 2009). No Brasil, a ferrugem foi detectada, pela primeira vez, em 1986, no Município de Capivari - São Paulo e logo em seguida nos estados de Pernambuco e Alagoas.

Atualmente, o estado de São Paulo é responsável por 60,9% da produção de cana-de-açúcar no Brasil (safra 2008/2009). O restante da produção (39,1%), exceto Acre e Santa Catarina, está distribuído nos outros estados brasileiros com destaque para Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (ÚNICA, 2011).

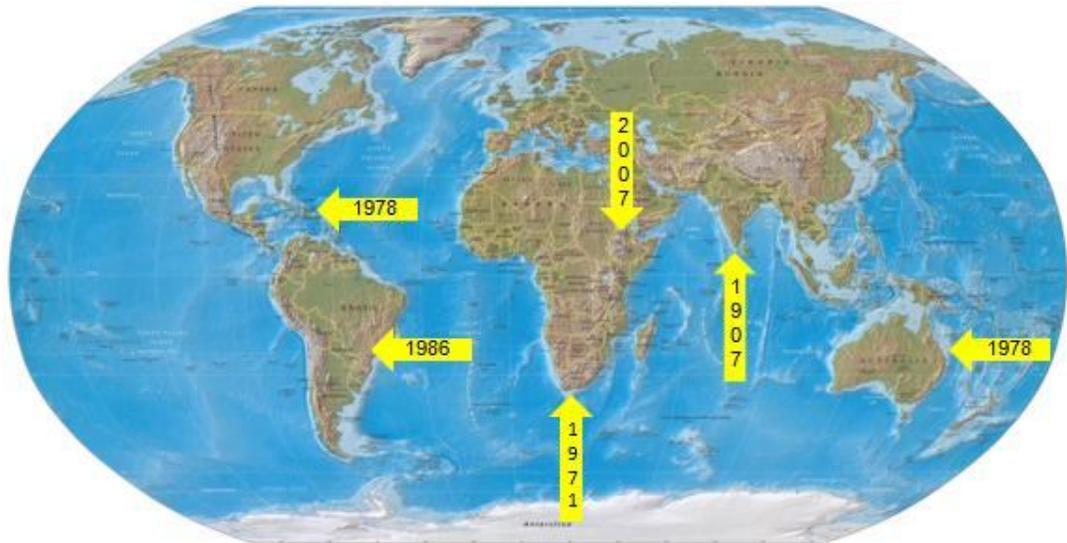


Figura 1 – Distribuição mundial de ferrugem marrom. As setas indicam o ano em que a ferrugem marrom foi detectada no país

A ferrugem marrom pode causar uma série de danos em cana-de-açúcar, bem como em outras plantas do gênero *Saccharum* chegando a causar a morte de plantas jovens. Entretanto, ela interfere mais frequentemente nas folhas, no crescimento das raízes e na taxa de fotossíntese, gerando um aumento na taxa de respiração e dificuldade de translocação de metabólitos nas folhas infectadas (AGRIOS, 2005). Em variedades susceptíveis, há redução do tamanho e do diâmetro do colmo, redução da quantidade de perfilhos, comprometendo a produção final de biomassa (PURDY; LIU; DEAN, 1983; RAID; COMSTOCK, 2009).

Recentemente, em dezembro de 2009, foi constatada na região de Araraquara - São Paulo, a ocorrência de ferrugem alaranjada. Atualmente esta doença já está disseminada em diversos municípios de São Paulo e também em alguns locais do Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Goiás e Minas Gerais (BARBASSO, 2010). A ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler, e assim como em outras ferrugens, é um fungo biotrófico. *P. kuehnii* infecta plantas do gênero *Saccharum*, sendo hospedeiras deste fungo as espécies *S. arundinaceum*, *S. nargenga*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. munja*, *S. edule*, *S. bengalense* e *Sclerostachya fusca*. Outras ferrugens que podem infectar a cana-de-açúcar é a *Puccinia pugiensis* (Tai) e *Puccinia miscanthi* (Miura) (SIVANESAN; WALLER¹, 1986 apud RAMOUTHAR, 2009, p. 7). Entretanto, as principais ferrugens que podem infectar a cana-de-açúcar e que representam importância econômica para a cultura são *P. melanocephala* e *P. kuehnii* somente (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001a).

¹ SIVANESA, A.; WALLER, J.M. **Sugarcane diseases**. CAB International, 1986.

A ferrugem marrom e a ferrugem alaranjada podem ser distinguidas pelo formato das pústulas, coloração e ornamentação dos esporos, distribuição das lesões nas folhas e também por marcadores moleculares (PURDY; LIU; DEAN, 1983; VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001b). No campo, a primeira característica importante a ser observada é a idade das plantas e distribuição das lesões nas folhas, uma vez que a ferrugem marrom ocorre principalmente em plantas jovens, com idade de 2 a 6 meses, apresentando lesões no terço médio posterior das folhas. Já a ferrugem alaranjada pode ocorrer na planta em qualquer fase do seu desenvolvimento, apresentando lesões em toda superfície foliar. A ferrugem marrom apresenta pústulas marrom escuro, estreitas e alongadas, enquanto que as pústulas da ferrugem alaranjada são alaranjado claro, arredondadas e curtas (GLYNN et al., 2010). Os urediniósporos das duas ferrugens possuem estruturas morfológicas particulares que permitem a identificação das espécies por microscopia. Os urediniósporos de *P. melanocephala* são elípticos com parede celular uniforme em espessura e são de coloração marrom escuro. Os urediniósporos de *P. kuehnii* são normalmente ovóides ou piriformes, e alguns dos esporos têm em sua parte apical um espessamento da parede celular, e a coloração costuma variar de amarelo dourado a alaranjado (DIXON et al., 2010; VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001b; MORDUE, 1985). Os urediniósporos de ferrugem marrom visualizados sob microscópio eletrônico apresentaram as extremidades das paredes muito equinuladas e com agrupamento de espinhos. Já as extremidades das paredes de ferrugem alaranjada são parcialmente equinuladas e sem agrupamentos de espinhos (MURDUE, 1985). Utilizando *primers* específicos para regiões conservadas dos genes 18S e 28S, Glynn e Comstock (2007) conseguiram distinguir *P. melanocephala* de *P. kuehnii* através de PCR em tempo real, identificando os patógenos antes mesmo do desenvolvimento dos sintomas. Virtudazo, Nojima e Kakishima (2001a) identificaram sequências da região D1/D2 do LSU rDNA como tamanhos diferentes, sendo que as sequências de *P. melanocephala* apresentaram 608 pb e as de *P. kuehnii* 620 pb, possibilitando a diferenciação entre as duas ferrugens.

A ferrugem marrom é favorecida por temperaturas amenas a não muito altas (17 a 30°C) e alta umidade relativa (acima de 70%). O curto ciclo de vida do fungo permite o desenvolvimento rápido de epidemias e dentro de 5 a 6 semanas, e a cultura, de aspecto inicialmente verde, se torna avermelhada devido à formação maciça de pústulas na superfície abaxial das folhas (RYAN; EGAN, 1989). Inicialmente são formadas manchas alongadas e amareladas, paralelas às nervuras que vão aumentando de tamanho e adquirindo coloração vermelho-castanho, devida à formação de urédias. Com o rompimento das urédias, há a formação de pústulas, sintoma típico das ferrugens. Em variedades muito susceptíveis, as pústulas agrupam-se, formando placas de tecido necrosado. Quando as

pústulas coalescem, há uma necrose dos tecidos, geralmente, nas folhas mais baixas, prejudicando o crescimento e conseqüentemente, a produção de cana-de-açúcar (SACILOTO, 2003).

Tanto urediniósporos como teliósporos de *P. melanocephala* foram identificados e descritos em cana-de-açúcar. Porém, urediniósporos são mais comuns e geralmente estão presentes ao longo do período de infecção, enquanto que os teliósporos são normalmente encontrados no final do período de infecção quando as lesões estão muito escuras. Basidiósporos também foram encontrados, mas não possuem capacidade de iniciar uma infecção em cana-de-açúcar. Como o hospedeiro intermediário e o estágio aecial ainda não são conhecidos, supõe-se que o ciclo da doença se interrompa nesse ponto (PURDY; LIU; DEAN, 1983).

O desenvolvimento da ferrugem marrom depende de uma sequência de eventos que começa com a germinação dos urediniósporos e termina com o estabelecimento do fungo em plantas suscetíveis. O ciclo da doença é marcado pela germinação de um urediniósporo, que desenvolve um tubo germinativo com tamanho variável. Quando o tubo germinativo entra em contato com um estômato, ocorre a formação de apressório (Figura 2). Após a formação do apressório sobre o estômato, é formado um pequeno *peg* de infecção que entra na folha através da abertura estomática. A penetração direta do fungo na folha, sem a passagem pelo estômato, não tem sido observada. O *peg* de infecção, após passar pelas células-guarda, forma uma vesícula que pode ocupar toda a cavidade subestomática. A vesícula subestomática por sua vez, desenvolve de duas a quatro hifas infectivas que colonizam e começam a se desenvolver no mesófilo foliar (PURDY; LIU; DEAN, 1983). A ponta da hifa infectiva se torna septada, originando uma estrutura chamada de célula mãe do haustório que se posiciona ao lado da parede celular de uma célula do mesófilo. A parede celular da célula é penetrada e ocorre a formação do haustório. Os haustórios de *P. melanocephala* se diferem de outros haustórios de *Puccinia* spp por possuírem vários lobos dispostos como os dedos de uma mão. Os haustórios se desenvolvem cerca de 36 horas após a infecção (SOTOMAYOR; PURDY; TRESE, 1983). Um urediniósporo sob condições favoráveis em contato com uma folha pode infectar e desenvolver uma pústula em menos de 14 dias (PURDY; LIU; DEAN, 1983).

Os urediniósporos, estruturas responsáveis pela disseminação e infecção da doença, são facilmente dispersos pelo transporte dos ventos e respingos de chuva, e a grandes distâncias, por meio de toletes contaminados. Este último caso pode ter gerado a introdução da ferrugem marrom no Brasil, pois, há mais de 30 anos ocorre a importação de genótipos asiáticos de cana para plantio e melhoramento nas Américas (RAGO, 2005).

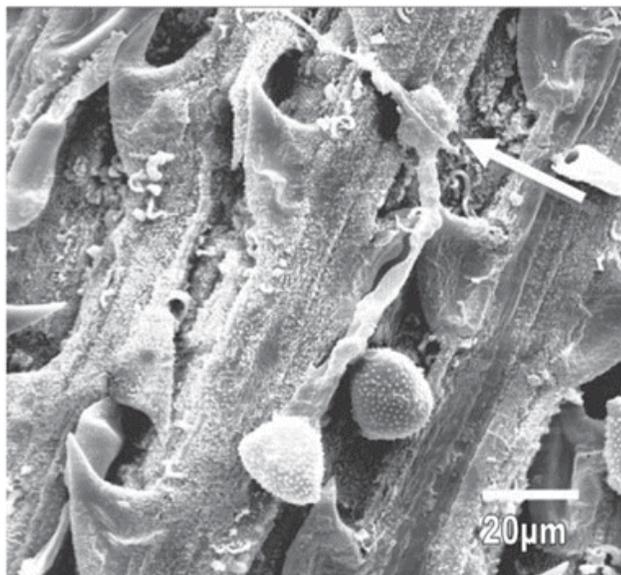


Figura 2 – Urediniósporo de *P. melanocephala* com tubo germinativo e apressório (seta) sobre folha de cana-de-açúcar observada ao microscópio eletrônico de varredura (GARCIA et al., 2007).

2.2 Ferrugem marrom e o melhoramento genético de cana-de-açúcar

Desde o primeiro surgimento no Brasil em 1986 (TOKESHI; RAGO, 2005), a ferrugem tem sido mantida sob controle, com grande parte das cultivares apresentando resistência, encontrados nas áreas tradicionais de cultivo. Entretanto, o surgimento da ferrugem tem sido relatado em regiões não tradicionais como, por exemplo, no oeste da Bahia e no estado de Goiás.

Os resultados obtidos em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil mostraram a existência de cultivares suscetíveis a *P. melanocephala* como 'IAC91 5155', 'SP84 1431' e 'SP79 1011'; intermediárias como 'IAC86 2480', 'RB83 5486' e 'SP70 1143' e cultivares resistentes, como 'RB72 454', 'IACSP94 2094' e 'SP84 2025'.

A resistência à ferrugem pode ser avaliada nos estágios iniciais de seleção, e com uma reavaliação no final. Entretanto, algumas cultivares que se apresentavam como resistentes, podem apresentar um comportamento fora do padrão esperado dependendo da época ou local de cultivo. Um exemplo é a cultivar 'RB83 5486', lançada como resistente, mas atualmente em São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais vem sofrendo severos ataques de ferrugem sendo avaliada como intermediária ou susceptível. Já a cultivar 'NA56 79' considerada como resistente em Pernambuco, apresenta grande susceptibilidade no

Espírito Santo e a cultivar 'SP79 1011' é considerada susceptível na região Centro-Sul e resistente na região Nordeste (SANTOS, 2010).

Segundo Saciloto (2003) todas as novas cultivares, antes de lançadas no mercado para os produtores, deveriam ser submetidas a testes de resistência à ferrugem. No entanto, esse procedimento é trabalhoso, demorado e de custo considerado, sendo que os programas de melhoramento, em geral, realizam a seleção de clones resistentes aproveitando-se da infestação natural em campo.

Alguns programas de melhoramento genético, aliados a estudos moleculares tem buscado marcas genéticas relacionadas à resistência de plantas visando o desenvolvimento de variedades resistentes por melhoramento assistido. Em cana-de-açúcar, através da construção de mapas genéticos, genes de resistência a ferrugem foram identificados. Asnaghi et al. (2001) e Daugrois et al. (1996) detectaram a presença de um gene capaz de condicionar resistência da cultivar de cana-de-açúcar 'R570' aos isolados de *P. melanocephala* oriundos de diversas regiões geográficas, demonstrando assim, a possibilidade do cultivo desses genótipos em vários locais.

No Brasil, é possível plantar cultivares moderadamente resistentes e até as suscetíveis, desde que, estejam em áreas de escape do patógeno, com ambiente desfavorável ao seu desenvolvimento (FIGUEIREDO, 2001). Liu (1980) afirmou que a ação de fungicida por si só não é capaz de controlar o patógeno. Basicamente, o controle da doença é feito com uma gestão de plantio de cultivares resistentes, pois, o uso de fungicidas não é prático e nem econômico, além de causar impacto ambiental (RYAN; EGAN, 1989).

A expansão do cultivo de cana-de-açúcar em regiões não tradicionais, com ambientes propensos à secas (regiões Central e Nordeste do Brasil), juntamente com um importante crescimento da colheita mecânica (com ausência de queimadas), tende a favorecer o aparecimento de novos patógenos e/ou o reaparecimento de doenças há muito tempo mantidas sob controle. Neste caso, os programas de melhoramento genético precisam estar atentos as informações sobre a existência da diversidade genética dos patógenos.

2.3 Variabilidade genética de fitopatógenos

Populações de fitopatógenos podem sofrer alterações em resposta aos genes de resistência presentes nos hospedeiros, como descrito por Robinson (1976) em interações de plantas com vírus, bactérias, nematóides e insetos. Estas interações são determinadas por relações coevolutivas, marcadas por íntimas relações geneticamente controladas entre

patógenos e hospedeiros. Assim, modificações genéticas na população de um dos componentes podem ser acompanhadas por modificações genéticas na população do outro (CAMARGO, 1995). O patógeno possui mecanismos estruturais e/ou bioquímicos para atacar um hospedeiro em potencial, enquanto este último, por meio de outros mecanismos também estruturais e/ou bioquímicos, procura defender-se do patógeno (PASCHOLATI et al., 1998). Estas interações podem ser entendidas como uma luta entre dois organismos (patógeno-hospedeiro) pela sobrevivência. A variabilidade genética tanto no patógeno como do hospedeiro permite que novos níveis de interações entre esses organismos possam ser gerados.

2.3.1 Mecanismos de variabilidade genética em fungos

Mutação

A mutação é a mais importante fonte de variabilidade genética em fungos fitopatogênicos (CASELA; GUIMARÃES, 1996) e o principal mecanismo gerador de novos genes (CAMARGO, 1995). A ocorrência de mutações é devida a erros na duplicação cromossômica tanto na meiose (reprodução sexuada), quanto na mitose (reprodução assexuada), ambas presentes em fungos (CAMARGO, 1995). As mutações podem também ser classificadas em mutações gênicas ou cromossômicas. Existem várias causas que podem provocar tais mutações, porém, todas afetam a sequência de bases nitrogenadas do DNA. As mutações gênicas podem ser classificadas como: substituição, deleção, adição de um ou mais nucleotídeos e inversão de um ou mais segmentos de DNA. As mutações cromossômicas correspondem a quebra de fragmentos cromossômicos e podem ser deleções de segmentos, inserções e duplicações, inversões e translocações, ocorrendo a troca de segmentos entre cromossomos não homólogos (PASSAGLIA, 2003).

