



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FABIANA TIBOLLA

**MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS
DE *Puccinia kuehnii***

Londrina
2012

FABIANA TIBOLLA

**MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS
DE *Puccinia kuehnii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giovanetti
Canteri
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Conte e
Castro

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T554m Tibolla, Fabiana.
Métodos para preservação de urediniósporos de *Puccinia kuehnii* / Fabiana Tibolla. – Londrina, 2012.
65 f. : il.
Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri.
Coorientador: Ana Maria Conte e Castro.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar – Doenças e pragas – Teses. 2. Cana-de-açúcar – Cultivo – Teses. 3. Puccinia – Teses. 4. Fungos-da-ferrugem – Teses. I. Canteri, Marcelo Giovanetti. II. Castro, Ana Maria Conte e. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 633.61

FABIANA TIBOLLA

MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE
Puccinia kuehnii

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. João Tavares Bueno
UENP – PR

Prof. Dr. Amarildo Pasini
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Seiji Igarashi
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete
UEL – Londrina – PR

Londrina, 23 de fevereiro de 2012.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares,
Meus pais Sonia e
Deolindo,
Ao meu irmão Renato,
Meus tios e tias,
Meus avôs e avós,
Que tiveram paciência
comigo nas horas difíceis,
Que me aconselharam,
Deram força,
Amor,
E me apoiaram
incondicionalmente...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida e pelo amor. À minha família, por todo amor, e compreensão.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Giovanetti Canteri, pela constante orientação neste trabalho, pelo apoio, compreensão e valiosos conselhos. A minha co-orientadora Dr^a Ana Maria Conte e Castro, pelo apoio, amizade e orientação.

Aos professores da Fundação Faculdades Luiz Meneghel, responsáveis por minha formação profissional e ética. Aos professores do mestrado, Dr^a Débora Cristina Santiago, Dr. Seiji Igarashi, Dr^a Inês Cristina de Batista Fonseca, Dr. Amarildo Pasini, Dr^a Maria Isabel Balbi Peña, Dr^a Maria de Fátima Guimarães.

Aos técnicos de laboratório José, Marcio, João e Davi. À secretária da pós-graduação Weda Westin.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida. A Usina Bandeirantes de Açúcar e Álcool, USIBAN, que me concedeu a permissão para coletar as amostras de folhas com ferrugem alaranjada.

Aos colegas da Pós-graduação: Giovani, Mayra, Mariana, Gilberto, Camila, Fernando, Idenize, Ciro, Thiago, Roger, Janaina, Viviane, Cesar, Emerson. Aos amigos do laboratório de Fitopatologia: Giovani, Ciro, Douglas, Leonardo, Camila, Fernando, Natalia, Camila Scolin, Debora, e aos demais não mencionados. Obrigado pela ajuda e amizade. As amigas de república, Eloisa, Gabriela, Juliana, Tatiana, Caroline Altare, Mariana, Natalia.

Ao Marcos José Laurindo, pelo carinho, amor, compreensão, e principalmente paciência, demonstrados a mim, em mais uma etapa importante da minha vida.

As minhas amigas: Gisele, Gislaine, Maislian, Vanessa, Thais,

Fernanda, pela amizade compreensão incentivo e companheirismo. A todos os amigos, que fiz ao longo de minha vida que me ajudaram e me apoiaram de alguma forma. Em especial a Vanessa, pelas valiosas correções. Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

O amor é paciente,
O amor é prestativo
Não é invejoso, não se ostenta,
Não se incha de orgulho.
Nada faz de inconveniente,
Não procura seu próprio interesse,
Não se irrita, não guarda rancor.
Não se alegra com a injustiça
Mas se regozija com a verdade.
Tudo desculpa tudo crê,
Tudo espera tudo suporta.
(Cor 1 13, 4-7)

"...Seja firme e corajoso...
Apenas seja firme e corajoso, para cumprir toda
lei.....
Não se desvie dela, nem para direita nem para
esquerda,
e você terá sucesso em todos os seus
empreendimentos..."
(Jos 1, 6-7)

"Nada acontece sem antes ter sido um sonho..."
Carl Sandburg

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará
a seu tamanho original"
Albert Einsten

TIBOLLA, Fabiana. **Métodos para preservação de urediniósporos de *Puccinia kuehnii***. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Dentre as doenças da cultura da cana-de-açúcar no Brasil destacam-se as ferrugens. Atualmente, a mais preocupante delas é a ferrugem alaranjada devido a seu potencial de dano. Os objetivos foram: testar períodos de viabilidade dos urediniósporos, métodos de preservação e influência de extratos aquosos na germinação *in vitro* de urediniósporos de *Puccinia kuehnii*. O trabalho foi subdividido em dois experimentos (E1 e E2) e estes em dois bioensaios (B1 e B2). No E1 avaliou-se a viabilidade dos urediniósporos em função do período (dias) após a coleta das folhas, e a influência de extratos aquosos de folhas de cana-de-açúcar na germinação *in vitro* dos urediniósporos de *P. kuehnii*. Utilizaram-se urediniósporos de ferrugem alaranjada provenientes das variedades SP 89 1115 e RB 72 454. O E2 foi realizado fazendo-se a extração dos urediniósporos de *P. kuehni* com o auxílio de bomba a vácuo. Estes foram acondicionados em tubos de microcentrífuga, e submetidos ha diferentes métodos para preservação de urediniósporos. O delineamento experimental foi em esquema fatorial. Para as avaliações de ambos os experimentos foram preparadas suspensões de urediniósporos em água destilada. Alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹). Avaliou-se a germinação de 200 urediniósporos por placa. Os resultados do E1, no B1, demonstraram que a porcentagem de germinação dos urediniósporos extraídos da variedade RB72 454 iniciou-se em 93,1% no dia da coleta e reduziu para 32,4% aos 16 dias, enquanto que para a variedade SP89 1115 foi de 26,4% para 24,8%, respectivamente. No B2 a porcentagem de germinação dos urediniósporos, que receberam a suspensão aquosa da variedade resistente, foram significativamente ($p < 0,05$) inferiores aquelas que receberam a suspensão aquosa da variedade suscetível. No E2, onde B1 recebeu grânulo de sílica gel, ao contrário de B2, os resultados demonstraram que a viabilidade decresceu em função do tempo, sendo que os melhores tratamentos atingiram 27,6% e 6,6% aos 30 dias, e 12,0% e 1,9% aos 60 dias, para B1 e B2, respectivamente. Aos 30 dias, para B1, o melhor método para preservação foi a desidratação em sílica gel, seguido de armazenamento a 20°C. Aos 180 dias, o método de desidratação em sílica gel, seguido do armazenamento a -80°C foi o único que apresentou urediniósporos viáveis (1,2%). Em B2, para períodos superiores a 30 dias, o melhor método de preservação foi a desidratação em sílica gel, armazenamento a 5°C e sem reidratação. Este método apresentou melhor porcentagem de germinação aos 120 dias (0,4%). A inclusão do grânulo de sílica gel no tubo de microcentrífuga preservou e permitiu a recuperação de urediniósporos viáveis aos 180 dias.

Palavras-chave: Ferrugem alaranjada. *Saccharum officinarum*. Doenças da cana-de-açúcar. Preservação de urediniósporos.

TIBOLLA, Fabiana. **Methods preservation uredinióspores of *Puccinia kuehnii***. 2012. 65 f. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Among the diseases of the culture of sugarcane in Brazil stands out the rusts. Currently, the most worrying is the orange rust due their potential for harm. The objectives were to test the feasibility periods of urediniósporos, preservation methods and influence of aqueous extracts in the *in vitro* germination urediniospores of *Puccinia kuehnii*. The work was divided in two experiments (E1 and E2), and this in two bioassays (B1 and B2). In E1 was assessed the viability of urediniospores as a function of time (days) after collection of the leaves, and influence of aqueous extracts of leaves of sugarcane in the *in vitro* germination of urediniospores of *P. kuehnii*. It was used orange rust urediniospores from the varieties SP89 1115 and RB 72 454. E2 was accomplished making the extraction of urediniospores of *P. Kuehnii* with the aid of vacuum bomb. These were placed in microcentrifuge tubes, and subjected to different methods for the preservation of urediniospores. The experimental design was a factorial arrangement. The evaluations of both experiments were made after prepare urediniospores suspensions in distilled water. Aliquots of 0.1 mL were transferred to Petri dishes containing agar-water (15 g L⁻¹). It was evaluated the germination of 200 urediniospores per plate. The results of E1 at B1 demonstrated that the percentage of germination of urediniospores extracted from the variety RB72 454 started in 93.1% on the day of collection and decreased to 32.4% at 16 days, while for variety SP89 1115 was 26.4% to 24.8%, respectively. In B2 the percentage of germination of urediniospores, which received aqueous suspension of the resistant variety, were significantly ($p < 0.05$) lower than those who received the aqueous suspension of the susceptible variety. In E2, were B1 received a silica gel granule, unlike B2, the results showed that the viability decreased function of time, the best treatments reached 27.6% and 6.6% at 30 days, and 12.0% and 1.9% at 60 days for B1 and B2, respectively. At 30 days, the best methods of preservation in B1, was dehydration in silica gel, followed by storage at 20°C. At 180 days, the dehydration methods in silica gel followed by storage at -80°C was the only who presented viable urediniospores (1.2%). In B2, for periods longer than 30 days, the best preservation method was dehydration, stored at 5°C, out rehydration. These methods showed better germination percentage at 120 days (0.4%). The inclusion of silica gel granules in microcentrifuge tube, increased for 23.6 percentage points the preservation of urediniospores in 30 days of storage and allowed recovery at 180 days.