Recombinação meiótica ou reprodução sexuada

A recombinação meiótica é o principal processo amplificador da variabilidade genética em populações de fungos fitopatogênicos, pela capacidade de gerar novas combinações genéticas e promover a quebra de combinações já existentes (CASELA; GUIMARÃES, 1996). Na reprodução sexuada de fungos, existem dois sistemas de ciclo sexual distintos, o heterotálico e o homotálico. No sistema heterotálico, os cruzamentos ocorrem entre indivíduos de grupos de reação sexual diferentes, definidos por genes de

compatibilidade. Já o sistema homotálico, os cruzamentos ocorrem entre quaisquer indivíduos (CAMARGO, 1995).

Recombinação parassexual

A recombinação parassexual representa uma alternativa à reprodução sexual, não sendo frequente na natureza. Este processo ocorre em fungos imperfeitos que não apresentam o ciclo sexuado, e consiste basicamente na fusão de hifas e em seguida a formação de um núcleo diplóide pela fusão ao acaso de dois núcleos haplóides, seguido de *crossing over* mitótico (CASELA; GUIMARÃES, 1996). Ainda que seja infrequente o ciclo parassexual, em comparação com o ciclo sexual, o processo pode ser significativo para a evolução dos fungos assexuados (DAVIS et al., 2005).

Herança citoplasmática

A herança citoplasmática ocorre quando dois citoplasmas se fundem (ciclos sexual e parassexual). Este processo é uma importante fonte de variabilidade em fungos fitopatogênicos, visto que há presença de genes determinantes de patogenicidade/virulência nas organelas do citoplasma (CAMARGO, 1995) e pela ocorrência de RNA de fita dupla com atividade genética (CASELA; GUIMARÃES, 1996). Na fusão de dois citoplasmas, há novas combinações de núcleos e citoplasmas podendo resultar em combinações inéditas de genomas contendo genes determinantes de patogenicidade ou virulência.

Heterocariose

A heterocariose consiste na coexistência de dois núcleos geneticamente distintos em uma única hifa (CAMARGO, 1995). Em fungos fitopatogênicos, este processo pode também ocorrer em virtude de anastomoses entre células vegetativas de linhagens geneticamente diferentes, suplementando ou mesmo substituindo a reprodução sexual. Em heterocários, a unidade de recombinação e segregação são os núcleos e não os genes. Quando duas células heterocarióticas se unem para posterior divisão, as possibilidades de diferentes combinações são bastante reduzidas se comparadas às possíveis combinações de genes. As ferrugens e carvões possuem estabilidade da heterocariose, entretanto esta pode variar conforme a classe do fungo. Os basidiomicetos conservam sua condição heterocariótica, sendo que a capacidade de dissociação em componentes homocarióticos é bastante limitada (ALEXOPOULOS, 1996).

Transposons

Transposons são elementos genéticos móveis capazes de mudar de posição dentro do genoma, independentemente de homologia entre a região genômica onde se encontram inseridos e o local ao qual se destinam (CASELA; GUIMARÃES, 1996). O deslocamento dessas sequências móveis afeta largamente células e organismos, alterando a organização estrutural do genoma. Os transposons podem modificar a estrutura e a função de um determinado gene, causando mutação, deleções, duplicações e inversões pela inserção ou excisão de fragmentos, muitas vezes anulando sua função ou em alguns casos aumentando sua expressão. Os fragmentos transponíveis possuem um importante papel na evolução, pois, através da reorganização estrutural do genoma, fornecem variabilidade genética para as populações que por sua vez servem como alternativas adaptativas (REGNER, 2003).

2.3.2 Variabilidade genética em *P. melanocephala*

No Brasil, ainda não foi relatado claramente à existência de raças de *P. melanocephala*. Recentemente, Rago (2005) relatou a necessidade de estudos mais específicos, com isolados monopustulares, para investigar com maior critério a existência de raças fisiológicas de *P. melanocephala*. Em seu estudo, ele demonstrou que há variabilidade na agressividade de isolados coletados em três regiões (Jaú, Piracicaba e Ribeirão Preto) empregando as cultivares 'SP70 1143', 'SP91 1397' e 'R570', sendo os isolados da região de Jaú caracterizados como mais agressivos.

Porém, em outros países há relatos conflitantes para diferenças na agressividade entre isolados coletados em diversas regiões. Taylor (1992) na Austrália descreveu a ausência de raças fisiológicas utilizando inoculações em folhas destacadas de doze cultivares com isolados de *P. melanocephala* coletados durante nove anos em quatro regiões de Queensland. As constantes variações na severidade de ferrugem na Austrália foram atribuídas às mudanças nas condições climáticas, e não ao surgimento de novas raças. Entretanto, nos Estados Unidos, a existência de raças patogênicas foi identificada pela ocorrência de alterações nas reações da doença em uma série de variedades resistentes após alguns anos de seu lançamento. Este estudo sugeriu a existência de pelo menos 4 raças patogênicas, o que indicaria, junto a observações de campo que possíveis variantes patogênicos estariam surgindo em áreas canavieiras (SHINE; COMSTOCK; DEAN, 2005).

Para o sucesso de programas de melhoramento genético é necessário, o conhecimento e a avaliação da diversidade genética e patogênica de ferrugem marrom. Esse conhecimento poderia direcionar estratégias e possíveis investigações em relação a sua interação com uma série diferencial de cultivares, visto que a resistência da cana-de-açúcar à ferrugem pode ser superada por possíveis variantes nas populações do patógeno (RAGO, 2005; TAYLOR, 1992).

2.4 Marcadores moleculares do tipo microssatélites

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso (isoenzima), ou de um segmento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores têm sido utilizados em análise genética de várias maneiras como, por exemplo, na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, na estimativa de diversidade, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003). Devido a grandes avanços da biologia molecular aliada à genética, uma grande variedade de técnicas para analisar polimorfismos genéticos tem sido disponibilizada (SOUZA, 2001). Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro.

Marcadores moleculares são ferramentas úteis na análise de variação genética em populações de fungos fitopatogênicos. O uso de marcadores de DNA, na análise da dinâmica de patógenos de plantas, provém de níveis de precisão nunca imaginados e está revolucionando a análise de biologia de populações de fitopatógenos (MILGROOM; FRY, 2003).

Microssatélites ou Sequências simples repetidas (SSR) são marcadores moleculares codominantes relativamente abundantes em fitopatógenos eucariotos e estão distribuídas por todo o genoma (WEISING et al., 1995). Os locos SSR consistem de sequências de DNA de unidades mono, di, tri, tetra ou pentanucleotídica repetidas ao acaso, dispersas por todo o genoma (HAMADA et al., 1982). Os microssatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo:

GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGCACACACACACA (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Chambers e Macavoy (2000) sugerem que são necessários para iniciar um processo de origem de um microssatélite, no mínimo oito nucleotídeos repetidos em tandem. Estudos apontam como o principal mecanismo de surgimento e amplificação de SSR, o *slippage* ou o deslizamento da polimerase. Acredita-se que durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e unem-se novamente de forma incorreta. Isto geraria cópias de trechos de DNA com diferentes tamanhos ou números de repetições no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Outro fator pode estar associado ao sistema de reparo pela DNA polimerase ou ainda, ser consequência dos processos de recombinação (SCHLOTTERER; TAUTZ, 1992; FIELD; WILLS, 1996). Durante o processo de recombinação o *crossing-over* desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas sequências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos (SCHLÖTTERER et al., 1998; BHARGAVA; FUENTES, 2010).

As diferenças entre isolados podem ser avaliadas empregando microssatélites e os dados podem ser usados para monitorar a epidemia, a dinâmica populacional e a composição de raças das populações do patógeno. O polimorfismo de locos microssatélites é revelado pela amplificação do DNA total usando um par de *primers* que flanqueiam e definem o locus (LITT; LUTY, 1989). O valor notável desta classe de marcadores resulta da sua natureza multialélica, transmissão co-dominante, fácil detecção por PCR, relativa abundância, extensiva cobertura do genoma e necessidade mínima de DNA para análise genética (JOHANSSON et al., 1992). Eles podem ser usados para mapeamento genômico, estudos evolucionários e de populações, assim como análises de *fingerprinting* (ZANE; BARGELLONI; PARTANELLO, 2002). O conteúdo informático de um locus SSR é bastante alto justamente por se tratar de sequências de alta taxa evolutiva. Quanto à acessibilidade, apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de *primers* informativos, que serão utilizados na reação da PCR para amplificar alelos de cada locus. No entanto, uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (BUSO, 1998). Locus microssatélites têm sido descritos para uma grande variedade de fitopatógenos, como *Phytophthora infestans* (KNAPOVA; GISI, 2002), *Phialophora gregata* (HARRINGTON et al., 2003), *Sclerotinia sclerotiorum* (ATALLAH et al.,

2004); *Ustilago scitaminea* (RABOIN et al., 2007) e *Moniliophthora perniciosa* (SILVA et al., 2008).

Um estudo realizado por Dutech et al., (2007), utilizando 53 bibliotecas enriquecidas em locos microssatélite, revelou que o genoma de fungos apresentam microssatélites em menor quantidade, menos repetições e baixos níveis de polimorfismo se comparado a outros eucariotos. Neste estudo, os autores também identificaram uma correlação entre o baixo número de repetições dos motivos microssatélites com baixos níveis de polimorfismo dos locos. Estas características podem estar associadas a mecanismos específicos de reparo de DNA presentes no genoma dos fungos que limitam o número e o tamanho dos microssatélites (KARAOGLU; LEE; MEYER, 2005).

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos principais o desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida em locos microssatélites para *P. melanocephala* e a avaliação da patogenicidade de isolados de distintas regiões produtoras de cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Isolar e sequenciar locos que contenham regiões microssatélites no genoma de *P. melanocephala*;
- b) Desenhar iniciadores específicos visando à amplificação de locos microssatélites;
- c) Caracterizar cada loco microssatélite isolado com relação ao tipo de repetição, número e tamanhos de alelos amplificados, heterozigosidade esperada e observada;
- d) Estudo preliminar da estrutura de população de *P. melanocephala*;
- e) Avaliar a patogenicidade de isolados de *P. melanocephala* coletados em Jaú (SP), Goianésia (SP) e Ribeirão Preto (SP).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e identificação dos isolados de ferrugem

Segmentos de folhas de cana que apresentavam lesões características de ferrugem foram coletados em diversas regiões produtoras de cana-de-açúcar. As regiões de coleta foram aquelas de atuação do programa de melhoramento genético de cana-de-açúcar do Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Posteriormente no laboratório, os urediniósporos presentes no material coletado foram identificados microscopicamente visando à diferenciação entre ferrugem marrom (*P. melanocephala*) e ferrugem alaranjada (*P. kuehni*) (Tabela 1). Características como a coloração, espessura da parede e ornamentação dos urediniósporos foram utilizados (DIXON et al., 2010; VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001b). Logo em seguida os isolados foram armazenados em freezer -20°C até o momento da extração de DNA.

4.2 Biblioteca enriquecida com locos microssatélites

4.2.1 Extração de DNA

Para a construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites foi utilizado DNA genômico proveniente de urediniósporos de *P. melanocephala* isolados da variedade de cana-de-açúcar 'RB 83 5486' coletados no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas-IAC em Ribeirão Preto, São Paulo. Essa cultivar foi escolhida após um teste de infecção, que a identificou como variedade susceptível apenas a *P. melanocephala*.

Para a extração de DNA genômico total foi empregado o método descrito por Al Janabi et al. (1999), com modificações. Os urediniósporos foram coletados de pústulas presentes na superfície abaxial das folhas com auxílio de bomba de vácuo. Em seguida, foram macerados em nitrogênio líquido usando pistilo e cadinho de porcelana, sendo posteriormente transferidos para 550 µL de tampão de homogeneização [2,2 M NaCl; 2% CTAB; 200 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA; 0,06% Sulfito de sódio], em seguida, foi

Tabela 1 – Relação dos isolados de ferrugem analisados.

Isolado	Patógeno	Cultivar	Local de Coleta	Ano
P201	<i>P. melanocephala</i>	RB85 5486	Pontal, SP	2010
P204	<i>P. melanocephala</i>	SP79 1011	Santa Lúcia, SP	2010
P207	<i>P. melanocephala</i>	IAC84 2480	Mococa, SP	2010
P210	<i>P. melanocephala</i>	SP70 1143	Conchal, SP	2010
P213	<i>P. melanocephala</i>	IAC86 2480	São João da Boa Vista, SP	2010
P217	<i>P. melanocephala</i>	IACSP98 5024	Batatais, SP	2010
P219	<i>P. melanocephala</i>	RB83 5486	Pompeu, MG	2010
P222	<i>P. melanocephala</i>	CTC 11	Lençóis Paulistas, SP	2010
P225	<i>P. melanocephala</i>	IAC84 2480	Itápolis, SP	2010
P228	<i>P. melanocephala</i>	IACSP97 6682	São Joaquim da Barra, SP	2009
P231	<i>P. melanocephala</i>	RB83 5486	Patos de Minas, MG	2010
P234	<i>P. melanocephala</i>	IAC84 2480	Pindorama, SP	2010
P237	<i>P. melanocephala</i>	RB83 5486	Catanduva, SP	2010
P240	<i>P. melanocephala</i>	IACSP95 1218	Santa Lúcia, SP	2010
P243	<i>P. melanocephala</i>	SP79 1011	Olímpia, SP	2010
P246	<i>P. melanocephala</i>	RB 83 5486	Guaíra, SP	2010
P249	<i>P. melanocephala</i>	IAC87 3396	Patos de Minas, MG	2010
P252	<i>P. melanocephala</i>	RB83 5486	Itápolis, SP	2010
P255	<i>P. melanocephala</i>	IAC91 5155	Goianésia, GO	2010
P258	<i>P. melanocephala</i>	IAC91 5155	Jaú, SP	2011
P261	<i>P. melanocephala</i>	IAC97 6682	Goianésia, GO	2011
P264	<i>P. melanocephala</i>	SP79 1011	Goianésia, GO	2010
P267	<i>P. melanocephala</i>	SP70 1143	Goianésia, GO	2010
P270	<i>P. melanocephala</i>	IAC97 6682	Goianésia, GO	2010
P273	<i>P. melanocephala</i>	IAC86 2480	Jaú, SP	2011
P300	<i>P. melanocephala</i>	IAC86 2480	Jaú, SP	2010
P303	<i>P. melanocephala</i>	IAC87 3396	Ribeirão Preto, SP	2010
P306	<i>P. melanocephala</i>	IAC91 5155	Ribeirão Preto, SP	2011
P309	<i>P. melanocephala</i>	IAC86 2480	Ribeirão Preto, SP	2010
P312	<i>P. melanocephala</i>	IAC86 2480	Indiara, GO	2010
P315	<i>P. melanocephala</i>	SP71 6949	São José da Laje, AL	2010
P318	<i>P. melanocephala</i>	SP78 4264	São José da Laje, AL	2010
P321	<i>P. melanocephala</i>	SP86 42	Jaboticabal, SP	2010
P324	<i>P. melanocephala</i>	IACSP03 8145	Orindiuva, SP	2010
P276	<i>P. kuehnii</i>	SP84 2025	Cravinhos, SP	2010
P278	<i>P. kuehnii</i>	IACSP98 5046	Batatais, SP	2010
P279	<i>P. kuehnii</i>	IACSP98 6202	Iracemápolis, SP	2010
P280	<i>P. kuehnii</i>	IACSP99 1305	Iracemápolis, SP	2010
P281	<i>P. kuehnii</i>	SP89 1115	Iracemápolis, SP	2010
P282	<i>P. kuehnii</i>	SP89 1115	Indiara, GO	2010
P283	<i>P. kuehnii</i>	CTC 13	Iracemápolis, SP	2010
P285	<i>P. kuehnii</i>	RB72 454	Iracemápolis, SP	2010
P286	<i>P. kuehnii</i>	RB72 454	Pontal, SP	2010
P287	<i>P. kuehnii</i>	CV Centauro	Araçatuba, SP	2010

adicionado 5 µL de Proteinase K (20mg/mL), 450 µL de tampão de lise [20% CTAB; 10% PVP; 5% N-lauryl-sarcosine] e incubado por 1 h a 65°C. Após a amostra ter sido resfriada a temperatura ambiente, 1 mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado e em seguida, agitado por inversão durante 2 min. A amostra foi centrifugada a 10000 g por 5 min a 4°C. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 1 volume de isopropanol, mais 200 µL de 5 M NaCl. A suspensão foi incubada por 1 h a -20°C e em seguida, centrifugada por 5 min à 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de 70 % etanol. Após centrifugação, por 5 min a 10000 g, o etanol foi descartado e o precipitado seco a 37°C. Finalmente, o DNA foi ressuscitado em 50 µL TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA] contendo 10 µg/mL de RNase por 1 h a 37 °C. A integridade do DNA extraído foi determinada por eletroforese em gel de 0,8% agarose corado com brometo de etídeo (10 µg/mL), e a quantificação obtida comparativamente, a partir de padrões com concentrações conhecidas (DNA do fago λ).

4.2.2 Construção da biblioteca

A metodologia empregada na construção da biblioteca enriquecida com locos microssatélites foi a descrita por Creste et al. (2006) com algumas alterações (Figura 3).

Restrição do DNA

Após a extração de DNA genômico, aproximadamente 5 µg do DNA foram digeridos pela enzima de restrição *RsaI* utilizando 10 unidades da enzima por µg de DNA em um volume final de 100 µL. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas sendo visualizada posteriormente em gel de 1,2% agarose para verificar sua eficiência. O DNA digerido foi precipitado para a inativação da enzima de restrição.

Ligação dos adaptadores

Os fragmentos digeridos de extremidade abrupta foram ligados a adaptadores específicos (*Rsa*21 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' e *Rsa*25 5'-AGTCCACGCGTAA GCAAGAGCACA-3'). A reação de ligação dos adaptadores foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo: tampão 5X [50 mM Tris-HCl (pH 7,8); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/mL BSA), 0,4 µM de cada adaptador, 0,3 µg do DNA genômico digerido no passo anterior e 4 U de T4 DNA ligase. Em seguida, a reação foi incubada a 20°C por 2 h.

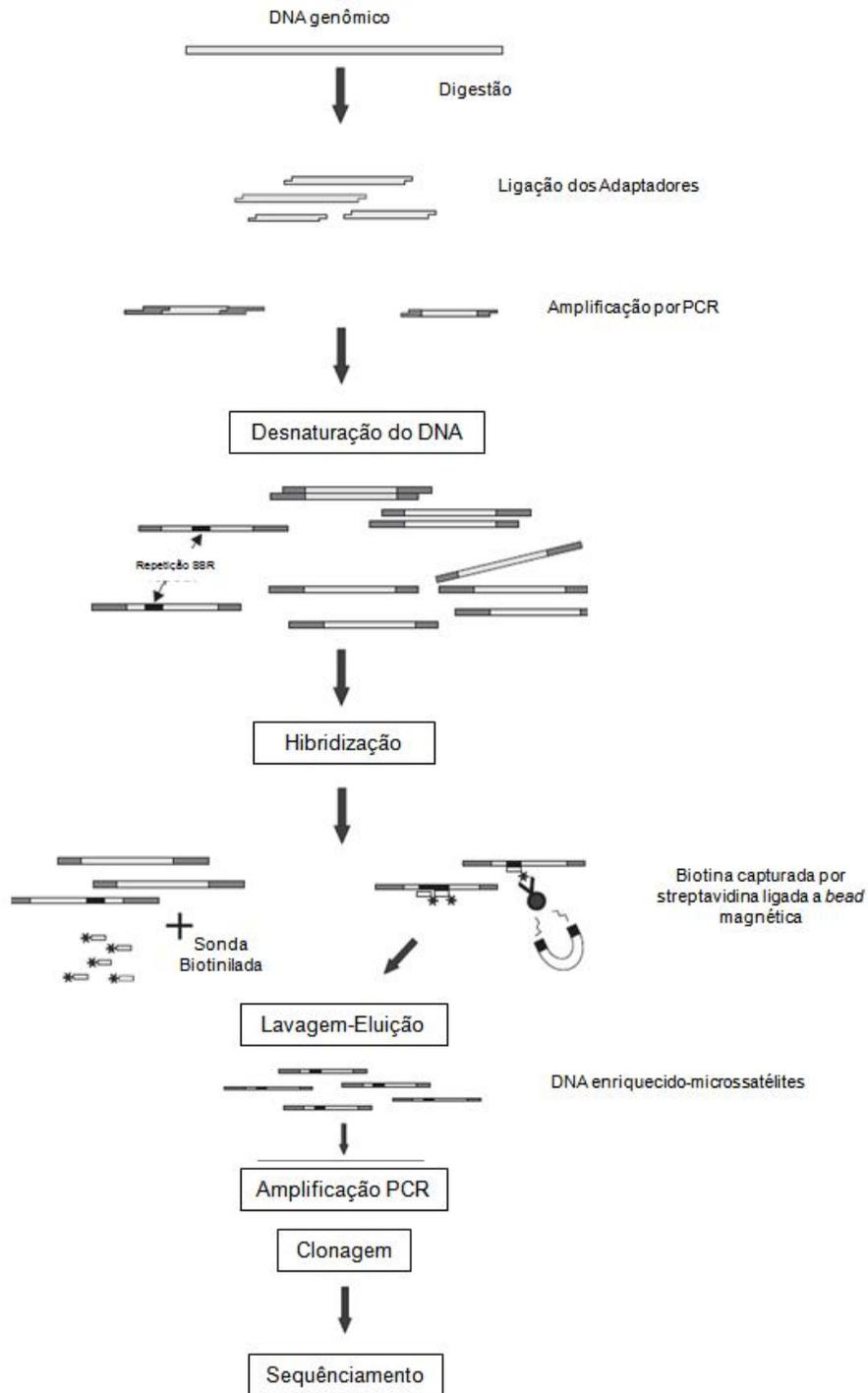


Figura 3 – Esquema representativo das etapas da construção da biblioteca enriquecida com microsatélites (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002, modificado).

Pré-Amplificação

Foi realizada uma reação de PCR utilizando o *primer Rsa21* que é complementar a sequência dos adaptadores ligados aos fragmentos para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção. Após a ligação os fragmentos foram amplificados utilizando 30 ng do DNA ligado, 0,4 μM do *primer Rsa21*, tampão 10 X [50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl, (pH 8,9)], 2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP e 5 U de *Taq* polimerase em um volume final de 50 μL . Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 min, seguida de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 8 min foi adicionado após o último ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o *Kit Gen Elute PCR Clean-Up* (Sigma).

Seleção dos fragmentos contendo regiões SSR

Para promover o processo de enriquecimento por hibridização, foi utilizado oligonucleotídeos biotinizados, biotIIIII(CT)₁₀ e biotIIIII(GT)₁₀, complementares as sequências microssatélite GA e CA. Os fragmentos contendo essas repetições foram recuperados por estreptavidina ligada a microesferas magnéticas utilizando o kit *Streptavidine-Magnisphere* (Promega). Os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores e pré-amplificados via PCR foram incubados a 95°C por 15 min para a desnaturação da dupla fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 3 μL de cada oligonucleotídeo biotilado. Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob agitação constante e após 20 min foi adicionada às esferas magnéticas previamente lavadas seguindo as recomendações do fabricante. A suspensão contendo as esferas magnéticas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 min à temperatura ambiente sob suave agitação. Após a incubação, foram realizadas lavagens conforme descrito por Creste et al. (2006) e os fragmentos selecionados foram recuperados através de lavagem com 250 μL de água ultrapura autoclavada. Para realização das lavagens, as microesferas magnéticas foram atraídas por um ímã presente em um suporte posicionado lateralmente ao tubo.

Amplificação dos fragmentos selecionados

Os fragmentos obtidos após o enriquecimento foram amplificados por PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa21*. A amplificação foi realizada utilizando 20 μL do produto da ligação, 0,4 μM do *primer Rsa21*, tampão 10 X [50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9)], 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP e 5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) em um volume final de 100 μL . Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 1 min e 72°C por 2 min. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionado após o último ciclo.

Clonagem e transformação em células competentes

Após a amplificação, 1,5 µL dos produtos da PCR foram ligados a 1 µL do vetor *pGEM-T* (kit Promega), segundo o protocolo fornecido com o vetor plasmidial, e foram transformados em células competentes XL1-Blue. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL), 30 µL IPTG (24 mg/mL) e 30 µL X-Gal (20 mg/mL). As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 18 h em estufa para o crescimento de colônias. Para garantir que cada ligação (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas ELISA com fundo em “U”, com 200 µL de meio 2YT-HMFM contendo ampicilina (100µg/ml) por poço. As colônias brancas foram repicadas com a ajuda de palitos estéreis. As placas foram incubadas a 37°C *overnight* em estufa para o crescimento de colônias. Após esse período as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 min e então foram armazenadas em freezer -80°C.

4.2.3 Sequenciamento dos insertos

As etapas de extração plasmidial e sequenciamento dos insertos foram realizados no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” - IAC, situado no município de Cordeirópolis, SP.

PCR dos insertos

Para identificar os clones contendo insertos e verificar a eficiência da clonagem, foi realizada uma reação de PCR dos insertos diretamente dos clones obtidos na etapa anterior, utilizando o *primer Rsa21*. Na reação, foi utilizado 10 µL de suspensão de células crescidas em placas de ELISA de cada clone em um volume final de 25 µL contendo as seguintes concentrações dos reagentes: tampão 10X [50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,9)], 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM do *primer Rsa21* e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95°C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 45s, 72°C por 1 min e 30 s e um passo final de extensão a 72°C por 8 min. Para controle, 10 µL do volume da reação foram utilizados na eletroforese em gel de 1,5% agarose.

Extração plasmidial

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial dos clones para posterior sequenciamento foi colocado 1 mL de meio *Circle Grow* contendo 100 µg/mL de ampicilina em cada poço da microplaca; foram inoculadas colônias individuais com o auxílio de um replicador. A placa foi selada com adesivo, foram feitos furos em cima com uma agulha para aeração durante o crescimento, foi incubada a 37°C a 300 rpm durante 20 h; o adesivo da placa foi trocado e placa foi centrifugada por 6 min a 3000 rpm, para sedimentar as células; foi descartado o sobrenadante e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente por 2 min; a placa foi mantida a -80°C por 15 min e logo em seguida a 50°C por 10 min; foi adicionado a cada poço 25 µL de água ultrapura autoclavada e vortexada por 5 minutos; em seguida foi adicionado 75 µL de solução de lise [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5% Tween 20] e vortexada por 1 min sendo mantida a 37°C por 5 min; a placa foi levada ao microondas na potência máxima por 25 s, o processo foi repetido girando a placa 180°; foi adicionado a cada poço 400 µL de água ultrapura autoclavada e vortexada por 1 min sendo logo em seguida mantida em gelo por 15 min; finalmente a placa foi centrifugada por 45 min a 3000 rpm e 50 µL do sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para uma outra placa.

Sequenciamento dos insertos

As reações de sequenciamento foram realizadas em um termociclador PTC-200 (*MJ Research, Inc.*) em um volume final de 10 µL contendo 2,0 µL de tampão *SaveMoney* [2,5 µL de 2 M MgCl₂, 200 µL de 1 M Tris-HCl (pH 9,0)], 0,25 µM de *primer* T7, 0,4 µL de *Big Dye* e 2 µL de DNA plasmidial. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 96°C por 2 min, seguida de 25 ciclos (96°C por 45 s, 50°C por 30 s, 60°C por 4 min) e um passo final a 4°C até retirar a reação da máquina. Foram adicionados nas amostras 80 µL de isopropanol 65% (v/v) e foi agitado suavemente; e mantido na bancada por 15 min e foi centrifugado a 3000 rpm por 45 min; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 min em papel absorvente para secar. Foram adicionados 200 µL de etanol 60% (v/v) e centrifugado a 3000 rpm por 10 min; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida por 1 min em papel absorvente para secar. A lavagem foi repetida. Foi dado um *spin* com placa invertida. A placa ficou no fluxo laminar por 1 h para secar. Depois de feita a extração e purificação, a seqüência de cada clone selecionado foi determinada através da análise em um seqüenciador automático modelo 3100 (*Applied Biosystem*).

Analises das sequências

As sequências foram obtidas pelo 3730/3730xl *Data Collection Software v3.0* (*Applied Biosystems*) e os cromatogramas produzidos foram analisados por meio do programa Chromas 2.21 (*Technelysium Pty Ltd*). Com isso, arquivos do tipo 'FASTA' foram obtidos para cada clone individualmente, contendo apenas sequências de interesse e com boa qualidade. Foram retiradas das sequências as regiões correspondentes ao vetor e ao adaptador, restando apenas a sequência do inserto.

4.2.4 Construção dos primers

As sequências 'FASTA' obtidas pelo sequenciamento foram transferidas para o programa WEBSAT, com objetivo de selecionar regiões contendo microssatélites (MARTINS et al., 2009). Alguns parâmetros de identificação das regiões de interesse foram adotados: mononucleotídeos e dinucleotídeos deveriam ter no mínimo oito repetições do motivo, microssatélites constituídos por trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos deveriam ter no mínimo quatro repetições do motivo. Após essa etapa, primers foram desenhados a partir das sequências selecionadas utilizando o programa PRIMER3 (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi). Foram alteradas algumas opções pré-estabelecidas pelo programa, buscando *primers* com: máximo de 22 pb; diferença entre temperatura de *melting* do *primer forward* e *reverse* inferior a 3°C; temperaturas de *melting* variando entre 57°C e 60°C; complementaridade máxima igual a 5; porcentagem de GC entre 40 e 60%; produto de amplificação entre 100 e 250 pb.

Os *primers* desenhados foram analisados no programa NETPRIMER (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) para avaliação qualitativa. Foram verificadas as proporções GC/AT e a possível formação de dímeros e *loops* para os *primers forward*, *reverse* e entre ambos.

4.3 Caracterização dos locos microssatélites

4.3.1 Extração de DNA dos isolados

Os DNAs dos isolados utilizados para a análise dos locos microssatélites foram obtidos a partir de uma suspensão de urediniósporos provenientes de uma única pústula conforme descrito por Virtudazo, Nojima e Kakishima et al (2001a). Cerca de 300 a 400 urediniósporos foram coletados e macerados com auxílio de bastão de vidro em tubos contendo 200 µL de tampão de maceração [50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,5 mM MgCl₂; 0,01% Proteinase K]. Logo após a maceração, as suspensões foram incubadas a 37°C por 1 h e em seguida a 95°C por 15 min. Finalmente, as suspensões foram armazenadas a 4°C para serem utilizadas posteriormente nas ampliações por PCR com os primers microssatélites.

4.3.2 Otimização e amplificação dos locos microssatélites

A diversidade genética de Ferrugem marrom foi estudada utilizando-se locos microssatélites desenvolvidos especificamente para *P. melanocephala*. Para a realização da PCR foi padronizado 1 µL da suspensão de urediniósporos em uma reação com volume final de 20 µL, contendo: solução tampão 1X [0,1 mM EDTA; 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM KCl; 200 µg/mL BSA], 0,05 µg/uL Caseína, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1 µM de cada *primer* e 1 U de enzima *Phire Hot Start DNA Polymerase* (Finnzymes Oy, Finland). Previamente, foi realizada uma reação de PCR com programa *touchdown* para todos os locos para avaliar a amplificação dos mesmos. As ampliações foram realizadas em termociclador *MyCycle* (Bio-Rad) programado para realizar um passo de 3 min a 95°C, seguido de 10 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s com temperaturas de anelamento decrescentes de 60°C a 50°C, diminuindo 1°C por ciclo e mais 30 ciclos de 40 s com temperatura de anelamento a 50°C, após cada ciclo uma extensão final de 60 s a 72°C.

4.3.3 Avaliação dos locos microssatélites

Preparo das placas e do gel

Para a realização da eletroforese, a preparação das placas de vidro obedeceu ao seguinte procedimento: aplicação de 1,5 mL de 2% de dimetildiclorosilano em octametil ciclo-octasilano (*PlusOne Repel Silane ES*, Amersham Biosciences) sobre a placa maior (33,3 x 41,9 cm). Na placa menor (33,3 x 39,4 cm) foi alicado 3 μ L de metacriloxipropil-trimetoxisilano (*PlusOne Bind Silane ES*, Amersham Biosciences) diluído em 1 mL de uma solução composta por 0,5% de ácido acético glacial e 95,5% de etanol. Após secagem, ambas as placas foram montadas. Para o preparo do gel foram utilizados 70 mL de solução de 6% acrilamida; 750 μ L de 10% persulfato de amônia; 45 μ L TEMED. A solução de 6% acrilamida foi aplicada entre as placas com auxílio de uma seringa plástica descartável.