Keywords: Orange rust. *Saccharum officinarum*. Diseases of sugarcane. Preservation of urediniospores.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento em câmara úmida, na temperatura de 20°C para variedade de cana-de-açúcar SP 89 1115.....32
- Figura 2** – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento em câmara úmida a temperatura de 20°C para variedade de cana-de-açúcar RB72 454.....33

ARTIGO B

- Figura 1** – Equipamento utilizado na extração dos urediniósporos de *P. kuehnii* em folhas de cana-de-açúcar: bomba de vácuo, coletor de vidro e mangueira para sucção dos urediniósporos.....44
- Figura 2** – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre três diferentes desidratações (sílica gel, liofilização e sem desidratação) e quatro temperaturas 20°C (A), 5°C (B), -20°C (C) e -80°C (D).49
- Figura 3** – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre quatro temperaturas (20°C, 5°C-20°C e -80°C) e três diferentes desidratações: sílica gel (A), liofilização(B) e sem desidratação(C).50
- Figura 4** – Média das porcentagens médias de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função dos dias após o armazenamento, sobre a influência dos fatores temperaturas (A) e desidratações (B).....51
- Figura 5** – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre duas diferentes desidratações (sílica gel e sem desidratação), e duas diferentes reidratações (Com e sem reidratação em câmara úmida) e quatro temperaturas 20°C (A), 5°C (B), -20°C (C) e -80°C (D).56

Figura 6 – Média das porcentagens médias de germinação de urediniosporos de *P. kuehnii* em função dos dias após o armazenamento, sob a influência dos fatores temperaturas (A), desidratações (B) e reidratações (C).57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Médias da germinação de urediniósporos de *P. kuehnii*, das variedades de cana-de-açúcar SP89 1115 e RB72 454, em função das datas de avaliação.....34
- Tabela 2** – Valores de P para análise de variância da variável porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* (Ger.), referente a experimento conduzido em esquema fatorial (2x4) para Variedade e Diluição.....34
- Tabela 3** – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* submetidos à solução aquosa de folhas das variedades RB 72 454 (suscetível) RB 86 7515 (resistente).....35

ARTIGO B

- Tabela 1** – Métodos de desidratação (sílica gel, liofilizados, sem desidratação) e temperaturas de armazenamento (20°C, 5°C, -20°C, -80°C) de urediniósporos de *P. kuehnii*, para o primeiro bioensaio.43
- Tabela 2** – Métodos de desidratação (com e sem desidratação), Temperaturas de armazenamento (20°C, 5°C, -20°C, -80°C) e reidratação (com e sem reidratação) de urediniósporos de *P. kuehnii*, para o segundo bioensaio.45
- Tabela 3** – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* (ferrugem alaranjada), após armazenamento por períodos de 15, 30, 60, 90,120,150 e 180 dias, desidratados em sílica gel (DS), desidratados em liofilizador (DL) e sem desidratação (SD), em temperaturas de 20, 5, -20 e -80°C.47
- Tabela 4** – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* (ferrugem alaranjada), após armazenamento por períodos de 15, 30, 60, 90,120 e 150 dias desidratados (CD) ou sem (SD) desidratação em sílica gel e com (CR) ou sem reidratação (SR), em temperaturas de 20, 5, -20 e -80°C.....54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1.	CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR	16
2.1.1	Área, Produtividade e Destino da Produção.	16
2.1.2	Doenças da Cana-de-açúcar	17
2.2	FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR	18
2.2.1	Etiologia	18
2.2.2	Distribuição Geográfica e Hospedeiros	19
2.2.3	Contexto Atual	21
2.3	PRESERVAÇÃO DE FUNGOS	22
3	ARTIGO A: VIABILIDADE DE UREDINIÓSPOROS DE <i>Puccinia kuehnii</i> E SUA GERMINAÇÃO INFLUENCIADA POR DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR	26
3.1	RESUMO	26
3.2	INTRODUÇÃO	27
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.3.1	Viabilidade de Urediniósporos	30
3.3.2	Influência de Extrato Aquoso Sobre a Germinação de urediniósporos	30
3.3.3	Análise dos dados	31
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.4.1	Viabilidade de Urediniósporos	31
3.4.2	Influência de Extrato Aquoso sobre a Germinação de Urediniósporos	34
3.5	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	36
4	ARTIGO B: MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE <i>Puccinia kuehnii</i> in vitro	38
4.1	RESUMO	38
4.2	INTRODUÇÃO	39
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	42

4.3.1	Preservação de Urediniósporos de Puccinia kuehnii com Diferentes Métodos de Desidratação.....	42
4.3.2	Preservação de Urediniósporos de Puccinia kuehnii com Diferentes Métodos de Reidratação.....	44
4.3.3	Análise dos Dados.....	46
4.4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	46
4.4.1	Preservação de Urediniósporos de Puccinia kuehnii com Diferentes Métodos de Desidratação.....	46
4.4.2	Preservação de Urediniósporos de Puccinia kuehnii com Diferentes Métodos de Reidratação.....	53
4.5	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	5 CONCLUSÕES GERAIS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) pertence à família Poaceae. Possui área cultivada de aproximadamente 8,5 milhões de hectares em todo o Brasil, tendo importância econômica e social. Desde a sua implantação, seu cultivo tem se destacado dentre as principais atividades agrícolas, com crescimento médio de 4,8% ao ano em área plantada (CONAB, 2011).

A cultura tem seus rendimentos prejudicados por fatores edáficos, climáticos e biológicos. Nestes últimos destacam-se as doenças, as quais prejudicam o desenvolvimento das plantas, reduzindo a produção e acarretando perdas econômicas (INFANTE et al., 2009). Devido a sua importância para a cultura, as doenças são objetos de estudos frequentes nos programas de melhoramento. Dentre as principais podemos destacar: ferrugem marrom, mosaico, escaldadura, amarelinho, carvão e raquitismo de soqueira. As ferrugens reduzem significativamente a área fotossintética, comprometendo o desenvolvimento dos colmos e conseqüentemente reduzindo a produtividade (MARTINS, 2011).

Os urediniosporos dos fungos causadores de ferrugens na cana são leves, facilmente disseminados pelo vento, gotas de água e roupas infectadas (OLIVEIRA; MENDES, 2008). Dentre as ferrugens, a espécie *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler foi considerada, até o ano de 2000, de pouca importância, e por isso existem poucas pesquisas a respeito do agente causador da doença. Seu principal sintoma é o aparecimento de lesões de coloração alaranjada na face inferior das folhas.

Atualmente está distribuída em todos os continentes, sendo que seu aparecimento no hemisfério ocidental foi constatado no ano de 2007 no estado da Florida, nos EUA, e de lá disseminou-se para outros países do continente americano (BRASIL, 2010).

No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em dezembro de 2009, na região de Araraquara, na pré-variedade CV 14. Até o ano de 2010, em condições de campo, três importantes variedades apresentaram reação de suscetibilidade à doença. São elas: RB72-454; SP89-1115 e SP84-2025 (BRASIL, 2010).

P. kuehnii reduz a atividade fotossintética resultando na redução do desenvolvimento dos colmos. Esta redução ocorre em consequência do alto nível de

infestação da doença nos primeiros meses de desenvolvimento da cultura, o que acarreta na quebra da produção (TOKESHI; RAGO, 2005).

No período do inverno, as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento da ferrugem. Nessa época, junho a agosto, ocorre também à colheita da maioria das variedades suscetíveis, o que reduz consideravelmente a quantidade de inóculo. Existem poucos métodos para preservação de patógenos biotróficos, fato que limita as pesquisas sobre o controle da doença aos meses de maior ocorrência. Causando restrições aos programas de melhoramento genético, responsável pela produção de variedade resistentes, principal e mais eficiente método de controle de doenças na cana-de-açúcar (GARCIA et al., 2007).

A preservação de estruturas de fitopatógenos vem sendo estudada há vários anos, e diversos métodos tem sido aplicados em diferentes espécies. A escolha do método a ser utilizado dependerá das características que se deseja preservar nos patógenos, morfologia, fisiologia, além da viabilidade. Dentre os diferentes métodos de preservação, os comumente utilizados para urediniósporos de ferrugens são a liofilização, a desidratação em sílica gel e a manutenção em baixas temperaturas (deep-freezer e nitrogênio líquido), (GARCIA et al., 2007).

Este trabalho teve por objetivo testar diferentes métodos para preservação de fungos biotróficos, como temperatura de armazenamento, técnicas de desidratação, técnicas de reidratação, tempo de preservação dos urediniósporos em folhas infectadas naturalmente, para preservação de urediniósporos de *P. kuehnii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial da cultura da cana-de-açúcar, tanto em área plantada como em produção, sendo responsável por 37% da produção mundial (FAO, 2010). A cultura continua em expansão no país, sendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Mato Grosso do Sul os maiores produtores. Nestes estados além do aumento da área cultivada, novas usinas entraram em funcionamento no ano de 2010 (CONAB, 2011).

2.1.1 Área, Produtividade e Destino da Produção

A área cultivada que será colhida e destinada a atividades industriais na safra 2011/2012 é estimada em 8,5 milhões de hectares. Sendo a distribuição nos principais estados produtores: São Paulo 53%, Minas Gerais 9%, Goiás 8%, Paraná 7%, Mato Grosso do Sul 5%, Alagoas 5% e Pernambuco 4%. Nos demais estados produtores as áreas são menores, mas com bons índices de produtividade (CONAB, 2011).