Eletroforese

Após 60 min de polimerização, as placas foram colocadas em cuba vertical, onde os géis eram pré-aquecidos por 40 min a 90 W de potência constante. Uma de alíquota de 5 μ L, previamente desnaturada com 10 μ L de tampão de carregamento (95% formamida; 12,5% sacarose; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xylenicyanol; 10 mM NaOH) a 95°C por 5 min, foi aplicada em cada poço do gel. Em seguida, procedeu-se a corrida propriamente dita a uma potência constante de 55 W durante 1 h e 30 min. A coloração foi realizada com nitrato de prata, segundo metodologia proposta por Creste et al. (2001).

4.3.4 Análise dos locos microssatélites

A partir de leitura dos dados de fragmentos nos géis foram obtidas as frequências alélicas e genótípicas de todos os isolados de *P. melanocephala*. A diversidade genética foi medida através do número médio de alelos por locos (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigozidade esperada (H_e) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o programa TFGA (MILLER, 1997).

O conteúdo de informação polimórfico (PIC – *polymorphism information content*), proposto por Anderson et al. (1993), foi calculado em função do número de alelos detectados, da sua distribuição e frequência na população estruturada. Os valores do PIC por loco são determinados pela expressão: $PIC = 1 - \sum p_i^2$. Nesta expressão, p_i é a

frequência do alelo *i* na população. O PIC é baseado no número de alelos detectados por determinado loco e a frequência relativa de cada alelo no conjunto dos isolados de *P. melanocephala*. Desta maneira o PIC está relacionado com número de alelos, que, por sua vez, está diretamente associado à divergência genética e ao número de genótipos em estudo.

A estrutura genética molecular entre populações foi analisada mediante parâmetros estatísticos (H_T , H_S , D_{ST} , G_{ST}) de Nei (1973), os quais foram calculados a partir do programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2002), tendo a significância testada pela reamostragem do tipo *bootstrap*, utilizando 10000 reamostragens sobre locos. Também foram calculadas as distâncias genéticas não viesadas de Nei (1978). O programa TFPGA versão 1.3 (MILLER, 1997) foi utilizado para o cálculo da estimativa da distância genética entre os indivíduos. Para a construção do dendograma foi utilizado o programa NTSYS (ROHLF, 1989) empregando-se o método Neighbor-Joining. A estabilidade dos agrupamentos dentro do dendograma foi testada a partir de reamostragens utilizando 1000 reamostragens *bootstrap*.

4.4 Caracterização da variabilidade patogênica de *P. melanocephala*

A variabilidade patogênica de *P. melanocephala*, foi avaliada utilizando três populações provenientes de regiões onde a cultura de cana-de-açúcar é intensamente cultivada: Goianésia (GO), Jaú (SP) e Ribeirão Preto (SP). Estas regiões foram priorizadas, pois em um recente estudo em São Paulo, revelou variações marcantes na patogenicidade de diferentes populações de *P. melanocephala*, sendo que, a população de Jaú se destacou em relação às outras (Ribeirão Preto e Piracicaba), apresentando variações, tanto na virulência como na patogenicidade (RAGO, 2005).

As variedades de cana-de-açúcar 'SP70 1143' (suscetível) e 'RB83 5486' (intermediária) foram utilizadas para as inoculações de ferrugem. Gemas individuais dessas variedades foram plantadas em vasos plásticos com substrato e mantidas em casa de vegetação até o momento das inoculações.

Com o intuito de manter e multiplicar os uredinósporos coletados de cada região, plantas da variedade 'SP70 1143' foram inoculadas. Inicialmente, plantas com 30 dias de idade foram colocadas em câmara úmida por 12 h. Após este período, estas foram colocadas separadamente em contato direto com folhas infectadas contendo uredinósporos das 3 regiões. Após a inoculação, ficaram em câmara úmida por mais 24 h. Após esse

período, a câmara úmida foi removida e as plantas permaneceram em casa de vegetação isoladas por região (Figura 4) para manutenção e multiplicação dos esporos.

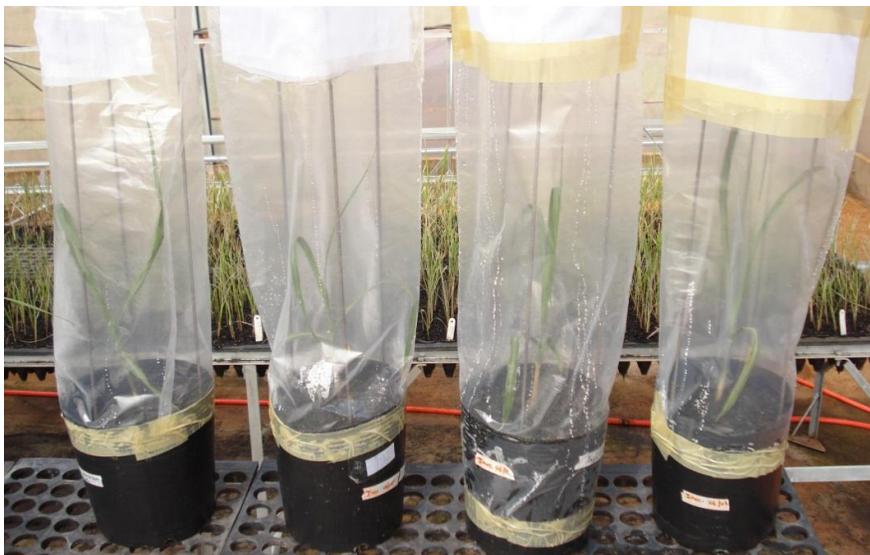


Figura 4 – Plantas da variedade 'SP70 1143' inoculadas e isoladas por região.

Para comparar a patogenicidade entre as regiões de coleta de *P. melanocephala*, foram realizadas inoculações em folhas destacadas empregando a metodologia descrita por Garcia e colaboradores (2007). Plantas da variedade 'SP70 1143' e 'RB83 5486' com 45 dias de idade foram utilizadas para a obtenção de segmentos de 20 cm, tomados da folha +1 (folha com maior atividade fotossintética). Esses segmentos foram inoculados com uma suspensão de urediniósporos em água destilada esterilizada, contendo em média 2×10^4 urediniósporos viáveis/mL. A determinação da viabilidade dos urediniósporos foi realizada por meio de plaqueamento dos mesmos em Agar-água. A suspensão foi borrifada cuidadosamente ao longo de toda superfície abaxial dos segmentos. Após esta etapa, os segmentos foliares já inoculados foram introduzidos em tubos de ensaio com 25 cm de comprimento, contendo $\frac{3}{4}$ de água destilada (Figura 5). Os tubos de cada tratamento permaneceram em incubadora BOD a 21°C, com fotoperíodo de 12 h por 15 dias.



Figura 5 – Inoculação de segmentos de folhas da variedade ‘SP70 1143’ e ‘RB83 5486’ para avaliação de patogenicidade.

A avaliação da severidade da ferrugem foi realizada no 14º dia após a inoculação, por meio da escala diagramática proposta por Amorim et al. (1987) (Figura 6).

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições para cada tratamento. Cada tubo contendo um segmento de folha inoculado foi considerado como uma parcela experimental. Para a análise estatística, os dados originais foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$, onde x = % de área foliar doente e, em seguida, foram submetidos à análise de variância e teste de Tuckey para comparação de médias.

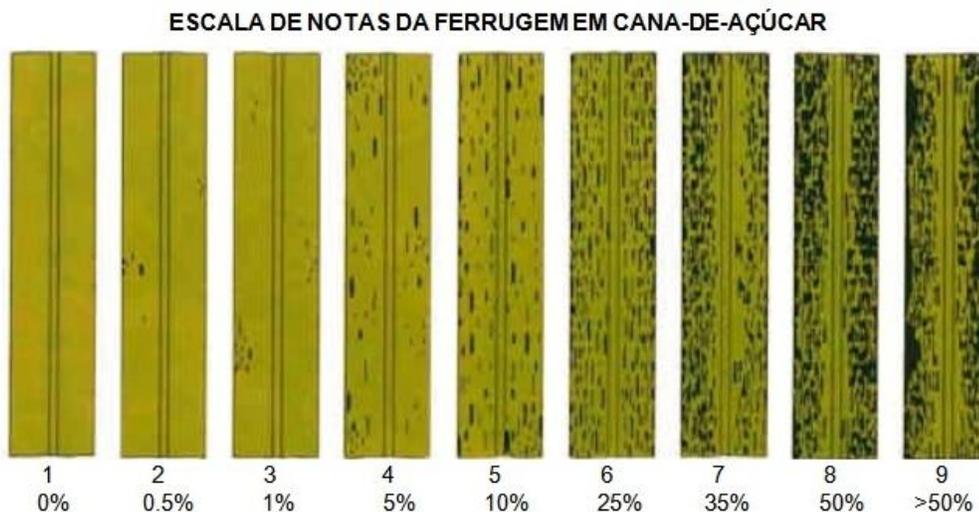


Figura 6 – Escala diagramática para avaliação da severidade da ferrugem marrom (AMORIM et al., 1987).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e identificação dos isolados de ferrugem

Para o estudo de diversidade utilizando locos microssatélites, amostras de ferrugem foram coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Alagoas. Um total de 44 amostras foram coletadas e analisadas. Desse total, 34 foram identificadas como *P. melanocephala* (ferrugem marrom) e 10 como *Puccinia kuehni* (ferrugem alaranjada). Em virtude da recente introdução de ferrugem alaranjada no Brasil (BARBASSO, 2010), o material coletado foi rigorosamente analisado microscopicamente. Características morfológicas dos urediniósporos como coloração, forma, ornamentação, espessamento da parede celular e presença de poro germinativo foram avaliadas, objetivando a discriminação entre *P. melanocephala* e *P. kuehni* (DIXON et al., 2010; VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001b). Os urediniósporos de ferrugem marrom apresentaram coloração marrom escura, obovóides, com discreta ornamentação, parede celular uniforme e no máximo dois poros germinativos. Já os urediniósporos de ferrugem alaranjada apresentaram coloração amarela a castanho claro, piriformes, com ornamentação destacada, espessamento da parede celular no ápice e três a cinco poros germinativos (Figura 7). Especificamente no isolado P270, observou-se a presença de teliósporo clavado com coloração marrom escuro com duas células (Figura 7D). Características associadas aos teliósporos de basidiomicetos auxiliam na identificação morfológica e classificação taxonômica de fungos (famílias e gêneros) por microscopia (ALEXOPOULOS, 1996), visto que, a ferrugem alaranjada possui teliósporo hialino com duas ou três células (VIRTUDAZO; NOJIMA; KAKISHIMA, 2001b).

A ferrugem alaranjada tem demonstrado grande adaptação às condições climáticas brasileiras, e vem ocorrendo nas mesmas condições da ferrugem marrom, sendo que em cultivares susceptíveis ('IACSP84 2480'), é frequente a ocorrência das duas ferrugens (Figura 8), refletindo algumas vezes em mistura de espécies nas amostras coletadas.

Em algumas amostras coletadas, foram observados sintomas e sinais da mancha parda causada pelo fungo *Cercospora longipes* e que pode ser facilmente confundida com a ferrugem no campo, em virtude das características das lesões foliares (Figura 9).

A caracterização por microscopia permitiu uma diferenciação segura destas espécies e a correta identificação dos isolados para as análises com os locos microssatélites.

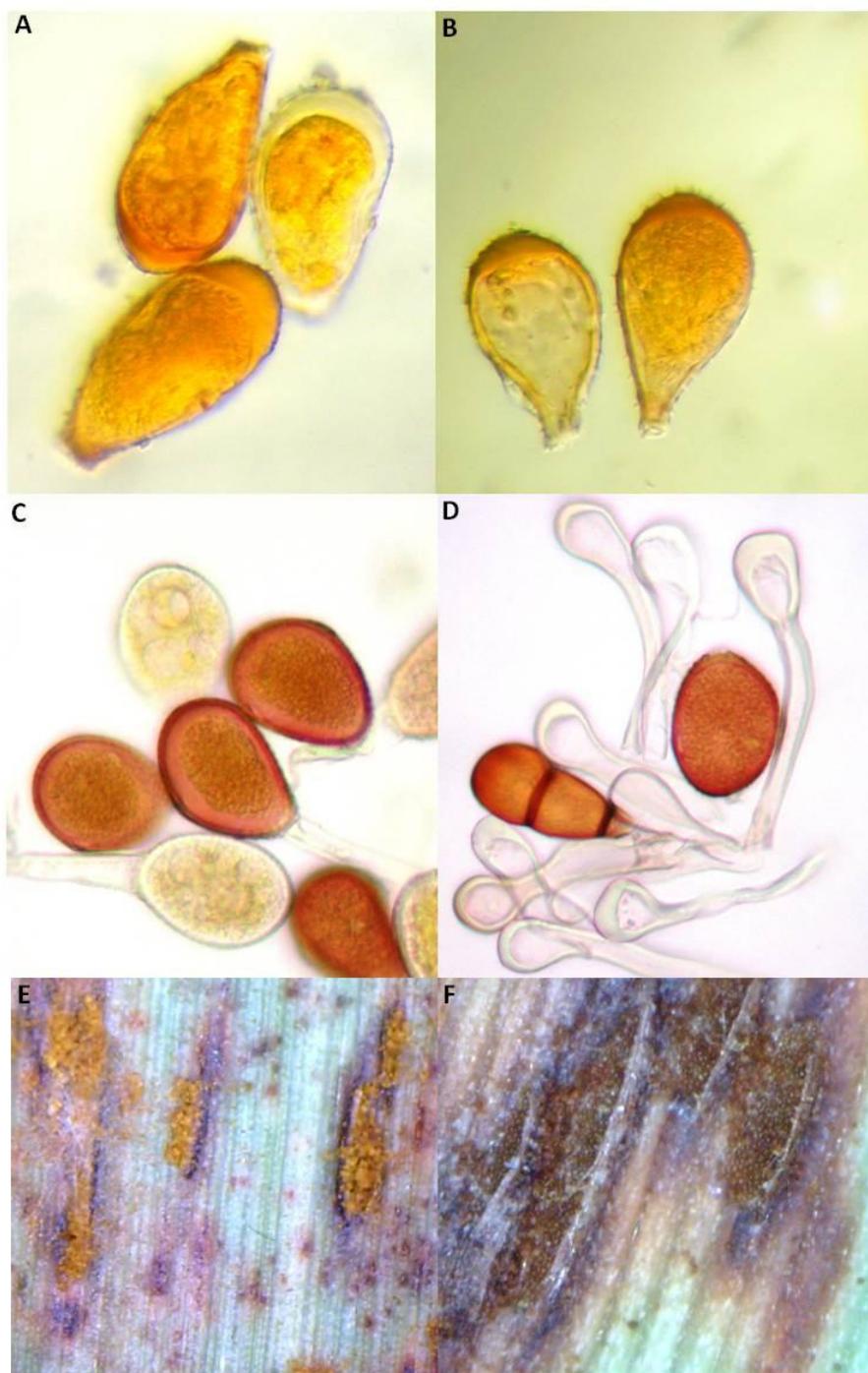


Figura 7 – Urediniósporos de ferrugem alaranjada e marrom (A, B, C e D) observados ao microscópio óptico (aumento 40x) e lesões foliares de ferrugem alaranjada e marrom observados ao microscópio estereoscópio (aumento 4x) (E e F). (A – B) *P. kuehnii*; (C) *P. melanocephala*; (D) Teliósporo de *P. melanocephala*; (E) Lesão foliar de ferrugem alaranjada; (F) Lesão foliar de ferrugem marrom.

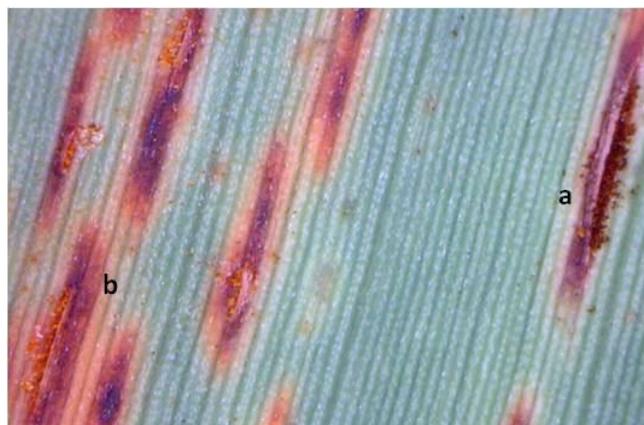


Figura 8 – Variedade ‘IACSP84 2480’ apresentando lesões foliares de Ferrugem marrom e alaranjada. (a) *P. melanocephala*, (b) *P. kuehnii*.