A produtividade média para a safra 2011/2012 é estimada em 76 t/ha, 1,8% menor que a safra anterior, 77,4 t/ha. Esse decréscimo de produtividade é consequência da estiagem ocorrida de abril a outubro de 2010. A escassez de chuvas no mês de maio de 2011, a ocorrência de geadas em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e o florescimento em excesso de boa parte da lavoura, fizeram a queda da produtividade ser a maior dos últimos anos. A escassez de chuvas não permitiu o pleno desenvolvimento dos canaviais e provocou o atraso no início da moagem (CONAB, 2011).

A combinação de chuva e calor no estado do Paraná foi outro fator que diminuiu a produtividade. Estes fatos criaram condições climáticas favoráveis para a disseminação e desenvolvimento de doenças. A ferrugem alaranjada provocou danos severos, forçando a substituição de variedades suscetíveis a doença por outras variedades resistentes (CONAB, 2011).

A previsão de cana-de-açúcar moída na safra 2011/2012 é de aproximadamente 571.471,0 milhões de toneladas, média 8,4% inferior a safra

2010/2011. Isto equivale a cerca de 52 milhões de toneladas a menos. Deste total 48% destinam-se a produção de açúcar e 52% a produção de etanol, podendo haver alterações em função das necessidades de mercado (CONAB, 2011).

2.1.2 Doenças da Cana-de-açúcar

Existem diversas doenças capazes de reduzir a produtividade da cana-de-açúcar, e assim são objetos de estudos frequentes nos programas de melhoramento (MARTINS, 2011). Dentre as principais doenças estudadas nestes programas podemos destacar: ferrugem marrom, mosaico, escaldadura, amarelinho, carvão e raquitismo de soqueira.

A ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.) é um bom exemplo de como os programas de melhoramento genético são importantes para a cultura da cana-de-açúcar. A doença foi relatada no Brasil em novembro de 1986, porém não provocou grandes prejuízos, pois mais de 90% dos canaviais eram cultivados com variedades resistentes. As maiores perdas ficaram restritas aos programas de melhoramento, onde muitos clones e variedades promissoras foram eliminados devido à suscetibilidade (TOKESHI; RAGO, 2005).

Esta doença produz pústulas na página inferior das folhas de coloração amareladas a marrom-escuro, 2 a 7 mm de comprimento por 1 mm de largura. Os urediniosporos são de coloração marrom-escuro, com formato de ovóide a elipsóide. Os prejuízos são causados, principalmente, devido à perda de área fotossintética e aceleração na maturação (TOKESHI; RAGO, 2005).

No Brasil, a ferrugem marrom é controlada por meio de resistência varietal, sendo a maior parte das variedades resistentes. As que são suscetíveis ficam restritas a regiões de clima não favorável ao desenvolvimento da doença.

Dentre as doenças de importância para a cultura da cana-de-açúcar, vem se destacando, desde o ano 2000, a ferrugem alaranjada.

2.2 FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR.

2.2.1 Etiologia

A doença é causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler, pertencente à classe dos basidiomicetos, ordem Pucciniales e a família Pucciniaceae (INDEX FUNGORUM, 2011). É um fungo biotrófico, não sendo possível a sua propagação e cultivo em meio de cultura.

Os sintomas iniciais são manchas cloróticas nas folhas mais jovens, progredindo rapidamente para lesões que se rompem, formando as urédias comumente chamadas de pústulas. Estas podem ser observadas na face inferior da folha. Em variedades altamente suscetíveis, as lesões evoluem rapidamente e coalescem, causando a necrose das folhas. As pústulas possuem minúsculas protuberâncias de coloração alaranjada a castanho avermelhado e são facilmente visualizadas com o auxílio de uma lupa. Os urediniósporos são unicelulares, ovóides ou piriformes, de coloração amarela a castanho claro, parede celular espessa quando comparada a ferrugem marrom (FERRARI et al., 2010).

As características morfológicas e sintomáticas são importantes para diferenciação das ferrugens da cultura da cana-de-açúcar. As pustulas da ferrugem alaranjada, causada por *P. kuehnii*, possuem coloração laranja claro, são menores e mais ovais do que as da ferrugem marrom (GLYNN et al., 2010).

Os urediniósporos são estruturas utilizadas para a identificação das espécies em laboratório devido suas particularidades. Os urediniósporos da ferrugem alaranjada são ovóides ou piriformes, com parede celular mais espessada, coloração variando do amarelo a castanho claro (FERRARI et al., 2010). Os urediniósporos da ferrugem marrom possuem formato elíptico, com parede celular uniforme e coloração que vai do marrom ao marrom escuro (TOKESHI; RAGO, 2005).

Virtudazo, Nojima e Kakishima (2001), observaram as características taxonômicas das diferentes espécies de Puccinias. As télias e teliósporos de ambas as ferrugem, podem ser utilizadas para diferenciação das espécies. As télias de *P. kuehnii* apresentaram coloração esbranquiçada, os teliósporos coloração hialina, com pouco ou nenhum septo. A parede celular dos teliósporos é uniformemente fina. Basidiósporos foram encontrados no metabasidial, camada acima

dos teliosporos. As télias de *P. melanocephala* são de coloração castanho-escuro e ocorreram juntamente com as urédias. Os teliosporos apresentaram coloração marrom a marrom escura, predominantemente clavada, com paredes apicais espessas, células superiores mais escuras do que inferiores.

A genética molecular também tem sido uma alternativa para distinção entre as duas ferrugens. Glynn et al. (2010) desenvolveram métodos de PCR convencional e PCR em tempo real para detectar a ocorrência de *P. melanocephala* e *P. kuehnii*, conseguindo assim detectar os patógenos antes mesmo do desenvolvimento dos sintomas.

Os sintomas das doenças aparecem frequentemente no verão e outono, devido ao clima favorável. A produção de urediniósporos do patógeno continua, em média, por 23 dias após a formação das pústulas, estimando-se que o número total de urediniósporos produzidos está em torno de $4,7 \times 10^3$ por cada pústula. Para ambas as ferrugens, a temperatura ótima para o desenvolvimento situa-se entre 22 a 26°C, e 97% de umidade relativa, podendo apresentar maior amplitude de temperatura para a germinação dos urediniósporos, de 10 a 34°C. O genótipo e a idade da planta são fatores importantes para o desenvolvimento das ferrugens. Para *P. melanocephala* a maior sensibilidade da planta está entre o 4º e 5º mês de idade (INFANTE et al., 2009).

A dispersão dos urediniósporos, a curta e longa distância, se dá pela ação do vento. Os prejuízos são causados pela redução do desenvolvimento dos colmos, e a aceleração da maturação. O genótipo do hospedeiro e a idade da planta são fatores importantes para o desenvolvimento da ferrugem alaranjada em cana-de-açúcar (INFANTE et al., 2009).

2.2.2 Distribuição Geográfica e Hospedeiros

A ferrugem alaranjada está presente na região canavieira da Austrália há vários anos, mas somente no ano 2000 causou danos econômicos, com a epidemia iniciada a partir da quebra de resistência da variedade Q124, uma das mais plantadas no país. Desde a sua constatação em janeiro de 2000 até o final da safra foram observados danos de 40%. No ano de 2001 as perdas ficaram em 150-200 milhões de dólares australianos (MARTINS, 2011).

Braithwaite et al. (2009) compararam diferentes isolados de *P. kuehnii*. Realizaram as análises filogenéticas com 28 isolados provenientes de herbários feitos com plantas de campos comerciais, selvagens e de jardins, coletados na Ásia e Oceania. Encontraram três grupos filogenéticos, sendo que todos os isolados de campos comerciais da Austrália pertenciam ao mesmo grupo (grupo I), os demais isolados pertenciam aos grupos II e III. Foi possível verificar a existência de variabilidade entre os isolados de *P. kuehnii*, o que se torna um desafio quarentenário para o país visto que nem todos os grupos filogenéticos estão presentes.

A ferrugem alaranjada está presente na grande maioria dos países produtores de cana-de-açúcar: Austrália, China, Guam, Indonésia, Japão, Malásia Peninsular, Myanmar, Nova Caledônia, Paquistão, Papua Nova Guiné, Filipinas, na parte ocidental da Samoa, Ilhas Salomão, Sri Lanka, Taiwan, Tailândia, Vietnã, Fiji e Índia. O primeiro relato do aparecimento deste patógeno no continente americano foi em 2007 na Flórida, Estados Unidos, onde a doença causou danos significativos atacando uma das variedades mais plantadas no estado, a CP80-1743. Posteriormente foi relatada na Nicarágua, Panamá, Costa Rica, Guatemala e Venezuela, Cuba, México e El Salvador (INFANTE et al., 2009; SOOD; COMSTOCK; GLYNN, 2009; OVALLE et al., 2008).

No Brasil, o primeiro foco de *P. kuehnii* foi oficialmente detectado na região de Araraquara-SP em dezembro de 2009. A doença se manifestou na pré-variedade CV14 (Centaurus) em um campo de multiplicação de clones, onde a variedade apresentou alto índice de severidade (BARBASSO et al., 2010).

Atualmente está presente em diversos estados produtores, como São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais (CTC, 2010).

Por ser um fungo biotrófico possui baixa gama de hospedeiros. Coloniza principalmente plantas do gênero *Saccharum*, tais como *S. arundinaceum*, *S. nargenga*, *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. munja*, *S. edule*, *S. bengalense*, e *Sclerostachya fusca*.

2.2.3 Contexto Atual

A ferrugem alaranjada é uma das mais preocupantes doenças da cultura da cana-de-açúcar, no Brasil, reduzindo significativamente os rendimentos em genótipos suscetíveis. Zhao et al. (2011) quantificaram os efeitos da doença nas folhas, através da avaliação da taxa de fotossíntese líquida, assimilação de CO₂, eficiência na fixação de carbono e respiração no escuro. Observaram que houve redução na taxa de fotossíntese das folhas doentes quando estas foram mantidas em luz de baixa intensidade, e que o efeito da ferrugem alaranjada na taxa fotossintética foi superior ao efeito sobre a transpiração e condutância estomática.

Martins (2011) avaliou a germinação *in vitro* de uredinósporos sobre diferentes temperaturas. Desenvolveu-se um mapa de zona de risco de epidemia no estado de São Paulo, e caracterizou os aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada sobre diferentes períodos de molhamento foliar. Esses dados são muito importantes para se compreender a epidemiologia da doença e fornecer subsídios para seu correto manejo.

A utilização de sequências de nucleotídeos do RNA ribossômico é amplamente utilizada para determinar as relações filogenéticas e variações genéticas em fungos. Essa técnica também vem sendo utilizada para caracterizar as variações intraespecíficas ou intra-genômicas (VIRTUDAZO; NAKAMURA; KAKISHIMA, 2001).

A técnica de sequenciamento genético foi empregada para identificação e confirmação do fungo *P. kuehnii* em Cuba (PÉREZ-VICENTE et al., 2010). Outra ferramenta que tem ajudado na distinção das ferrugens da cana-de-açúcar é a microscopia eletrônica de varredura. Em estudos realizados com as ferrugens da cana-de-açúcar por Virtudazo, Nojima e Kakishima (2001), os resultados de morfologia comparativa demonstraram que estas podem ser distinguidas filogeneticamente em grupos. As características das urédias e télias desses dois grupos correspondem às características taxonômicas anteriormente relatadas para os fungos *P. melanocephala* e *P. kuehnii*.

No Brasil a grande maioria das variedades cultivadas é considerada resistente à ferrugem alaranjada, sendo consideradas suscetíveis as variedades SP89-1115, SP84-2025, RB72-454 e CV14. A variedade mais plantada no Brasil, RB

86-7515, considerada susceptível antes da chegada da doença no país, mostrou-se resistente ao fungo *P. kuehnii* (MARTINS, 2011).

2.3 PRESERVAÇÃO DE FUNGOS

Para se proceder a comparação entre diferentes espécies, identificação de novas raças e estudos laboratoriais, a utilização de métodos para preservação de patógenos, se faz necessária.

Dentre os métodos consagrados, um dos mais conhecidos e utilizados é o proposto por Castellani (PICININI; PASCHOLATI, 1996). Consiste na colocação, sobre condições assépticas, de discos ou pedaços de meio de cultivo contendo os patógenos em frascos de vidro ou tubo de microcentrífuga, contendo água destilada e esterilizada. Esse método tem apresentado boa eficiência para a maioria dos patógenos testados, mantendo a viabilidade destes por períodos prolongados, que podem variar de meses até vários anos (PICININI; PASCHOLATI, 1996). Diversos autores vêm testando e adaptando esse método. Urdaneta e Lacaz (1965) preservaram 24 amostras de diferentes isolados de fungos e confirmaram que o método foi eficiente.

Entretanto, nenhum método é universal, pois cada patógeno apresenta comportamentos diferentes às diversas técnicas utilizadas na preservação. Para fungos biotróficos os métodos de desidratação com liofilização ou sílica gel, seguidos ou não de armazenamento em baixas temperaturas, utilizando congeladores, deep-freezer e nitrogênio líquido, veem apresentado bons resultados (GARCIA et al., 2007).

Vários patógenos parasitas obrigatórios de plantas vêm sendo preservados sob baixa temperatura. Estudos realizados por Faleiro et al. (2000) objetivaram a preservação de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* Pers, por 12 meses. As condições comparadas foram de temperatura ambiente, 5°C, -20°C, -80°C, nitrogênio líquido e 5°C/50% de umidade relativa. Verificou-se que a germinação foi drasticamente reduzida em todos os tratamentos.

Cruz et al. (2009), constataram que a preservação das estruturas de resistência de *Plasmodiophora brassicae* Woronin, em condições laboratoriais, é dificultada pelo fato do patógeno ser parasita obrigatório. Métodos utilizando congeladores (-20°C) foram testados com a finalidade de viabilizar a sobrevivência e

a preservação de suas características infectivas. Armazenaram-se raízes de diferentes espécies de brássicas infectadas e estas se mantiveram viáveis após o período testado, de 21 a 242 dias, validando a métodos para este patógeno.

Ensaio realizados com *Puccinia psidii* G., sob diferentes temperaturas de armazenamento, mostraram que o fungo se manteve viável e suas estruturas infectivas foram preservadas. Nesses ensaios os urediniósporos foram mantidos em nitrogênio líquido (-196°C), deep-freezer (-80°C) e geladeira (5°C). Estes tratamentos foram os que apresentaram melhores resultados ao final do período de preservação, mantendo os urediniósporos viáveis e infectivos até 150 dias após o armazenamento (SALUSTIANO et al., 2008).

Zambenedetti et al. (2007) avaliaram o efeito de diferentes métodos de armazenamento na viabilidade de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow. Testaram o armazenamento de folhas herborizadas com urediniósporos (24°C), armazenamento em dissecador (10°C) + nitrogênio líquido (-196°C), geladeira (4°C), deep-freezer (-80°C) e em nitrogênio líquido. Concluíram que o nitrogênio líquido foi o melhor método.

Furtado et al. (2008) também compararam diferentes temperaturas e procedimentos de reversão de dormência para urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Sendo: temperatura ambiente, 5°C, -20°C e -80°C, urediniósporos desidratados e não desidratados, e reversão de dormência com choque térmico (40°C/5 min). Urediniósporos armazenados em temperatura ambiente não sobrevivem mais que um mês independentemente da hidratação. Já os armazenados a baixas temperaturas tiveram sua viabilidade aumentada em função da desidratação. Dentre os tratamentos que passaram pelo choque térmico, os que foram armazenados a -80°C e que envolveram hidratação alcançaram 85 a 92% da germinação inicial.

Outros testes semelhantes a estes foram realizados com urediniósporos de *P. melanocephala*. Neste foi possível observar que a preservação dos urediniósporos a baixas temperaturas (-20°C e -80°C), antecidos de desidratação em sílica gel, mantinha sua viabilidade por um período de até um ano de armazenamento (GARCIA et al., 2007).

Pesquisas realizadas com *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. & Henning, *Puccinia triticina* Erikss e *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Erikss, demonstraram que a utilização de folhas, caule e plântulas são eficientes na preservação de urediniósporos de ferrugem. A viabilidade destes manteve-se por

períodos de 5 a 25 semanas, dependendo da temperatura de armazenamento (IMBABY et al. 2005).

Pérez-García et al. (2005) testaram diferentes técnicas de armazenamento de *Podosphaera fusca* Fr. Observaram que a desidratação em sílica gel, seguida de armazenamento em deep-freezer (-80°C), foi o método mais viável. Este entrou em conformidade com os três principais objetivos a serem alcançados por qualquer método de preservação microbiana: pureza, sobrevivência, e estabilidade genética.

A desidratação em sílica gel anidra foi testada com êxito para vários fungos, bactérias e leveduras. Após o período de armazenamento, estes foram testados e se mostraram viáveis, mantendo as características desejáveis dos patógenos (GRIVELL; JACKSON, 1969). O mesmo foi relatado para o fungo *Duddingtonia flagrans* onde isolados foram preservados em frascos contendo sílica gel por um período de 7 anos e mantiveram sua atividade predatória, sobre *Cyathostomins* (Nematoda: Cyathostominae), (BRAGA et al., 2011).

Menzies, Nielsen e Thomas (1997) realizaram ensaio utilizando coleções de isolados de *Ustilago tritici* (Pers.) provenientes de diversas partes do mundo. Inocularam o patógeno em espiguetas de trigo em fevereiro de 1976 e após o amadurecimento, as sementes foram armazenadas em dessecador com sílica gel a -15 °C. A avaliação de viabilidade foi testada a cada dois anos, retirando 60 sementes e semeando-as para determinar a viabilidade e proporção de plantas adultas infectadas. Concluíram que entre 57 e 83% das sementes produziram plantas adultas. Destas, 56 e 98% mostraram sintomas da doença durante os 20 anos de testes.

A criopreservação, apesar de eficiente, pode apresentar alguns problemas, pois, alguns fungos necessitam de agentes protetores para que não haja morte de células na hora do congelamento. Dahmen et al. (1983) testaram 17 fungos de importância agrícola, preservando-os em nitrogênio líquido, com adição de crioprotetores como leite desnatado, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO). A utilização destes crioprotetores se mostrou eficiente na maioria dos fungos testados, porém todos tiveram queda na porcentagem de germinação e/ou crescimento micelial.

A escolha do método mais adequado para cada patógeno é muito importante para a preservação de suas características morfofisiológicas. Porém a grande variedade de métodos disponíveis pode levar muitas vezes a equívocos,

sobre qual método é o mais adequado. Com base nessas informações, Ryan, Smith e Jeffries (2000) elaboraram uma chave de classificação com questões relacionadas a características de cada fungo e os métodos mais adequados para o armazenamento, visando assim a preservação a longo prazo dos patógenos.

Delcán et al. (2002) testaram diferentes métodos para preservação de *Botrytis cinerea* Pers, tais como: sílica gel a 4°C, areia a 4°C, tubos contendo meio BDA e mantidos a 4°C, urediniósporos secos e armazenados em tubos a -20 °C, urediniósporos armazenados em glicerol (20%) a -20°C. Os resultados foram promissores principalmente para urediniósporos armazenados em areia a 4°C e glicerol a -20°C onde a redução na produção de escleródios foi de 9% e 14% respectivamente.