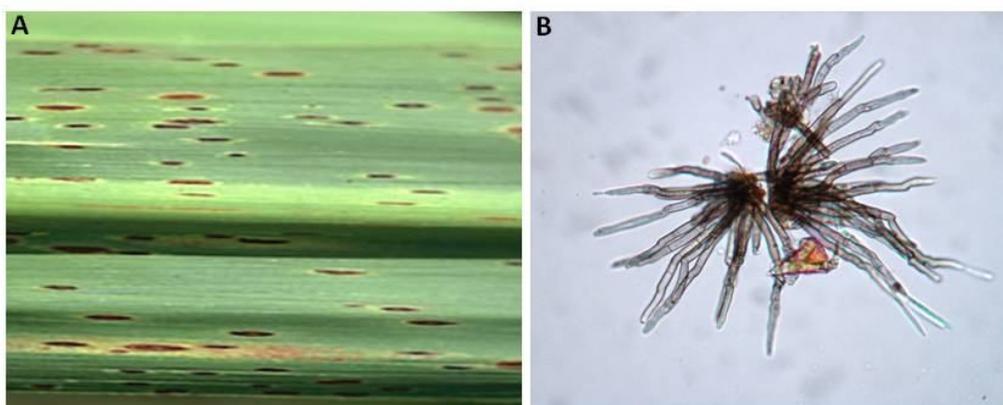


Figura 9 – Mancha parda. (A) Lesões foliares, (B) Conidióforos de conídios de *Cercospora longipes* observados ao microscópio óptico (20x).

5.2 Biblioteca enriquecida com locos microssatélite

Foi construída inicialmente uma biblioteca enriquecida para locos microssatélites, possibilitando o desenvolvimento de 41 locos. Entretanto, essa biblioteca não se mostrou específica para *P. melanocephala*, visto que, houve ampliações com DNA de cana-de-açúcar, sugerindo contaminação na construção da biblioteca com DNA da planta hospedeira. Este fato pode ter sido gerado pela liberação de fragmentos de tecido foliar que foram introduzidos junto aos urediniósporos utilizados para a extração do DNA empregado na construção da biblioteca. Para contornar esta dificuldade, uma nova biblioteca foi construída. O DNA utilizado foi extraído de urediniósporos identificados microscopicamente e coletados com auxílio de microscópio estereoscópio e bomba a vácuo.

5.2.1 Análise das sequências

Em função das medidas adotadas para a construção da biblioteca, todas as etapas para obtenção da biblioteca enriquecida para locos SSR foram realizadas com êxito. A digestão do DNA genômico com a enzima *RsaI* produziu fragmentos de 300 a 1200 pb, sem a presença de fragmentos preferenciais. A ligação dos adaptadores foi confirmada pela etapa de pré-amplificação, resultando em uma maior quantidade de DNA para a etapa de seleção. Também não ocorreram ampliações aparentemente de fragmentos preferenciais, o que poderia ser posteriormente prejudicial pela presença de microssatélites redundantes.

A partir de 178 clones sequenciados, um total de 93 clones foram identificados contendo sequências com regiões microssatélites. Desses 93 clones, 27 continham mais de uma região microssatélite na mesma sequência, gerando um total de 135 sequências microssatélites. Foram encontrados motivos repetidos dinucleotídeo, dentre eles, o mais frequente foi GT/TG (20,7%), seguido de CA/AC (15,5%), GA/AG (5,2%), TA/AT (3,0%) e CT/TC (2,2%) (Figura 10). Motivos repetidos trinucleotídeos foram encontrados, constituindo 19,2% do total das sequências microssatélites obtidas. Motivos tetranucleotídeo (TAAT e TTTA) (1,5%), pentanucleotídeo (TTGGG) (0,8%) e hexanucleotídeo (ACACGC) (0,8%) também foram encontrados, porém, com baixa frequência (Figura 11). Apenas quatro sequências apresentaram microssatélites com motivos repetidos interrompidos.

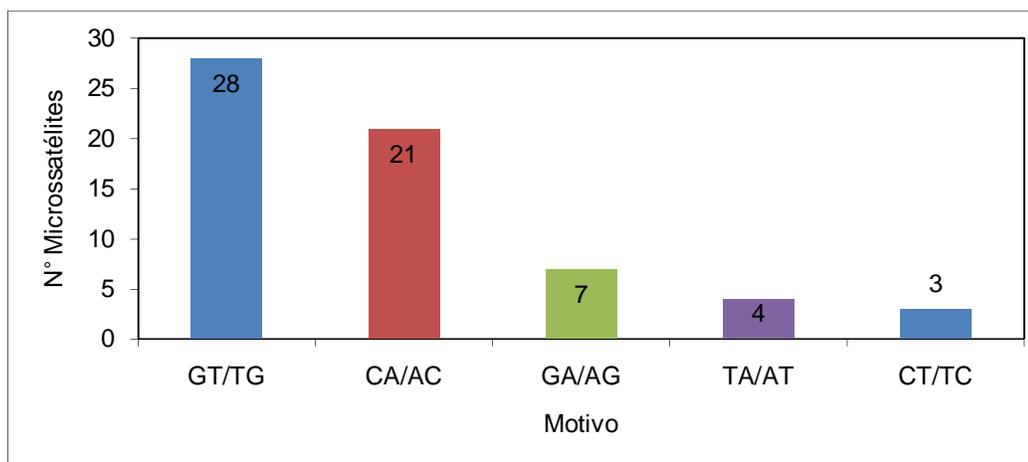


Figura 10 – Motivos dinucleotídeos repetidos encontrado pela biblioteca enriquecida em locos microssatélite de *P. melanocephala*.

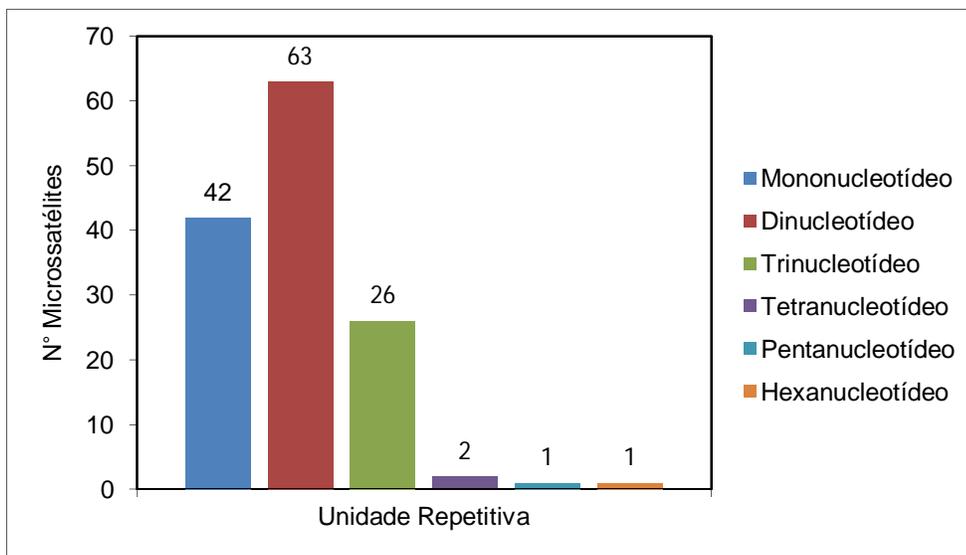


Figura 11 – Microsatélites obtidos pela biblioteca enriquecida em locos microsatélites de *P. melanocephala*.

Foram observados mononucleotídeos com motivos repetidos somente A e T, com repetições entre 8 e 15 vezes. Esses microsatélites não foram incluídos no desenho de *primers*, pois, microsatélites mononucleotídeos tendem a possuir baixo polimorfismo (TÓTH et al., 2000).

Microsatélites com motivos dinucleotídeos foram observados repetindo desde oito vezes que foi o critério mínimo de busca utilizado no estudo até dinucleotídeo repetindo 37 vezes. Entre os motivos trinucleotídeos foram encontrados motivos variando entre 4 a 13 repetições. Já para os dois tetranucleotídeos encontrados, um teve seu motivo repetido seis vezes e o outro oito vezes. Também foi identificado um pentanucleotídeo e um hexanucleotídeo com quatro repetições cada um.

Do total de clones sequenciados, 52,2% apresentaram pelo menos uma região microsatélite. Apesar do fato que genomas de fungos possuem baixa frequência de microsatélites se comparados a outros organismos (MORGANTE et al., 2002), esse estudo evidenciou que com a utilização de uma biblioteca enriquecida, pode-se elevar o número de microsatélites sequenciados.

Dutech et al. (2007) desenvolveram 16 bibliotecas enriquecidas em locos microsatélites para diferentes espécies de fungo, obtendo rendimentos variáveis no enriquecimento das sequências microsatélites (*Puccinia triticinia* (82,3%), *Erysiphe necator* (79,2%), *Puccinia striiformis fsp tritici* (75,9%), *Penicillium camembertii* (66,7%), *Mycosphaerella eumusae* (63,8%), *Fusarium poae* (63,5%), *Fusarium culmorum* (57,6%), *Mycosphaerella musicola* (53,1%), *Magnaporthe grisea* (46,9%), *Mycosphaerella fijiensis* (46,8%), *Microcyclus ulei* (46,2%), *Penicillium roqueforti* (43,5%), *Microbotryum violaceum*

(42%), *Plasmopara viticola* (37,1%), *Erysiphe alphitoides* (19,1%) e *Melampsora larici-populina* (17,8%).

A grande quantidade de motivos dinucleotídeos encontrada em *P. melanocephala* deve-se ao fato de que, as sondas empregadas no enriquecimento da biblioteca eram de repetições de motivos dinucleotídeos. Os motivos dinucleotídeos mais presentes foram GT/TG, CA/AC e GA/AG, sendo estas duas últimas repetições esperadas em função das sondas utilizadas. O fato do dinucleotídeo GT/TG ter sido o mais frequente na biblioteca sugere que este motivo pode ser mais abundantemente no genoma de *P. melanocephala*. Apesar do grande avanço das metodologias para o desenvolvimento de locos microssatélites, se comparado a outros filos, os estudos com fungos ainda são pouco explorados (DUTECH et al., 2007).

A partir das sequências contendo regiões microssatélites obtidas pela biblioteca enriquecida, foram desenhados pares de *primers* para 21 locos (Tabela 2). Não foi possível utilizar as sequências restantes, pois algumas características como posição do microssatélite nas extremidades da sequência, fragmentos muito pequenos e baixa qualidade das sequências impossibilitaram o desenho de *primers*.

Tabela 2 - Lista dos *primers* sintetizados a partir das sequências microssatélites obtidas pela biblioteca enriquecida.

Locos	Sequência (5´-3´)	Motivo	Ta(°C)	Produto (pb)
<i>mPmlAC101</i>	F:CGTGTCAACCTATCAACCTG R:CTCCACAACACTACAACCTG	(GT) ₈	55	248
<i>mPmlAC102</i>	F:GCACCATTACAAAACAGC R:CACACACCACACGAGAGTAA	(AGA) ₆	55	173
<i>mPmlAC103</i>	F:TACCGCCGACAGATTTAC R:ATACACAAGCGTGGGAGA	(TC) ₁₇	55	195
<i>mPmlAC104</i>	F:ATAGACGCAATGGAAGAAAC R:ACACACACAAAACGTTACAA	(AC) ₁₀	55	183
<i>mPmlAC105</i>	F:GAGAAGGAGTGAGAAGGAAA R:TAACCGCGTCTTAGCAAC	(AG) ₉	53	246
<i>mPmlAC106</i>	F:CGACCGCTTATGATAGAGTA R:GTCTGTGTGATTGAGATTGC	(CA) ₂₃	53	227
<i>mPmlAC107</i>	F:GGGCGTAATGAACTCTG R:ATTCGGACGACCACAAAC	(AC) ₁₄	55	250
<i>mPmlAC108</i>	F:GACGCCTGGAATGAGAGAAC R:GGCTACTTCCCTGGTCCGATA	(TC) ₁₈	60	161
<i>mPmlAC109</i>	F:TGCGTGTATTCGTGAGTTG R:CGTCGCTTCCATCCGTTAT	(GT) ₇	60	245
<i>mPmlAC110</i>	F:TCGATTGCTGTCCTGATTCC R:GCTCGCTCTCGGTAACTTTCT	(AG) ₁₆	60	212
<i>mPmlAC111</i>	F:CGAGGTGAAACGATGGA R:AGGCGGGCATAAAAAATAG	(AT) ₈	60	249
<i>mPmlAC112</i>	F:GAGGCAGGCAGTGAGAGA R:CTGGAGATGGTGATGCTATG	(AG) ₁₇	57	246
<i>mPmlAC113</i>	F:AGTCATAAAAACCGTCCAAC R:CGTGTGAGTCCCTCAGAGA	(CA) ₁₀	55	171
<i>mPmlAC114</i>	F:GACTTGCGACTGGTGAATGA R:GTGACGAGTGCTTGCTACGA	(TG) ₂₉	60	175
<i>mPmlAC115</i>	F:GACGGACAGATAGACTTTTCAC R:ATCACTCTCCCCTTTCTCAC	(GT) ₁₆	55	165
<i>mPmlAC116</i>	F:CGCGCTACACTACGTTTAAG R:ACACTGCTCACTCACACACC	(AAT) ₆	56	136
<i>mPmlAC117</i>	F:GTGCAGACGAAATGATGGT R:CAGATTCGGATGATGATGG	(GT) ₉	56	239
<i>mPmlAC118</i>	F:AGCGATTTTTGTTGTTAGCC R:GTTTCGGAGCATTTCGTGTT	(TAA) ₅	57	201
<i>mPmlAC119</i>	F:GCCCACGGATAAAAATACC R:GCATAGGAGACGGGAAGA	(CA) ₁₁	53	201
<i>mPmlAC120</i>	F:GAGATTGTGGCAGGTGAA R:AAAGGGAAAGCTCCAACA	(AGA) ₆	55	176
<i>mPmlAC121</i>	F:GAGTGGTTTGTGTGTGTGTT R:GAGACCGTATCTTCTAAGTGC	(AAT) ₁₃	53	180

5.2.2 Caracterização dos locos microssatélites

Os primers sintetizados foram submetidos à amplificação via PCR e visualizados em gel de agarose (1,2%). Inicialmente, foi utilizada uma temperatura de anelamento de 50°C. Neste primeiro teste, todos os locos apresentaram inúmeras bandas inespecíficas (Figura 12). Houve então a necessidade de elevar a temperatura de anelamento para 55°C objetivando uma maior especificidade de amplificação. Dos 21 locos microssatélites testados, os locos *mPmlAC102*, *mPmlAC104*, *mPmlAC106*, *mPmlAC117* e *mPmlAC121* não apresentaram amplificação de acordo com o tamanho do fragmento esperado a parti da sequência do clone. Somente apresentaram bandas inespecíficas a 50°C e, em temperaturas de anelamento mais elevadas, não houve nenhuma amplificação. Os 16 locos restantes foram testados com 34 isolados de *P. melanocephala* juntamente com os 10 isolados de *P. kuehni*. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas a partir da leitura dos dados em géis de poliacrilamida (6%).

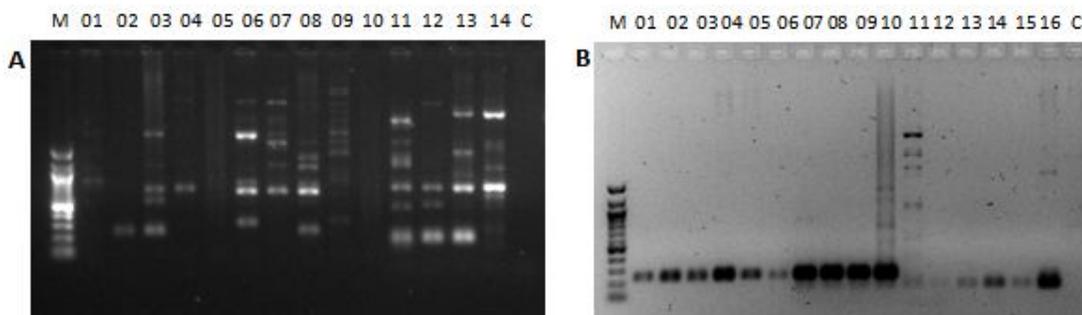


Figura 12 - Eletroforese em gel de 1,2% agarose dos produtos de PCR com locos microssatélites. (A) Ta 50°C. M: marcador 100 pb; 1-5: locos *mPmlAC111*, 6-10: *mPmlAC112*, 11-14: *mPmlAC113*; C: controle negativo. (B) Ta 55°C. M: marcador 100 pb; 1-6: locos *mPmlAC111*, 7-11: *mPmlAC112*, 12-16: *mPmlAC113*; C: controle negativo.