Os fungos do solo são organismos que podem produzir estruturas de resistência em situações adversas. O desenvolvimento de métodos de preservação de estruturas de resistência visa a manutenção do vigor e da patogenicidade. Testes de patogenicidade realizados após um ano de preservação para seis fungos confirmaram que apenas um perdeu a patogenicidade. Cada fungo passou por um método para favorecer a produção de estruturas de resistência, as quais foram posteriormente submetidas a três tratamentos: temperatura ambiente, geladeira (5°C) e freezer (-20°C). Mensalmente a sobrevivência e vigor das colônias de cada patógeno eram avaliadas. (BUENO; AMBRÓSIO; SOUZA, 2006).

Hoopen et al. (2004) observaram que existem diferenças no desenvolvimento e taxa de crescimento entre diferentes espécies e isolados do gênero *Rosellinia*, e que a utilização de apenas um protocolo de preservação é inadequado. Desta forma para esse gênero existe a necessidade do desenvolvimento de um protocolo adaptado para cada isolado.

Com base no que foi exposto, comprova-se a existência de métodos de preservação eficientes, e que existe a necessidade de se saber qual a finalidade do patógeno preservado, para assim determinar qual método é o mais eficiente para cada caso.

3 ARTIGO A: VIABILIDADE DE UREDINIÓSPOROS DE *Puccinia kuehnii* E SUA GERMINAÇÃO INFLUENCIADA POR EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Fabiana Tibolla^{1,2*}; Marcelo Giovanetti Canteri³; Ana Maria Conte e Castro⁴.

¹Programa de Pós- Graduação em Agronomia - Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, PR. ²Bolsista CAPES. ³Docente, Universidade Estadual de Londrina, CEP:86051-990, CP. 6001, Londrina, PR. ⁴Docente, Universidade Estadual do Norte do Paraná, CEP: 86360-000, Bandeirantes, PR. *bia_ti@yahoo.com.br

3.1 RESUMO

As ferrugens contribuem para perdas de rendimentos na cultura da cana-de-açúcar. O presente estudo teve como objetivo avaliar o período de viabilidade dos urediniósporos de *Puccinia kuehnii* e a influência de extratos aquosos em sua germinação *in vitro*. Para o primeiro bioensaio (B1) foram coletadas folhas com sintomas de ferrugem alaranjada, das cultivares de cana-de-açúcar SP89 1115 e RB72 454. Estas foram armazenadas em câmara úmida por 8 dias, e posteriormente herborizadas, até as datas das avaliações de germinação. Os urediniósporos foram coletados fazendo-se a varredura das folhas e preparou-se uma suspensão em água destilada. Uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹), água, mantidas a 20°C, no escuro por 24 horas. As avaliações foram feitas aos 0, 1, 2, 4, 8 e 16 dias após a coleta das folhas, com cinco repetições por avaliação. Para a avaliação da germinação, procedeu-se a contagem de 200 urediniósporos por placa. Os dados foram submetidos à análise de regressão. O Segundo bioensaio (B2) foi realizado fazendo-se a varredura de folhas com sintomas de ferrugem alaranjada da cultivar SP89-1115. Foi preparada uma suspensão em água destilada e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água e 1 mL de extratos aquosos de folhas de cana-de-açúcar. Os tratamentos constituíram-se em dois extratos aquosos: variedade suscetível RB72 454 e resistente RB86 7515 nas diluições de 1:1; 10-1; 10-2; 10-3. Foram realizadas 4 repetições. Avaliou-se a germinação de 200 urediniósporos/placa. Os resultados de B1 demonstraram que para a variedade SP89 1115 a porcentagem de germinação foi significativamente inferior à variedade RB72 454, respectivamente 26,4% e 93,1% na data da coleta a campo e 24,8% e 32,4% aos 16 dias após a coleta. Em B2 a porcentagem de germinação dos urediniósporos, que receberam a suspensão aquosa da variedade resistente, foi em média de 7,6 pontos percentuais menor do que os que receberam a suspensão aquosa da variedade suscetível.

Palavras-chave: Ferrugem alaranjada. Urediniósporos. Compostos foliares. *Saccharum officinarum*.

PUCCINIA KUEHNII UREDINIOSPORES VIABILITY AND ITS GERMINATION INFLUENCED BY AQUEOUS EXTRACTS OF LEAVES OF SUGARCANE

Abstract

The rusts contribute to loss of income in sugarcane crops. The present study was to evaluate the viability of *Puccinia kuehnii* urediniospores over the time and the influence of aqueous extracts on in vitro germination. Leaves with symptoms orange rust, cultivar SP89 1115 and RB72 454 were collected for the first bioassay. These were stored in a humid chamber for 8 days, and then herbalized, up the assessments date. Urediniospores were collected sweeping the leaves and a suspension in distilled water was prepared. 0.1 mL was transferred to Petri dishes containing agar-water, kept at 20 ° C in the dark for 24 hours. Assessments were made at 0, 1, 2, 4, 8 and 16 days after collection of the leaves, with five replicates for evaluation. To assess germination, proceeded to count 200 urediniospores/plate. Data were submitted to regression analysis. Second bioassay was conducted by sweeping the leaves with symptoms of orange rust, from variety SP89 1115 of sugarcane. Suspension was prepared in distilled water. An aliquot of 0.1 mL was transferred to Petri dishes containing agar-water (15g L⁻¹), and 1 mL of aqueous extracts of sugarcane leaves. The treatments consisted of two aqueous extracts of leaves of sugarcane: a susceptible RB72 454 and a resistant RB86 7515 variety in dilutions of 1:1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³. Four repetitions were performed with 200 urediniospores/plate= evaluated. The results showed that the percentage of germination for the variety SP89 1115 was significantly lower than the variety RB72 454, respectively 26.4% and 93.1%, on the day of collection of leaves in the field. Sixteen days after the leaves collection the germination was 24.8% and 32.4%, respectively. The urediniospores which received the aqueous suspension of the resistant variety presented a germination 7.6 percentage points lower than the urediniospores that received slurry of the susceptible variety.

Keywords: orange rust, urediniospores, leaf compounds, *Saccharum officinarum*.

3.2 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial da cultura da cana-de-açúcar, tanto em área plantada como em produção, sendo responsável por 37% da produção mundial (FAO, 2010). Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná e Mato Grosso do Sul são os maiores produtores da cultura. A previsão de cana-de-açúcar moída na safra 2011/2012 é de aproximadamente 571.471,0 milhões de toneladas, média 8,4% inferior a safra 2010/2011 (CONAB, 2011).

Os fatores edáficos, climáticos e biológicos, afetam o rendimento da cultura. Entre os fatores biológicos destacam-se as doenças, as quais prejudicam o desenvolvimento das plantas, reduzindo a produção e acarretando perdas econômicas (INFANTE et al., 2009). Devido a sua importância para a cultura, as doenças são objetos de estudos frequentes nos programas de melhoramento destacando-se: ferrugem marrom, mosaico, escaldadura, amarelinho, carvão e raquitismo de soqueira (MARTINS, 2011).

Entre as doenças mais importantes para a cultura está a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler e em menor escala a ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd) (INFANTE et al., 2009). Ambas as ferrugens são causadas por fungos da classe dos Basidiomicetos, ordem Pucciniales e família Pucciniaceae (INDEX FUNGORUM, 2011). As folhas doentes exibem pústulas salientes, sintomas típicos de algumas ferrugens, com rompimento da epiderme (TOKESHI; RAGO, 2005). As pústulas de ferrugem alaranjada possuem minúsculas protuberâncias de coloração alaranjada a castanho avermelhado e são facilmente visualizadas com o auxílio de uma lupa. Os urediniósporos são unicelulares, ovóides ou piriformes, de coloração amarela a castanho claro, parede celular espessa quando comparada a ferrugem marrom (FERRARI et al., 2010).

A ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar está presente na maior parte dos países produtores. O primeiro relato deste patógeno no continente americano foi na Flórida, Estados Unidos em 2007. Posteriormente foi relatada na Nicarágua, Panamá, Costa Rica, Guatemala, Venezuela, Cuba, México e El Salvador (INFANTE et al., 2009; OVALLE, 2008).

O primeiro foco de *P. kuehnii* foi oficialmente detectado no Brasil na região de Araraquara-SP em dezembro de 2009. A doença se manifestou na pré-variedade CV14 (Centaurus) em um campo de multiplicação de clones, com alto índice de severidade (BARBASSO et al., 2010).

As pústulas de *P. kuehnii* apresentam coloração alaranjada, em função da massa de urediniósporos (TOKESHI; RAGO, 2005) e se diferenciam da *P. melanocephala*, quanto à cor, tamanho, formato mais oval e parede celular mais espessa. A presença das pústulas reduz a atividade fotossintética resultando em menor crescimento da planta pelo mau desenvolvimento dos colmos, aceleração da maturação e, conseqüente, queda de produção. Para ambos os patógenos a

temperatura ótima para o desenvolvimento situa-se entre 22 à 26°C, com maior amplitude de temperatura para a germinação dos urediniósporos. O genótipo e a idade da planta são fatores importantes para o desenvolvimento das ferrugens, sendo que para *P. melanocephala* a maior sensibilidade da planta ao ataque do patógeno está entre o 4° e 5° mês de idade (INFANTE et al., 2009).

Martins (2011) avaliou a germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* sob diferentes temperaturas e desenvolveu mapa de zona de risco de epidemia no estado de São Paulo. Também caracterizou os aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada sob diferentes períodos de molhamento foliar. Estas análises são importantes para se compreender a epidemiologia da doença e fornecer subsídios para seu correto manejo.

Existem diferentes formas de se avaliar a sensibilidade de um patógeno a substâncias químicas. Experimentos realizados em laboratório, com substrato artificial, podem quantificar o comportamento da germinação dos urediniósporos sobre concentrações crescentes de princípios ativos de fungicidas (REIS; RICHTER, 2007).

Suzuki, Silveira e Alfenas (1998), em seu trabalho, observaram que diluições feitas a partir de extratos aquosos de folhas de mirtáceas elevaram a porcentagem de germinação dos urediniósporos de *Puccinia psidii* Wint. Tendo como base este trabalho, levantou-se a hipótese de que compostos liberados pelas folhas de cana-de-açúcar pudessem estimular maior germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* “*in vitro*”.

Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de extratos aquosos de folhas de cana-de-açúcar, na germinação de urediniósporos de *P. kuehnii in vitro*, e determinar o período (dias) de viabilidade dos urediniósporos de *P. kuehnii* em folhas de cana-de-açúcar de variedades suscetíveis.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois bioensaios. No primeiro, foi avaliado a viabilidade de urediniósporos de *P. kuehnii*, e no segundo a Influência de extrato aquoso sobre a germinação de urediniósporos *P. kuehnii*.

3.3.1 Viabilidade de Urediniósporos

Folhas com sintomas de ferrugem alaranjada foram obtidas das variedades de cana-de-açúcar SP89-1115 e RB72 454, coletadas ao acaso em área localizada no município de Bandeirantes-PR. A coleta foi realizada no período matutino. Logo após as folhas foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, onde foram incubadas em câmara úmida à 20°C. As análises de germinação de urediniósporos foram realizadas aos: 0, 1, 2, 4, 8 e 16 dias após a incubação das folhas em câmara úmida.

Após a avaliação do 8º dia, as folhas foram retiradas da câmara úmida e herborizadas, para serem utilizadas na avaliação do 16º dia. Os urediniósporos foram extraídos em cada dia de análise fazendo-se a varredura das folhas com auxílio de pincel, e peneirados em malha de 200 mesh. Em seguida foram colocados em erlenmeyer contendo 10 mL de água destilada. Da suspensão obtida, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹). Cada tratamento foi composto por 5 repetições. As placas foram incubadas, na temperatura de 20± 2°C, por 24 h, no escuro. Após esse período a germinação foi interrompida adicionando-se lactofenol às placas. Contaram-se 200 urediniósporos por placa com o auxílio de um microscópio ótico. Consideraram-se como urediniósporos germinados aqueles que apresentavam tubo germinativo maior que seu diâmetro.

3.3.2 Influência de Extrato Aquoso Sobre a Germinação de urediniósporos

Os urediniósporos de *P. kuehnii* foram obtidos de folhas com sintomas de ferrugem alaranjada da variedade de cana-de-açúcar SP89-1115, coletadas de plantas mantidas em vasos como fonte de inóculo no Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina. Os urediniósporos foram extraídos, fazendo-se a varredura das folhas com auxílio de pincel. Estes foram peneirados em malha de 200 mesh e em seguida colocados em erlenmeyer, contendo 10 mL de água destilada, e agitados constantemente para que não ocorresse a sedimentação dos urediniósporos. Da suspensão obtida, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹) e extratos aquosos de cana-de-açúcar.

Os tratamentos constituíram-se em dois extratos aquosos de folhas de cana-de-açúcar: um de variedade susceptível (RB72 454) e outro de variedade resistente (RB86 7515) (5g de folhas 100 mL⁻¹) nas diluições de 1:1; 10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³, onde 1 foi a concentração inicial do extrato. As folhas de cana-de-açúcar foram processadas em água destilada em liquidificador e posteriormente, os extratos foram peneirados em malha de 200 mesh para retirada de impurezas maiores. Uma alíquota de 1 mL, de cada diluição, foi transferida para placas de Petri. Foram realizadas 4 repetições. As placas foram incubadas na temperatura de 20± 2°C, por 24 h, no escuro. Após esse período a germinação foi interrompida adicionando-se lactofenol. Contaram-se 200 urediniósporos por placa com o auxílio de microscópio ótico.

3.3.3 Análise dos dados

Para o primeiro bioensaio, a relação entre a viabilidade dos urediniósporos e o tempo de incubação foi analisada por correlação, utilizando o software Microsoft Excel 2007. A comparação das médias foi analisada pelo teste de Friedman (P< 0,05).

No segundo bioensaio, foram realizadas análise de variância e teste de tukey a 5%, utilizando o programa SISVAR.

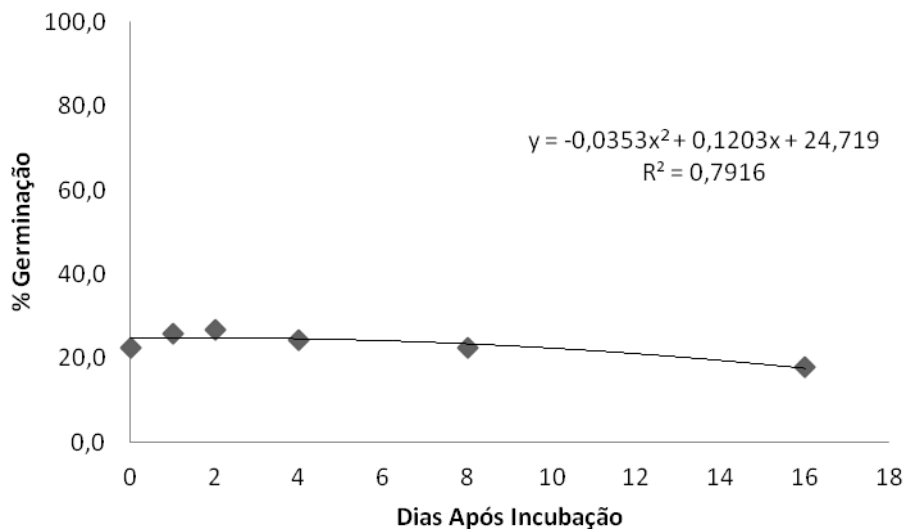
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Viabilidade de Urediniósporos

No primeiro bioensaio observou-se que a viabilidade dos urediniósporos decresceu em função do tempo, sendo representada pela equação $y = -0,0353x^2 + 0,1203x + 24,719$ com coeficiente de determinação (R^2) 0,7916. Para a variedade de cana-de-açúcar SP89 1115 (Figura 1), foi observado que a porcentagem de germinação ficou abaixo dos 48% esperados, constatado em bioensaios preliminares. No dia da coleta das folhas a campo, considerado como dia 0, a média de germinação foi 22,6%, e se manteve linear ao longo do período avaliado, 16 dias.

Aplicando-se o teste de Friedman não se constatou diferenças significativas ($P < 0,05$) para a germinação entre os diferentes períodos avaliados, desde o dia da coleta até o 16º dia de avaliação.

Figura 1– Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento em câmara úmida, na temperatura de 20°C para variedade de cana-de-açúcar SP 89 1115.



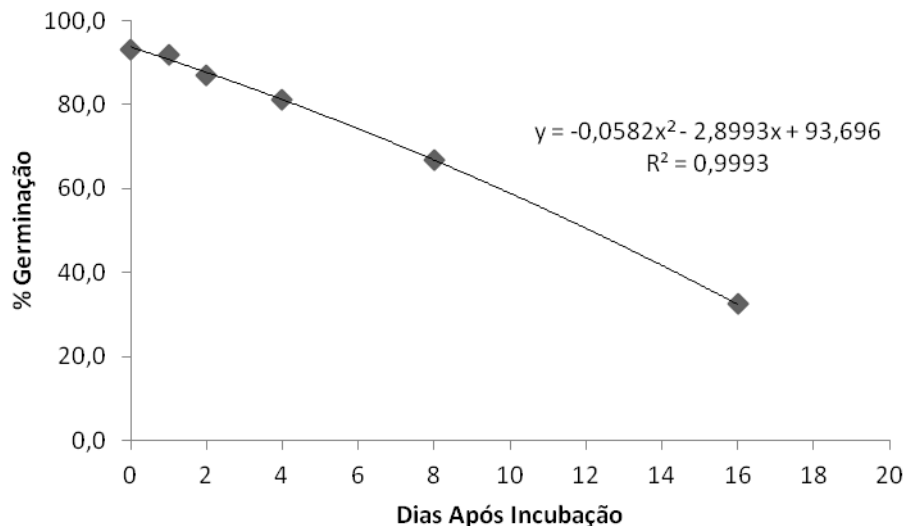
Experimento realizado pelos autores no mês de maio de 2010, com a variedade SP89 1115, avaliou a germinação de urediniósporos de ferrugem alaranjada sob diferentes condições de luminosidade. Sendo possível observar que a porcentagem média de germinação na ausência de luminosidade foi de 25%. Esses dados corroboram com os dados da porcentagem média obtida neste bioensaio, junho de 2011, no qual a média de germinação para a variedade SP89 1115 foi de 23%.

Garcia et al. (2007) observaram baixa porcentagem de germinação dos urediniósporos de *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd. Concluíram que este fato pode estar relacionado com a presença de auto- inibidores da germinação nos urediniósporos, como dimetoxicinamatos, que podem atuar na germinação *in vitro* dos mesmos. Também, Stomayor, Purdy e Trese (1983) descreveram que a germinação dos urediniósporos de *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd sobre o

tecido foliar da cana-de-açúcar é duas vezes maior, quando comparada à germinação *in vitro* em meio de cultura ágar-água.

Para a variedade RB72 454 os dados de porcentagem de germinação também decresceram em função do tempo (Figura 2). A viabilidade dos urediniósporos foi maior, contrariamente ao que foi observado para a variedade SP89 1115.

Figura 2 – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento em câmara úmida a temperatura de 20°C para variedade de cana-de-açúcar RB72 454.