Dos 16 locos microssatélites que apresentaram amplificação, apenas quatro foram polimórficos (*mPmlAC101*, *mPmlAC103*, *mPmlAC107* e *mPmlAC111*) e o restante monomórficos para os isolados testados, amplificando fragmentos de tamanhos iguais aos esperados pelo desenho dos *primers*. Locos microssatélites monomórficos não contem informações sobre a diversidade genética de um organismo. Entretanto, se não houver variabilidade genética entre os indivíduos, dificilmente locos polimórficos serão caracterizados. Zhong, Yang e Puri (2011) encontraram uma baixa diversidade genética utilizando microssatélites em *Puccinia psidii* no Havaí, sendo que a população estudada

provavelmente foi originada de um isolado da Flórida que possui grande similaridade genética.

A amplificação dos locos resultou em um total de 18 alelos, com média de 4,5 alelos por loco polimórfico. Entre os locos polimórficos, os locos *mPmlAC101* e *mPmlAC111* foram os que apresentaram o maior número de alelos (5) seguido pelos locos *mPmlAC103*, *mPmlAC107* com 4 alelos cada um (Tabela 3). Dentre os 12 locos monomórficos identificados, 6 apresentaram 1 único alelo por loco para todos os indivíduos e para os outros 6 locos, os isolados apresentaram 2 alelos por locos. A maior amplitude alélica foi verificada no loco *mPmlAC105*, com dois alelos de 188 e 246 pb. A figura 13 ilustra o polimorfismo microssatélite obtido.

Tabela 3 – Locos microssatélites polimórficos e monomórficos utilizados para genotipagem dos isolados de ferrugem.

Locos	N° de Alelos	Tamanho dos Alelos (pb)
<i>mPmlAC101</i>	5	232-248
<i>mPmlAC103</i>	4	185-198
<i>mPmlAC105</i>	2	188;246
<i>mPmlAC107</i>	4	246-252
<i>mPmlAC108</i>	2	155;161
<i>mPmlAC109</i>	1	245
<i>mPmlAC110</i>	1	212
<i>mPmlAC111</i>	5	220-249
<i>mPmlAC112</i>	2	225;246
<i>mPmlAC113</i>	1	171
<i>mPmlAC114</i>	2	178;210
<i>mPmlAC115</i>	1	165
<i>mPmlAC116</i>	2	136;138
<i>mPmlAC118</i>	1	201
<i>mPmlAC119</i>	1	201
<i>mPmlAC120</i>	2	162;176

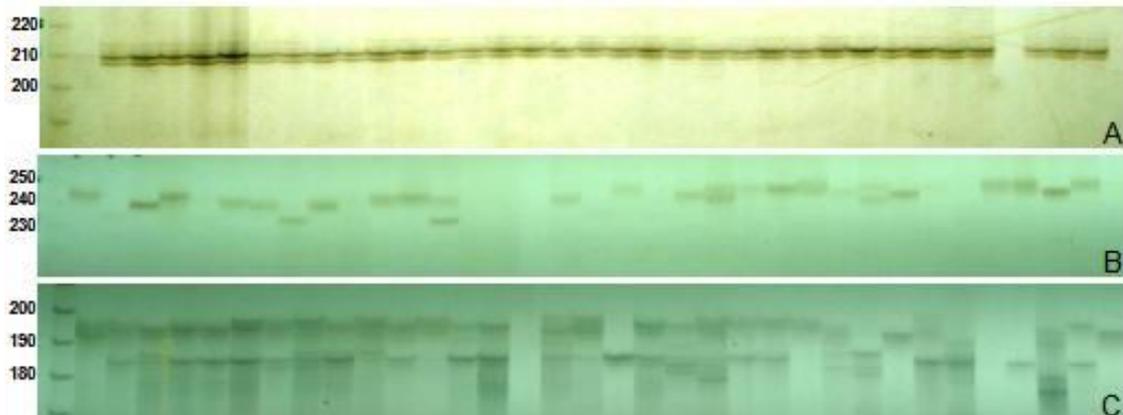


Figura 13 – Polimorfismo de microssatélite em isolados de *P. melanocephala* em gel de poliacrilamida. (A) *mPm110* – monomórfico; (B) *mPm101* e (C) *mPm103* – polimórficos.

Os 10 isolados, identificados como ferrugem alaranjada, foram caracterizados com os locos SSRs desenvolvidos para ferrugem marrom. Houve transferibilidade dos locos, com amplificação de produtos similares de *P. kuehni* e *P. melanocephala*. Tanto os locos monomórficos quanto os locos polimórficos apresentaram os mesmos padrões de alelos encontrados para ferrugem marrom, não tendo sido verificada a existência de alelos exclusivos para as espécies estudadas. Este fato indica a possibilidade de transferibilidade desses SSRs, desenvolvidos especificamente para *P. melanocephala*, para *P. kuehni*. Um estudo realizado por Wang e colaboradores (2010), demonstrou que 8 dos 21 EST-SSRs polimórficos desenvolvidos para a ferrugem da folha do trigo (*Puccinia triticina*) apresentaram transferibilidade para a ferrugem da folha de aveia (*Puccinia coronata*) e a ferrugem do colmo do trigo (*Puccinia graminis*). A transferibilidade de 3 locos SSRs descritos para *P. coronata* e 1 loco SSR descrito para a ferrugem do linho (*Melampsora lini*) foi detectada para a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix*), sendo apenas dois deles polimórficos (CRISTANCHO; ESCOBAR, 2008). A transferibilidade intraespecífica de locos SSRs representa uma alternativa ao desenvolvimento de novas bibliotecas enriquecidas, evitando assim o alto custo do seu desenvolvimento. Porém, a transferibilidade de locos SSRs intraespecíficos em fungos pode ser consideravelmente baixa se comparada a de outros grupos de organismos (BARBARA et al., 2007).

A heterozigidade foi observada para todos os locos microssatélites desenvolvidos, com uma média de 0,665 (Tabela 4). Os locos *mPmIAC101* e *mPmIAC111* apresentaram uma heterozigidade observada inferior a heterozigidade esperada. Isto indica uma maior quantidade de indivíduos homozigotos na população para estes locos. Já para os locos *mPmIAC103*, *mPmIAC10* a heterozigidade observada foi ligeiramente superior a heterozigidade esperada.

Os altos valores de heteroziguidade encontrados não podem ser explicados pela recombinação meiótica, uma vez que no Brasil não há evidências da existência de um hospedeiro intermediário, restringindo a propagação de ferrugem marrom somente por reprodução assexuada. Esse nível de heteroziguidade pode estar associado à enorme quantidade de uredinósporos produzidos assexuadamente no campo, aliada as altas taxas de mutações presentes em microssatélites, estimadas em 10^{-2} - 10^{-6} por locos por geração, sendo bem maiores que as encontradas em DNA não repetitivo (10^{-9}) (ELLEGREN, 2000).

Os marcadores SSR desenvolvidos apresentaram um valor médio PIC de 0,562 (Tabela 4). Todos os locos polimórficos avaliados neste estudo foram caracterizados como informativos. Segundo a classificação de PIC de Botstein et al. (1980), valores do PIC > 0,5 são considerados informativos e valores de PIC entre 0,25 e 0,5 são considerados moderadamente informativos. O loco *mPmlAC111* (0,502) apresentou o menor valor de PIC seguido pelo loco *mPmlAC107* (0,515). O loco com maior conteúdo informativo foi o *mPmlAC101* (0,638).

Tabela 4 – Caracterização dos locos microssatélites polimórficos.

Locos	A	H_e	H_o	PIC
<i>mPmlAC101</i>	5	0,752	0,379	0,638
<i>mPmlAC103</i>	4	0,709	0,726	0,595
<i>mPmlAC107</i>	4	0,577	0,621	0,515
<i>mPmlAC111</i>	5	0,624	0,505	0,502
Total	18			
Média	4,5	0,665	0,558	0,562

Número de alelos (A); Heteroziguidade esperada (H_e); Heteroziguidade observada (H_o); Conteúdo informativo polimórfico (PIC).

5.2.3 Diversidade genética de *P. melanocephala*

Foi realizado um estudo da diversidade genética populacional de *P. melanocephala* baseada nos 4 locos microssatélites polimórficos num total de 34 isolados originários de quatro regiões (Goiás, Minas Gerais, Alagoas e São Paulo) de acordo com a localização da coleta. Os resultados deste trabalho se apresentam como um dado preliminar frente ao estudo de populações de ferrugem marrom visto o número limitado de isolados que constituíram as populações de Alagoas (2), Goiás (6), Minas Gerais (3), juntamente com o número limitado de locos polimórficos utilizados nas análises.

As populações de Goiás e São Paulo apresentaram uma estimativa de heterozigosidade observada relativamente baixa em relação à esperada (Tabela 5), indicando uma leve tendência a maior frequência de indivíduos homozigotos nestas populações. Já os indivíduos de Minas Gerais apresentaram uma estimativa de heterozigosidade observada mais elevada em relação à esperada, enquanto que os de Alagoas apresentaram valores semelhantes entre a heterozigosidade esperada e observada. Apesar de a heterozigosidade média observada ter sido ligeiramente inferior a heterozigosidade esperada, ficou caracterizado a presença de um equilíbrio entre heterozigotos e homozigotos.

Conforme as estatísticas de Nei, a média da diversidade gênica intrapopulacional (H_s) encontrada foi de 0,689, refletindo um elevado grau de diversidade genética dentro das populações estudadas. Em contrapartida, a diversidade genética interpopulacional (D_{ST}) e o coeficiente de divergência genética interpopulacional (G_{ST}), apresentaram valores negativos próximos de zero (Tabela 5). Desta forma, esses valores foram interpretados como zero. Este fato sugere que a diversidade genética encontrada em *P. melanocephala* pode ser similar dentro das 4 populações estudadas, não havendo divergência entre elas.

Tabela 5 – Estimativa de parâmetros genéticos de diversidade em quatro populações de *P. melanocephala*.

Regiões	N	H_e	H_o	H_s	H_T	D_{ST}	G_{ST}
Goiás	6	0,573	0,542	0,633			
Minas Gerais	3	0,555	0,666	0,730			
Alagoas	2	0,500	0,500	0,789			
São Paulo	23	0,589	0,524	0,604			
Média		0,554	0,558	0,689	0,650	-0,039	-0,061

Número de isolados (N); Heterozigosidade esperada (H_e); Heterozigosidade observada (H_o); Diversidade gênica intrapopulacional (H_s); Diversidade gênica total (H_T); Diversidade gênica interpopulacional (D_{ST}); Coeficiente de divergência interpopulacional (G_{ST}).

As estimativas da distância genética de NEI (1978) foram calculadas entre os indivíduos de *P. melanocephala* buscando visualizar agrupamentos entre as regiões estudadas. Através do dendograma gerado pela análise de agrupamento (Figura 14), três grupos principais foram obtidos. Entretanto, não foi possível agrupar os indivíduos por regiões ou mesmo por localidades próximas. Os grupos 1 e 2 abrangeram a maior parte dos isolados, sendo estes pertencentes às 4 regiões estudadas. O grupo 3, com apenas dois indivíduos (Goianésia-GO e Pontal-SP), se apresentou como um grupo distante dos demais.

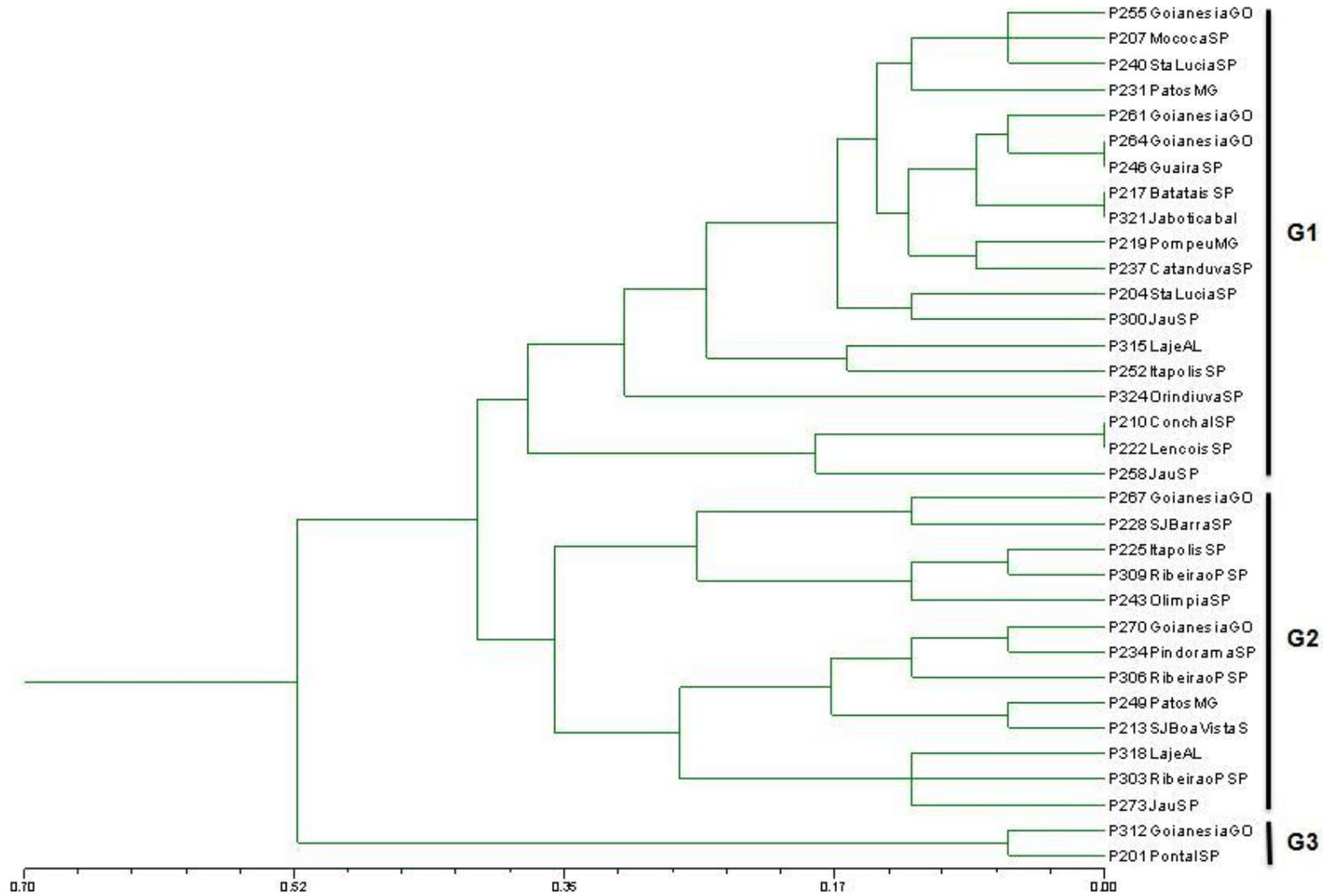


Figura 14 – Representação gráfica da análise de agrupamento, baseada nas distâncias genéticas não viesadas de Nei (1978) com 34 isolados de *P. melanocephala*, pelo método Neighbor-Joining, utilizando microssatélites.

Este perfil de agrupamento pode ser entendido pela existência de uma uniformidade de distribuição da variabilidade genética dos isolados de *P. melanocephala*, bem como pelo intenso fluxo de genótipos de cana-de-açúcar entre as principais regiões canavieiras no Brasil.

Os índices de diversidade e divergência genética encontrados em *P. melanocephala* sugerem que a variabilidade genética está distribuída uniformemente nas regiões estudadas, ocorrendo uma única população heterogênea. Este fato pode ser entendido pela dispersão e biologia do fungo. A diversidade encontrada em *P. melanocephala* pode ser atribuída a constantes fontes de entrada do patógeno no país provenientes de diferentes localidades, sendo esta, caracterizada tanto pela ação antrópica gerada pela troca de material vegetal, como pela influência de correntes de ventos que podem facilmente transportar urediniósporos de uma localidade para outra (RAGO, 2005). Ribeiro do Vale e Zambolim (1997) relataram que os urediniósporos de *P. melanocephala* podem ser transportados pelo vento a mais de 300 km de distâncias. Purdy, Liu e Dean (1983) concluíram que a propagação de ferrugem marrom da República Dominicana para a Jamaica e Cuba, provavelmente ocorreu pela dispersão dos urediniósporos pelas correntes de vento e tempestades tropicais a uma distância de 644 km.