Na data da coleta das folhas a campo (0) a média de germinação foi de 93,1%, 70 pontos percentuais acima da primeira variedade testada, SP89 1115. Este fato pode colaborar para explicar a maior severidade da doença observada em campo na variedade RB72 454.

Aplicando-se o teste de Friedman, para os períodos (dias) analisados, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para germinação, entre as avaliações no dia da coleta (zero) e 16 dias após a coleta. Também foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as avaliações realizadas um e oito dias após a coleta, e entre as avaliações realizadas um e 16 dias após a coleta das folhas com sintomas de ferrugem alaranjada.

O decréscimo na viabilidade dos urediniósporos na variedade RB72 454 foi maior quando comparada a SP89 1115 (Tabela1). Esse fato pode ser devido

a fatores inerentes a *P. kuehni*, como condições climáticas, época de coleta dos materiais com sintomas da doença, nutrição da planta, variedades testadas, entre outros.

Tabela 1 – Médias da germinação de urediniósporos de *P. kuehni*, das variedades de cana-de-açúcar SP89 1115 e RB72 454, em função das datas de avaliação.

Avaliações (dias)	% Germinação	
	SP89 1115	RB72 454
0	22,6	93,1
1	26,0	91,9
2	26,8	87,1
4	24,2	81,1
8	22,6	66,8
16	17,8	32,4

3.4.2 Influência de Extrato Aquoso sobre a Germinação de Urediniósporos

Os resultados do segundo bioensaio (Tabela 2) demonstraram que não houve interação entre variedades (resistente e suscetível) e a diluição do extrato aquoso (1:1, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Tabela 2 – Valores de P para análise de variância da variável porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehni* (Ger.), referente a experimento conduzido em esquema fatorial (2x4) para Variedade e Diluição.

Fontes de Variação	GL	Germinação
Variedade (Fator A)	1	0,0422**
Diluição (Fator B)	3	0,0165**
Var. x Dil. (Int. Ax B)	3	0,4129
Total corrigido	31	
Coefficiente de variação (%)		38,76

** Significativo a 5%

Analisando-se os fatores em separado, observou-se que a porcentagem de germinação dos urediniósporos, que receberam a suspensão aquosa da variedade resistente, foi significativamente ($p < 0,05$) inferior aquelas que

receberam a suspensão aquosa da variedade suscetível, em média 7,6 pontos percentuais (Tabela 3).

Tabela 3 – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* submetidos à solução aquosa de folhas das variedades RB 72 454 (suscetível) RB 86 7515 (resistente).

Variedade	Diluição				Média
	1:1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
RB 72 454	28,0 Aa	24,7 Aa	29,0 Aa	36,3 Aa	29,5 a
RB 86 7515	11,0 Bb	16,0 ABa	27,5 ABa	33,3 Aa	21,9 b
Média	19,5B	20,4 B	28,3 AB	34,8 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O extrato aquoso das folhas sem diluição (1:1) proporcionou as menores porcentagens de germinação, em oposto ao observado para a diluição de 10⁻³, a qual apresentou melhores resultados na porcentagem de germinação (Tabela 3). Este fato evidenciou que quanto mais diluídas estavam as amostras, maior foi a porcentagem de germinação dos urediniósporos.

Comparando os resultados obtidos com a testemunha em branco, água destilada e esterilizada, a porcentagem média de germinação desta foi de 48,3%, significativamente maior que dos demais tratamentos. Reis e Richter (2007), os autores observaram que extratos e infusão de folhas de trigo, utilizadas como substrato, aumentaram a porcentagem de germinação de urediniósporos de *Puccinia triticina* Ericks, ao longo do tempo. Possivelmente as folhas de trigo liberaram compostos químicos solúveis em água, que induziram a germinação dos urediniósporos.

Suzuki, Silveira e Alfenas (1998), observaram que as diluições feitas a partir de extratos aquosos de mirtáceas, nas concentrações de 10⁻² e 10⁻³ elevaram a porcentagem de germinação dos urediniósporos de *Puccinia psidii* Wint, em relação à testemunha ágar-água. Os resultados apresentados por estes autores são contrários aos obtidos neste experimento.

3.5 CONCLUSÕES

Urediniósporos provenientes das variedades de cana-de-açúcar, RB72 454 e SP89 1115, apresentaram porcentagem de germinação suficiente para iniciar o processo de infecção após 16 dias de armazenamento. Extrato aquoso da variedade de cana-de-açúcar resistente RB86 7515 ao fungo *P. kuehni* reduziu a porcentagem de germinação e o extrato aquoso da variedade suscetível RB72 454 não incrementou a porcentagem de germinação em relação à testemunha ágar-água *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A.A.S.; Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém – Pará, 2007, p 324.
- BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J; SANGUINO, A. First report of *Puccinia kuehni*, causal agente of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2010.
- CONAB. **Cana-de-açúcar safra 2011-2012**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf> . Acesso em: 12 dez. 2011.
- FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 30 jul. 2010.
- FERRARI, J. T., HAKAKAVA, R., DOMINGUES, R. J., TERÇARIOL, I. M. L. Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, Agência paulista de Tecnologia dos agronegócios, Instituto Biológico. **Documento Técnico**, n.5, p.1-8, maio 2010.
- GARCIA, E.O.; CASAGRANDE, M.V.; RAGO, A.M.; MASSOLA JR, N.S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.1-9, 2007.
- INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, E.; GONZALEZ N. *Puccinia kuehni* (KRÜGER) butler y *Puccinia melanocephala* H. sydow y *P. sydow* en el cultivo de la caña de azúcar. **Revista Protección Vegetal**, v.24, p.22-28, 2009.
- MARTINS, T.D. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar**. 2011. 65 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba , 2011.
- OVALLE, W. COMSTOCK, J.C.; GLYNN N.C.; CASTLEBURY L.A. First report of *Puccinia kuehni*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Guatemala. **Plant Disease**, v.92, n.6, p.973, jun. 2008.

REIS, E. M.; RICHTER, R. L. Efeito de Substratos sobre a Germinação de Uredosporos e Comprimento de Tubos Germinativos de *Puccinia triticina*, **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p.75-78, 2007.

STOMAYOR, I.A.; PURDY, L.M.; TRESE, A.T. Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. **Phytopathology**, v.73, n.5, p. 695-699, 1983.

SUZUKI, M.S; SILVEIRA, S.F; ALFENAS, A.C. Germinação de urediniósporos de *Puccinia psidii* Wint em meio de ágar com extratos foliares de goiaba, jambo ou eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, supl., p.285. 1998.

TOKESHI, H; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.(Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 185-196.

4 ARTIGO B: MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE *Puccinia kuehnii in vitro*

Fabiana Tibolla^{1,2*}; Marcelo Giovanetti Canteri³, Ana Maria Conte e Castro⁴.

¹Programa de Pós- Graduação em Agronomia - Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, PR. ²Bolsista CAPES. ³Docente, Universidade Estadual de Londrina, CEP:86051-990, CP. 6001, Londrina, PR. ⁴Docente, Universidade Estadual do Norte do Paraná, CEP: 86360-000, Bandeirantes, PR. *bia_ti@yahoo.com.br

4.1 RESUMO

Com o objetivo de avaliar métodos de preservação de urediniósporos de *Puccinia kuehnii* conduziram-se dois bioensaios sendo o primeiro (B1) com diferentes métodos de desidratação e o segundo (B2), com diferentes métodos de reidratação. B1 e B2 diferiram na inclusão de grânulo de sílica gel em B1 para preservação nos tubos de microcentrífuga. Foram coletadas folhas com sintomas de ferrugem alaranjada, da cultivar de cana-de-açúcar SP89 1115. Os urediniósporos de *P. kuehnii* foram extraídos das folhas com o auxílio de bomba a vácuo. Posteriormente, estes foram acondicionados em tubos de microcentrífuga. Os tratamentos para B1 foram: I: desidratação em sílica gel, liofilização e sem desidratação, II: temperatura ambiente (20°C), geladeira (5°C), congelador (-20°C) e deep-freezer (-80°C). Para B2 os tratamentos foram: I: desidratação em sílica gel e sem desidratação, II: temperatura ambiente (20°C), geladeira (5°C), congelador (-20°C) e deep-freezer (-80°C), III: com reidratação e sem reidratação nas avaliações. Para ambos os experimentos foi realizada a germinação inicial, outras aos 15 e 30 dias de armazenamento e posteriormente a cada 30 dias, até 180 dias. Prepararam-se suspensões de urediniósporos em água e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹). Essas permaneceram a 20°C, no escuro. Para a avaliação da viabilidade, procedeu-se a contagem de 200 urediniósporos por placa. Os dados foram submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis e complementadas com o teste de Dunn. Os resultados demonstraram que a viabilidade decresceu em função do tempo, sendo que os melhores tratamentos atingiram 27,6% e 6,6% aos 30 dias, e 12,0% e 1,9% aos 60 dias, para B1 e B2, respectivamente. O método da desidratação em sílica gel seguido do armazenamento a -80°C foi o único que apresentou urediniósporos viáveis (1,2%) aos 180 dias, para B1. No B2, o melhor método foi preservação com desidratação, armazenados a 5°C, sem reidratação. Esse método apresentou melhor porcentagem de germinação aos 120 dias (0,4%). Não foi observada influência do fator choque térmico na recuperação de urediniósporos viáveis em B2. A inclusão de grânulo de sílica gel no tubo de microcentrífuga permitiu a recuperação da viabilidade dos urediniósporos aos 180 dias.

Palavras-chave: Ferrugem alaranjada. Liofilização. Preservação. sílica gel. *Saccharum officinarum*. Reidratação.