Recentemente, utilizando marcadores AFLP, Pocovi et al. (2010) avaliaram 30 isolados de *P. melanocephala* agrupados em 3 diferentes regiões na Argentina, obtendo uma variabilidade genética alta, porém, sem ocorrer diferenciação entre as populações estudadas. Um estudo com *P. kuehni*, utilizando a regiões do rDNA, demonstrou um baixo nível de variabilidade entre 28 isolados da Austrália, entretanto, houve diferenças significativas entre estes isolados e os de Papua Nova Guiné, Indonésia e China (BRAITHWAITE et al., 2009). Glynn et al. (2010) buscando compreender a dispersão de *P. kuehni* a partir da Austrália para as Américas, identificou um polimorfismo na região ITS1, gerando dois alelos diferentes (183A e 183G), e dentre esses alelos, apenas o 183A predomina no hemisfério Oeste. Estes autores discutem que há duas formas de chegada do alelo 183A ao hemisfério Oeste: transporte de material infectado da Austrália e Ásia seguido de rápida dispersão e dispersão aérea ao longo do tempo proveniente do hemisfério Leste.

Para um melhor entendimento da diversidade, bem como para um estudo mais detalhado de populações de *P. melanocephala*, é necessário um número maior de locos microssatélites juntamente com um número maior de indivíduos por populações dentro e fora do Brasil. Assim, uma visão geral da diversidade populacional deste patógeno poderá ser melhor conhecida.

5.3 Caracterização da variabilidade patogênica de *P. melanocephala*

As avaliações da severidade utilizando as cultivares 'SP70 1143' de reação susceptível e 'RB83 5486' de reação intermediária, não apresentaram variações significativas de patogenicidade quando inoculadas artificialmente com os isolados P261, P273 e P306 das regiões de Goianésia-GO, Jáú-SP e Ribeirão Preto-SP respectivamente (Figura 15 e 16). Entretanto, a severidade dos sintomas entre as cultivares estudadas apresentou diferenças (Figura 17). Para a variedade 'SP70 1143' a média da área foliar infectada foi de 2,8%, e para a 'RB83 5486' a média da área foliar infectada foi relativamente menor (0,73%). Esta diferença de severidade pode estar correlacionada às características de resistência genética das variedades a ferrugem marrom, visto que a variedade 'SP70 1143' é considerada suscetível e a variedade 'RB83 5486' considerada intermediária frente às reações de ferrugem.

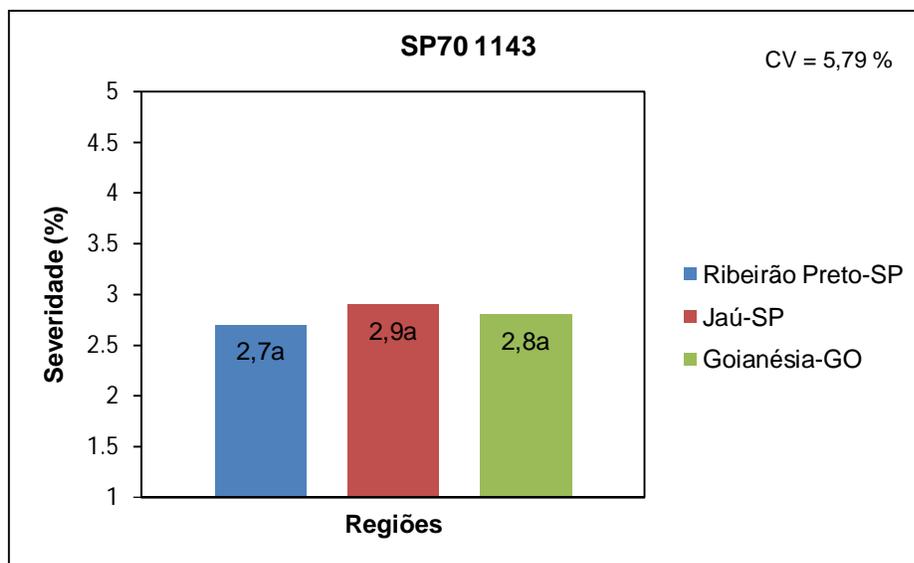


Figura 15 – Severidade da ferrugem (porcentagem de área foliar afetada) gerada por populações de *P. melanocephala* de diferentes localidades na variedade SP70 1143. (Letras iguais nas barras indicam ausência de diferenças significativas entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade).

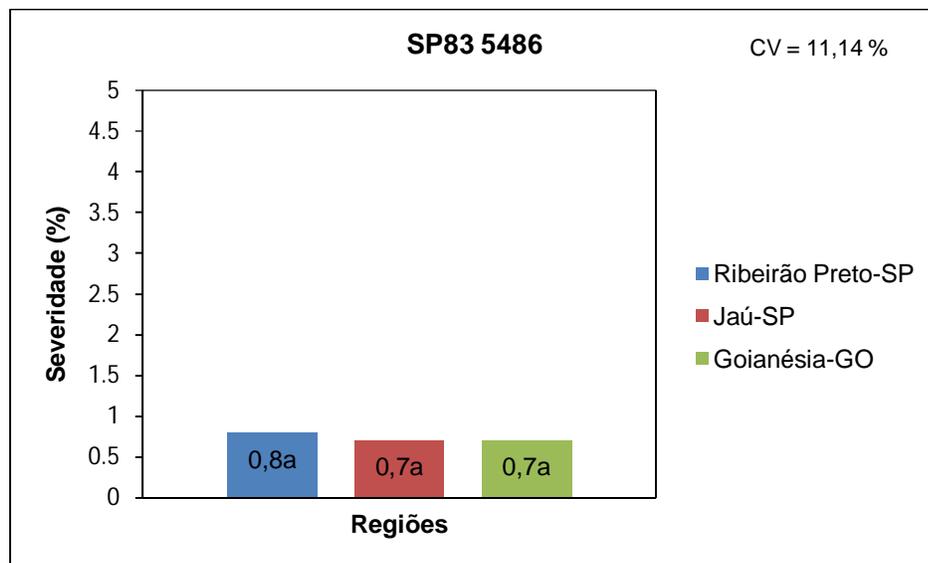


Figura 16 – Severidade da ferrugem (porcentagem de área foliar afetada) gerada por populações de *P. melanocephala* de diferentes localidades na variedade SP70 1143. (Letras iguais nas barras indicam ausência de diferenças significativas entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade).

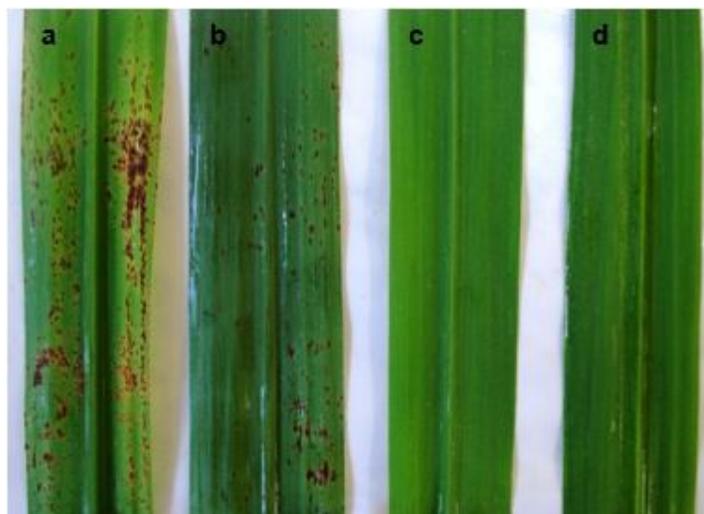


Figura 17 – Inoculação Ferrugem marrom em segmentos foliares. a – 'SP701143', b – 'RB83 5486', c – controle negativo 'SP701143', d – controle negativo 'RB83 5486'.

Em São Paulo, isolados de *P. melanocephala* foram identificados apresentando variabilidade para agressividade e severidade à cana-de-açúcar, sendo que isolados da região de Jaú-SP destacaram-se pela maior agressividade a todas as cultivares inoculadas, sugerindo a existência de raças de ferrugem marrom (RAGO, 2005). Nos Estados Unidos, a existência de raças de *P. melanocephala* foi identificada pela ocorrência de alterações nas reações da doença em uma série de variedades resistentes após alguns anos de seu lançamento. Este estudo sugeriu a existência de pelo menos 4 raças de ferrugem marrom, o que indicaria, junto a observações de campo que possíveis variantes patogênicos estariam surgindo em áreas canavieiras (SHINE; COMSTOCK; DEAN, 2005). Entretanto, Taylor (1992) na Austrália descreveu a ausência de raças fisiológicas utilizando inoculações em folhas destacadas de doze cultivares com isolados de *P. melanocephala* coletados durante nove anos em quatro regiões de Queensland. As constantes variações na severidade de ferrugem marrom neste país foram atribuídas às mudanças nas condições climáticas, e não ao surgimento de novas raças.

As condições climáticas são reconhecidamente importantes para o aparecimento e a intensidade de epidemias causadas por ferrugem. Para que a doença ocorra, é necessário a presença de um hospedeiro suscetível, um patógeno infectivo e um ambiente favorável, construindo o que se chama de “triângulo da doença”, sendo os vértices interdependentes (AGRIOS, 2005). Mudanças no clima foram responsáveis por epidemias históricas de grande importância econômica, como a requeima da batata na Irlanda em 1845; o ergotismo dos cereais no Reno em 857 e na França em 994, 1089 e 1951; e a helmintosporiose do arroz em Bengala em 1942 (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995).

Segundo Braithwaite et al. (2009) e Magarey et al. (2001) clones resistentes podem aumentar sua suscetibilidade no tempo, graças à variabilidade da população do patógeno, o que permite inferir que há possibilidade de ocorrência de raças do patógeno e que a resistência das cultivares podem mudar futuramente.

Alguns estudos têm demonstrado que a herdabilidade em cana-de-açúcar da resistência à ferrugem é alta, sendo regida por um ou poucos genes de efeito maior (ASNAGHI et al., 2001; TAYLOR, 1992). Entretanto, outros trabalhos evidenciam que existem outros genes de efeito menor, além dos de efeito maior que atuam quantitativamente na resistência à ferrugem (RAMDOYAL et al., 2000). Assim sendo, a resistência da cana-de-açúcar à ferrugem parece ser conferida pelo somatório desses genes, com os genes de efeito maior possuindo maior efeito na resistência.

A investigação da variabilidade genética de ferrugem marrom e a identificação e priorização de regiões com clima favorável a doença são de extrema importância para o

sucesso de programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, principalmente a longo prazo, auxiliando no desenvolvimento de novas variedades.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que as populações de ferrugem marrom estudadas não representam raças distintas. Assim, o melhoramento genético visando resistência a ferrugem marrom pode ser conduzida em locais com clima altamente favorável a ocorrência do patógeno, ou ainda, em ambientes controlados, por meio da inoculação artificial, com os resultados possivelmente representativos para outras regiões. A adoção de tais procedimentos contribuirá para contornar os problemas advindos da liberação de variedades que poderão apresentar alterações no perfil de resistência a ferrugem marrom após o seu lançamento. Estudos complementares, com maior número de isolados, locais e marcadores poderão ser realizados para confirmar os resultados obtidos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- a) Os urediniósporos coletados em diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar puderam ser identificados morfológicamente por microscopia óptica, sendo classificados a nível de espécie em *P. melanocephala* ou *P. kuehni*;
- b) O método utilizado para enriquecimento da biblioteca foi eficiente em isolar locos microssatélites para *P. melanocephala*;
- c) A variabilidade genética dos isolados de *P. melanocephala* foi relativamente alta;
- d) O estudo preliminar da diversidade genética de *P. melanocephala*, não demonstrou diferenças significativas entre as populações de Alagoas, Goiás, Minas Gerais e São Paulo;
- e) Os isolados provenientes de três regiões importantes de cultivo de cana-de-açúcar não demonstraram diferenças significativas para agressividade empregando duas cultivares ('SP70 1143' susceptível e 'RB83 5486' intermediária).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. Environmental effects on the development of infectious plant disease. In: _____. (Ed.). **Plant pathology**. 5. ed. London: Elsevier, 2005. cap. 7, p. 249-263.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley and Sons, 1996. 868 p.
- ALJANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 17, p. 1–8, 1999.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; ARDOSO, C.O.N.; MORAES, V.A.; FERNANDES, C.R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v. 39, p. 13-16, 1987.
- ANDERSON, J.A.; CHURCHILL, G.A.; AUTRIQUE, J.E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, Ottawa, v. 36, p. 181-186, 1993.
- ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R 570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 282-286, 2001.
- ATALLAH, Z. K.; LARGET, B.; CHEN, X.; JOHNSON, D. A. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the 97 Columbia Basin of Washington State. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, p. 737-742, 2004.
- BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3759-3767, 2007.
- BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J.; SANGUINO, A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 9, p. 1170, 2010.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia I**. 3. ed. Piracicaba: Ceres, 1995. cap. 1, p. 2-12.
- BHARGAVA, A.; FUENTES, F.F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 44, p. 250–266, 2010.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374 p.
- BRAITHWAITE, K.S.; CROFT, B.J.; MAGAREY, R.C.; SCHARASCHKIN, T. Phylogenetic placement of the sugarcane Orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 38, v. 6, p. 322-340, 2009.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 6, n. 30, p. 46-50, 2003.

BUSO, G.S.C. **Análise genética de espécies silvestres de arroz (*Oryza spp*) nativas do Brasil:** estrutura de populações, diversidade genética e relações filogenéticas utilizando marcadores moleculares. 1998. 324 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1998.

CAMARGO, L.E.A. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 455-469.

CASELA, C.R.; GUIMARÃES, F.B. Especialização fisiológica de fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 75-93, 1996.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Mapa de ocorrências da ferrugem alaranjada.** Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=507:ferrugem-alaranjada-da-cana-de-acucar-mapa-de-ocorrencias>. Acesso em: 12 ago. 2011.

CHAMBERS, J.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellite: Consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, London, v. 126, p. 455-476, 2000.

CRESTE, S.; BENATTI, T.R.; ORSI, M.R.; RISTERUCCI, A.M.; FIGUEIRA, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 6, p. 303-306, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Heidelberg, v. 19, p. 299-306, 2001.

CRISTANCHO, M.; ESCOBAR, C. Transferability of SSR markers from related Uredinales species to the coffee rust *Hemileia vastatrix*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 4, p. 1186-1192, 2008.

CUMMINS, G.B. **The Rust fungi of cereals, grasses and bamboos.** Berlin: Springer-Verlag, 1971.

DAUGROIS, J.H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J.Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 92, p. 1059-1064, 1996.

DAVIS, J.E.; KUBISIAK, T.L.; MILGROOM, M.G. Polymorphic sequence-characterized codominant loci in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, n.2, p.195–197, 2005.

DIXON, L.J.; CASTLEBURY, L.A.; AIME, M.C.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. **Mycological Progress**, Washington, DC, v. 9, p. 459–468, 2010.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; DELMOTTE, F.; BARRÈS, B.; CARLEIR, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 933-949, 2007.

EGAN, B.T. A name change for the rust pathogen. **Sugarcane Pathologists' Newsletter**, Honolulu, v. 22, p. 1, 1979.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 16, p. 551-558, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília, DF: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of Biological Sciences**, London, v. 263, n. 1367, p. 209-215, 1996.

FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. Palestra. **O Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 29-32, 2001. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v63_1/figueiredo1.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2010.

GARCIA, E.O.; CASAGRANDE, M.V.; RAGO, A.M.; MASSOLA, N.S. Preservação de urediniosporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2007.

GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C. Molecular identification of orange rust (*Puccinia kuehnii*) in Florida. Canal Point, Florida: USDA, Agricultural Research Service, 2007. **Meeting abstract**. Disponível em: <https://ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=215371> Acesso em: 14 mai. 2011.

GLYNN, N.C.; DIXON, L.J.; CASTLEBURY, L.A.; SZABO, L.J.; COMSTOCK, J.C. PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehnii* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical distribution in *P. kuehnii*. **Plant Pathology**, London, v. 59, p. 703-711, 2010.

GOUDET, J. **FSTAT**. Version 2.9.3. Lausanne: Institute of Ecology, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T.A. Novel repeat element with Z-DNAforming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes. **Proceedings National Academy Science of the USA**, Washington, DC, v. 79, p. 465-469, 1982.

HARRINGTON, T.C.; STEIMEL, J.; WORKNEH, F.; YANG, X.B. Characterization and distribution of two races of *Phialophora gregata* in the North- Central United States. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 901-912, 2003.

JOHANSSON, M.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. Cloning and characterization of highly Polymorphic porcine microsatellites. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 83, p. 196-198, 1992.

KAROAGLU, H.; LEE, C.M.Y.; MEYER, W. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 22, p. 639-649, 2005.

KELLY, P.L.; REEDER, R.; TAFESSE, A. First confirmed report of sugarcane common rust (*Puccinia melanocephala*) in Ethiopia. **New Disease Reports**, Reading, v. 19, p. 8, 2009. Disponível em: <<http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=19008>>. Acesso em: 13 jul. 2011.

KNAPOVA, G.; GISI, U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. **Plant Pathology**, London, v. 51, p. 641-653, 2002.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 44, p. 397-401, 1989.

MAGAREY, R.C. Orange rust. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 121-125.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MILLER, M. **Tool for population genetic analyses (TFPGA)**. Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic. 1997. Disponível em: <<http://marks-geneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

MILGROOM, M.G.; PEEVER, T.L. Population biology of plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 608-617, 2003.

MORDUE, J.W.M. Urediniospore ornamentation in the sugarcane pathogens *Puccinia kuehnii* and *P. melanocephala*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 84, n. 4, p. 758-760, 1985.

PASCHOLATI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; LEITE, B.; SCHWANESTRADA, K.R.F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 1-47, 1998.

PASSAGLIA, L.M.P. Mutação, mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (Org.). **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p. 116-158.

POCOVI, M.I.; RECH, G.E.; COLLAVINO, N.G.; CARUZO, G.B.; RIOS, R.; MARIOTTI, J.A. Molecular diversity of *Puccinia melanocephala* populations. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, p. 769-775, 2010.

PURDY, L.H.; LIU, L.; DEAN, J.L. Sugarcane rust, a newly important disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 1292-1296, 1983.

RABOIN, L.M.; SELVI, A.; OLIVEIRA, K.M.; PAULET, F.; CALATAYUD, C.; ZAPATER, M.F.; BROTTIER, P.; LUZARAN, R.; GARSMEUR, O.; CARLIER, J.; D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 64-76, 2007.

RAGO, A.M. **Variabilidade patogênica de *Puccinia melanocephala* e *Ustilago citamniae* no estado de São Paulo**. 2005. 42 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

RAID, R.N.; COMSTOCK, J.C. 2006. **Sugarcane rust disease**. Hastings, FL: University of Florida, IFAS Extension, 2009. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/SC007>>. Acesso em: 12 jul. 2011.

RALOFF, J. **ILL Winds** – dust storms ferry toxic agents between countries and even continents: sugarcane rust. **Science News**, Washington, DC, v. 160, n. 14, p. 218, 2001. Disponível em: <http://www.phschool.com/science/science_news/articles/ill_winds.html>. Acesso em: 3 mar. 2009.

RAMDOYAL, K.; SULLIVAN, S.; LIM-SHIN-CHING, L.C.Y.; BADALOO, G.H.; SAUMTALLY, S.; DOMAINGUE, R. The genetics of rust resistance in sugar cane seedling populations. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 557-563, 2000.

RAMOUTHAR, P.V. **Studies on brown rust (*Puccinia melanocephala*) of sugarcane in South Africa**. 2009. 156 f. Thesis (M.Sc.) - Faculty of Science and Agriculture, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, Republic of South Africa, 2009.

REGNER, L.P. Transposons. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. (Org.). **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. p. 159-182.

RIBEIRO DO VALE, F.X.; ZAMBOLIM L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, Brasil, Imprensa Universitária v. 2, p. 83-179, 1997.

ROBINSON, R. **Plant pathosystem**. Berlin: Springer-Verlag, 1976.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 1989. 210p.

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, 1989. p. 189-210.

SACIOTO, R.F.Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SANTOS, A.S. Doenças causadas por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; LANDELL, M.G.A.; VASCONCELOS, A.C.M. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. p. 423-435.

SATHE, A.V. Nomenclatural revision of the common rust fungus affecting sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 40, p. 42-43, 1971.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 10, p. 1269-1274, 1998.

SHINE JUNIOR, J.M.; COMSTOCK, J.C.; DEAN, J.L. Comparison of five isolates of sugarcane brown rust and differential reaction on six sugarcane clones. **Sugar Cane International**, Kent, UK, v. 23, p. 24-29, 2005. Disponível em: <<http://issct.intnet.mu/BiologyAbsPapers2005.htm>>. Acesso em: 3 mar. 2009.

SILVA, J.R.Q.; FIGUEIRA, A.; PEREIRA, G.A.G.; ALBUQUERQUE, P. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Molecular Ecology Resources**, New York, v. 8, p. 783-785, 2008.

SOTOMAYOR, I. A.; PURDY, L. H.; TRESE, A. T. Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 73, p. 695-699, 1983.

TAYLOR, P.W.J. Evidence for the existence of a single race of common rust caused by *Puccinia melanocephala* in Australian sugarcane cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 43, p. 443-460, 1992.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 185-196.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, Woodbury, v. 10, p. 967-981, 2000.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção de cana-de-açúcar no Brasil**. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 11 de ago. 2011.

zasVIRTUDAZO, E.V.; NOJIMA, H.; KAKISHIMA, M. Phylogenetic analysis of sugarcane rust based on sequences of ITS, 5.8S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. **Journal of General Plant Pathology**, Heidelberg, v. 67, p. 28-36, 2001a.

VIRTUDAZO, E.V.; NOJIMA, H.; KAKISHIMA, M. Taxonomy of *Puccinia melanocephala* species causing rust diseases on sugarcane. **Mycoscience**, Tokyo, v. 42, p. 167-175, 2001b.

WANG, X.; MULOCK, B.; GUUS, B.; MCCALLUM, B. Development of EST-derived simple sequence repeat markers for wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* Eriks. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 32, n. 1, p. 98-107, 2010.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322 p.

WHITTLE A.M.; HOLDER D. The origin of the current rust epidemic in the Caribbean. **Sugarcane Pathologists' Newsletter**, Honolulu, v. 24, p. 4-7, 1980.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZHONG, S.; YANG, B.; PURI, K.D. Characterization of *Puccinia psidii* isolates in Hawaii using microsatellite DNA markers. **Journal of General Plant Pathology**, Heidelberg, v. 77, p. 178-181, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Arquivo de entrada no programa FSTAT.

4 4 252 3

loc-1

loc-2

loc-3

loc-4

1 240240 195185 250248 240240
1 246246 198185 250250 240220
1 246246 198185 250250 249240
1 246238 198185 252248 245240
1 240240 198198 250248 240240
1 240238 198198 250248 245245
2 000000 198185 250246 249240
2 246246 195185 250250 240235
2 240240 198185 250248 249240
3 000000 185185 250246 249249
3 240232 195190 250250 240240
4 248238 198198 250248 240240
4 246240 198185 250250 240240
4 246246 195185 250248 240220
4 248248 198185 250248 240240
4 240240 195185 250248 249240
4 246246 198185 250248 249240
4 248248 198185 250248 240240
4 240240 195185 252252 240240
4 240240 198185 252248 249240
4 240240 198185 250248 240240
4 246246 195185 250246 249240
4 246246 195185 250248 249240
4 000000 195185 252248 240240
4 246246 198185 250250 249240
4 246238 185185 250248 249240
4 246246 195185 250246 240220
4 240240 195185 250250 240240
4 246246 185185 250250 240240
4 240232 195195 250250 240240
4 240240 198198 250250 245240
4 240240 190185 252252 240240
4 246246 198185 250248 245240
4 246246 195195 250248 249220

APÊNDICE B – Arquivo de entrada no programa TFPGA.

1,1,1, 22,24,23,33
1,1,2, 22,14,22,35
1,1,3, 22,14,22,13
1,1,4, 24,14,13,23
1,1,5, 33,11,23,33
1,1,6, 34,11,23,22
1,2,1, 00,14,24,13
1,2,2, 22,24,22,34
1,2,3, 33,14,23,13
1,3,1, 00,44,24,11
1,3,2, 34,23,22,33
1,4,1, 14,11,23,22
1,4,2, 23,14,22,33
1,4,3, 22,24,23,35
1,4,4, 11,14,23,33
1,4,5, 33,24,23,13
1,4,6, 22,14,23,13
1,4,7, 11,14,23,33
1,4,8, 33,24,11,33
1,4,9, 34,14,13,13
1,4,10, 33,14,23,33
1,4,11, 22,24,24,13
1,4,12, 22,24,23,13
1,4,13, 00,24,13,33
1,4,14, 22,14,22,13
1,4,15, 24,44,23,13
1,4,16, 11,24,24,35
1,4,17, 33,24,22,33
1,4,18, 22,44,22,33
1,4,19, 35,22,22,33
1,4,20, 33,11,22,00
1,4,21, 33,34,11,33
1,4,22, 22,14,23,00
1,4,23, 22,22,23,15
0,0,0, 00,00,00,00

APÊNDICE C – Arquivo de entrada no programa NTSYS.pc.

2 34L 34L 0

P255GoianesiaGO P261GoianesiaGO P264GoianesiaGO P267GoianesiaGO P270GoianesiaGO P312GoianesiaGO P219PompeuMG P231PatosMG P249PatosMG P315LajeAL P318LajeAL P201PontalSP P204StaLuciaSP P207MococaSP P210ConchalSP
P213SJBoaVistaSP P217BatataisSP P222LençoisSP P225ItapopolisSP P228SJBarraSP P234PindoramaSP P237CatanduvaSP P240StaLuciaSP P243OlimpiaSP P246GuairaSP P252ItapopolisSP P258JauSP P273JauSP P300JauSP P303RibeiraoPSP
P306RibeiraoPSP P309RibeiraoPSP P321JaboticabalSP P324OrindiuvaSP

0.0000
0.1875 0.0000
0.1875 0.0625 0.0000
0.2500 0.3125 0.3125 0.0000
0.4375 0.4375 0.4375 0.3750 0.0000
0.6250 0.5000 0.5000 0.2500 0.3125 0.0000
0.2500 0.1667 0.0833 0.2500 0.2500 0.4167 0.0000
0.1250 0.1250 0.1250 0.3750 0.5625 0.6250 0.2500 0.0000
0.3750 0.3750 0.3125 0.3125 0.1250 0.3125 0.0833 0.4375 0.0000
0.5000 0.4167 0.2500 0.5000 0.7500 0.7500 0.1667 0.4167 0.2500 0.0000
0.3125 0.3750 0.3750 0.4375 0.3125 0.5000 0.3333 0.3125 0.3125 0.6667 0.0000
0.6250 0.5000 0.5000 0.2500 0.4375 0.0625 0.4167 0.6250 0.4375 0.7500 0.5625 0.0000
0.1875 0.1250 0.1250 0.3125 0.1875 0.4375 0.1667 0.1875 0.1875 0.5000 0.1875 0.5000 0.0000
0.0625 0.1250 0.1875 0.2500 0.5000 0.5625 0.2500 0.1250 0.3750 0.4167 0.3750 0.5625 0.2500 0.0000
0.3125 0.3750 0.3750 0.3125 0.3125 0.5000 0.1667 0.4375 0.3125 0.5000 0.3750 0.3750 0.2500 0.3750 0.0000
0.3125 0.4375 0.3750 0.3750 0.2500 0.4375 0.1667 0.3750 0.0625 0.2500 0.2500 0.5625 0.2500 0.3125 0.3750 0.0000
0.1250 0.1250 0.0625 0.1875 0.3750 0.4375 0.0833 0.1875 0.2500 0.2500 0.4375 0.4375 0.1875 0.1250 0.3125 0.3125 0.0000
0.3125 0.3750 0.3750 0.3125 0.3125 0.5000 0.1667 0.4375 0.3125 0.5000 0.3750 0.3750 0.2500 0.3750 0.0000 0.3750 0.3125 0.0000
0.4375 0.6250 0.6250 0.3750 0.3750 0.6875 0.4167 0.5625 0.3125 0.6667 0.3750 0.8125 0.3750 0.5000 0.5000 0.2500 0.5625 0.5000 0.0000
0.3750 0.4375 0.3750 0.1250 0.2500 0.3125 0.1667 0.5000 0.1250 0.3333 0.3750 0.3750 0.3125 0.3750 0.3125 0.1875 0.2500 0.3125 0.2500 0.0000
0.3125 0.3750 0.3750 0.3125 0.0625 0.3750 0.1667 0.4375 0.0625 0.5000 0.2500 0.5000 0.1250 0.3750 0.2500 0.1250 0.3125 0.2500 0.2500 0.1875 0.0000
0.1250 0.1875 0.1250 0.3125 0.5625 0.6250 0.0833 0.1250 0.3750 0.1667 0.3750 0.6250 0.2500 0.1250 0.4375 0.3125 0.1250 0.4375 0.5000 0.3750 0.4375 0.0000
0.0625 0.1875 0.1250 0.2500 0.5000 0.5625 0.1667 0.1250 0.3125 0.2500 0.3750 0.5625 0.2500 0.0625 0.3750 0.2500 0.0625 0.3750 0.5000 0.3125 0.3750 0.0625 0.0000
0.0833 0.4167 0.4167 0.1667 0.3333 0.6667 0.3333 0.3333 0.2500 0.5833 0.3333 0.6667 0.3333 0.1667 0.1667 0.2500 0.1667 0.0833 0.1667 0.1667 0.2500 0.1667 0.0000
0.1875 0.0625 0.0000 0.3125 0.4375 0.5000 0.0833 0.1250 0.3125 0.2500 0.3750 0.5000 0.1250 0.1875 0.3750 0.3750 0.0625 0.3750 0.6250 0.3750 0.1250 0.1250 0.4167 0.0000
0.1875 0.2500 0.1875 0.1875 0.5000 0.5000 0.1667 0.2500 0.2500 0.1667 0.3750 0.5000 0.2500 0.1875 0.3125 0.2500 0.1250 0.3125 0.5000 0.1875 0.3125 0.1875 0.1250 0.2500 0.1875 0.0000
0.3750 0.3750 0.4375 0.4375 0.5625 0.6250 0.1667 0.3750 0.4375 0.3333 0.3750 0.5000 0.3750 0.3125 0.1875 0.3750 0.4375 0.1875 0.5000 0.4375 0.4375 0.3125 0.3750 0.2500 0.4375 0.3750 0.0000
0.3125 0.3750 0.3750 0.5000 0.2500 0.5625 0.2500 0.3125 0.1875 0.5000 0.1250 0.6875 0.1250 0.3750 0.3750 0.1250 0.4375 0.3750 0.2500 0.3750 0.1250 0.3750 0.2500 0.3750 0.3750 0.3750 0.0000
0.1250 0.1250 0.1250 0.3750 0.5625 0.7500 0.2500 0.1250 0.4375 0.4167 0.3750 0.7500 0.1250 0.1875 0.3750 0.4375 0.1875 0.3750 0.5625 0.5000 0.3750 0.1875 0.1875 0.3333 0.1250 0.1875 0.4375 0.3125 0.0000
0.3125 0.4375 0.4375 0.5625 0.3750 0.6250 0.4167 0.3125 0.3750 0.7500 0.1250 0.6875 0.2500 0.3750 0.4375 0.2500 0.5000 0.4375 0.3750 0.5000 0.3125 0.3750 0.3750 0.3333 0.4375 0.5000 0.3750 0.1250 0.4375 0.0000
0.6667 0.4167 0.4167 0.5833 0.0833 0.1667 0.2500 0.5833 0.1667 0.6250 0.3333 0.3333 0.1667 0.6667 0.5000 0.3333 0.5000 0.5000 0.5833 0.4167 0.1667 0.6667 0.6667 0.7500 0.4167 0.6667 0.6667 0.2500 0.6667 0.4167 0.0000
0.5000 0.6250 0.6250 0.3750 0.3750 0.6875 0.4167 0.6250 0.3125 0.6667 0.3750 0.8125 0.3750 0.5625 0.5000 0.3125 0.5625 0.5000 0.0625 0.2500 0.2500 0.5625 0.5625 0.1667 0.6250 0.5000 0.5625 0.3125 0.5625 0.5000 0.5833 0.0000
0.0833 0.0833 0.0833 0.1667 0.4167 0.3333 0.1250 0.1667 0.3333 0.2500 0.5000 0.3333 0.1667 0.0833 0.3333 0.4167 0.0000 0.3333 0.6667 0.3333 0.3333 0.1667 0.0833 0.2500 0.0833 0.1667 0.5000 0.5000 0.1667 0.5833 0.5000 0.6667 0.0000
0.2500 0.3125 0.3125 0.4375 0.6875 0.6250 0.4167 0.2500 0.5000 0.5000 0.5000 0.6250 0.5000 0.1250 0.6250 0.3750 0.2500 0.6250 0.6875 0.5000 0.6250 0.1875 0.1250 0.4167 0.3125 0.3750 0.4375 0.5625 0.5000 0.4375 0.7500 0.8125 0.2500 0.0000