METHODS OF PRESERVATION UREDINIOSPORES OF *Puccinia kuehnii* *in vitro***Abstract**

In order to evaluate preservation methods of *Puccinia kuehnii* urediniospores two bioassays were conducted: the first (B1) about different methods of dehydration, the second (B2) about different methods rehydration. B1 and B2 differed in the inclusion of sílica gel granule in B1 for preservation in tubes microcentrifuge. Leaves with symptoms of rust were collected from cultivar of sugarcane SP89 1115. *P. kuehnii* urediniospores were extracted from the leaves using a vacuum bomb. Later, they were placed in microcentrifuge tubes. Treatments for B1 were: I: dehydration in sílica gel, lyophilization, out dehydration, II: room temperature (20°C), refrigerator (5°C), freezer (-20°C) and deep-freezer (-80°C). Treatments for B2 were: I: dehydration in sílica gel and out dehydration, II: room temperature (20°C), refrigerator (5°C), freezer (-20°C) and deep-freezer (-80°C), III: with and without rehydration in the evaluation. The initial germination was carried out for both experiments, other assessments were made after 15 and 30 days and then every 30 days up to 180 days. Urediniospores suspensions was prepared in water and an 0.1 mL was transferred to Petri dishes containing agar-water (15 g L⁻¹), they remained at 20 ° C in the dark. The germination was assessed count 200 urediniospores/plate. The data were subjected to analysis of variance, nonparametric Kruskal-Wallis and complemented by the Dunn test. Results showed that the viability decreased in function of time, and the best treatments reached 27.6% and 6.6% at 30 days, and 12.0% and 1.9% at 60 days for B1 and B2, respectively. Dehydration method in sílica gel followed by storage at -80 °C was the only treatment that presented viable urediniospores (1.2%) at 180 days. In B2, the best preservation method was dehydration, stored at 5°C, without rehydration. These methods showed better germination percentage at 120 days (0.4%). It was not observed influence of thermal shock in the recovery of viable urediniospores in B2. The inclusion of sílica gel granules in microcentrifuge tube allowed the recovery of viability of urediniospores up to 180 days.

Keywords: Orange rust. Freeze drying. Preservation. sílica gel. *Saccharum officinarum*. Rehydration.

4.2 INTRODUÇÃO

As doenças desempenham importante papel no cultivo da cana-de-açúcar, pois acarretam severas perdas na produtividade. Dentre estas se destacam as ferrugens: a ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler e a ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd) (INFANTE et al., 2009). Ambos os patógenos pertencem à classe dos Basidiomicetos, ordem Pucciniales e a família Pucciniaceae (INDEX FUNGORUM, 2011).

Os sintomas iniciais da ferrugem alaranjada são manchas cloróticas nas folhas mais jovens, progredindo rapidamente para lesões que se rompem, formando as urédias comumente chamadas de pústulas. Estas podem ser observadas na face inferior da folha. Em variedades altamente suscetíveis, as lesões evoluem rapidamente e coalescem, causando a necrose das folhas. As pústulas possuem coloração que variam de alaranjado a castanho avermelhado. Os urediniósporos são unicelulares, ovóides ou piriformes, de coloração amarela a castanho claro e parede celular espessa (TOKESHI; RAGO, 2005; FERRARI et al., 2010).

A ferrugem alaranjada está presente na maioria dos países produtores de cana-de-açúcar. O primeiro relato deste patógeno no continente americano foi nos Estados Unidos em 2007. Posteriormente foi relatada na Nicarágua, Panamá, Costa Rica, Guatemala, Venezuela, Cuba, México e El Salvador (INFANTE et al., 2009; OVALLE, 2008).

No Brasil, a doença foi oficialmente detectada na região de Araraquara-SP, em 2009. Onde se manifestou, com alto índice de severidade, na pré-variedade CV14 (Centaurus) em um campo de multiplicação de clones (BARBASSO et al., 2010).

A presença das pústulas reduz a atividade fotossintética resultando em menor crescimento da planta pelo mau desenvolvimento dos colmos, aceleração da maturação e conseqüente queda de produção. Para ambos os patógenos causadores de ferrugens na cultura, a temperatura ótima para o desenvolvimento situa-se entre 22 à 26°C, com maior amplitude de temperatura para a germinação dos urediniósporos. O genótipo e a idade da planta são fatores importantes para o desenvolvimento da ferrugem, sendo que para *P. melanocephala* a maior sensibilidade da planta ao ataque do patógeno está entre os 4 a 5 meses de idade (INFANTE et al., 2009).

A preservação de patógenos é necessária para se proceder a comparação entre diferentes espécies, identificação de novas raças, estudos laboratoriais, entre outros.

Diferentes métodos de preservação de patógenos têm sido desenvolvidos, sendo que um das mais consagrados é o método proposto por Castellani. Este método tem apresentado boa eficiência para maioria dos patógenos

testados, preservando a sua viabilidade por meses e até anos (PICININI; PASCHOLATI, 1996).

Cada patógeno apresenta comportamento diferente às técnicas utilizadas na preservação. Devendo-se levar em consideração as características que se deseja preservar, desde a viabilidade, manutenção de características morfológicas, até pureza dos isolados (GARCIA et al., 2007).

Para os fungos causadores de ferrugens em plantas, os métodos que envolvem a desidratação seguida do armazenamento em baixas temperaturas, são os que apresentam melhores resultados na manutenção da viabilidade (GARCIA et al., 2007).

Zambenedetti et al.(2007) avaliaram o efeito de diferentes métodos de armazenamento na viabilidade de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd e concluíram que o mais eficiente para este patógeno foi o nitrogênio líquido. Furtado et al. (2008) também compararam diferentes temperaturas e procedimentos de reversão de dormência para urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Concluíram que os urediniósporos armazenados a baixas temperaturas tiveram sua viabilidade aumentada em função da desidratação. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Salustiano et al. (2008), em ensaios realizados com *Puccinia psidii* G. Neste ensaio os urediniósporos da ferrugem foram armazenados em condições de baixas temperaturas e suas estruturas infectivas e viabilidade foram preservadas.

Pesquisas realizadas com *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Erikss. & Henning, *Puccinia triticina* Erikss e *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* Erikss, demonstraram que a utilização de folhas, caule e plântulas foram eficientes na preservação de urediniósporos de ferrugem (IMBABY et al. 2005).

Menzies, Nielsen e Thomas (1997) realizaram ensaio utilizando coleções de isolados de *Ustilago tritici* (Pers.) E. Rostr, provenientes de diversas partes do mundo. Inocularam o patógeno em espiguetas de trigo em fevereiro de 1976, após o amadurecimento, as sementes foram armazenadas em dissegador com sílica gel na temperatura de -15°C. Eles concluíram que das sementes que produziram plantas adultas entre 56 e 98% mostraram sintomas da doença durante os 20 anos de testes.

Assim o presente estudo teve como objetivo testar diferentes métodos para preservação de fungos biotróficos e verificar qual preservará as características morfofisiológicas e a viabilidade dos urediniósporos de *P. kuehni*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro, preservação de urediniósporos de *P. kuehnii* com diferentes métodos de desidratação, o segundo, preservação de urediniósporos de *P. kuehnii* com diferentes métodos de reidratação.

4.3.1 Preservação de Urediniósporos de *Puccinia kuehnii* com Diferentes Métodos de Desidratação

Os urediniósporos de *P. kuehnii* foram obtidos de folhas com sintomas de ferrugem alaranjada da variedade de cana-de-açúcar SP89-1115, coletadas ao acaso, em área localizada no município de Andirá, PR. A coleta das folhas foi realizada no período matutino e logo após foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, onde permaneceram em câmara úmida por 24 horas, a 25°C, para favorecer maior esporulação.

Os urediniósporos de *P. kuehnii* foram extraídos das folhas com o auxílio de bomba a vácuo (Figura 1). Posteriormente, estes foram peneirados em malha de 200 mesh, e acondicionados em tubos de microcentrífuga (0,7 mg/tubo). Os tratamentos, em esquema fatorial com dois fatores, foram compostos por: I: desidratação em sílica gel (24h em dissecador a 20°C, e um grânulo de sílica gel em cada tubo de microcentrífuga), liofilizador (6h em liofilizador a -40°C), sem desidratação, II: temperatura ambiente (20°C), geladeira (5°C), congelador (-20°C) e deep-freezer (-80°C), (Tabela1).

Tabela 1 – Métodos de desidratação (sílica gel, liofilizados, sem desidratação) e temperaturas de armazenamento (20°C, 5°C, -20°C, -80°C) de urediniósporos de *P. kuehnii*, para o primeiro bioensaio.

Tratamentos	Fatores Testados	
	Desidratação	Temperaturas
T1	sílica gel	20°C
T2	sílica gel	5°C
T3	sílica gel	-20°C
T4	sílica gel	-80°C
T5	Liofilizada	20°C
T6	Liofilizada	5°C
T7	Liofilizada	-20°C
T8	Liofilizada	-80°C
T9	S/ desidratação	20°C
T10	S/ desidratação	5°C
T11	S/ desidratação	-20°C
T12	S/ desidratação	-80°C

Avaliou-se a germinação inicial antes de submeter os urediniósporos aos tratamentos. Realizou-se outras avaliações com 15 dias e 30 dias de armazenamento, e posteriormente avaliações a cada 30 dias até completar 180 dias de armazenamento. Para a avaliação de viabilidade, os urediniósporos foram reidratados lentamente, deixando-se os tubos de microcentrífuga abertos por 4 horas em câmara úmida. Em seguida, prepararam-se suspensões de urediniósporos em água e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹). Cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri. Cada tratamento foi composto por cinco repetições. As placas inoculadas foram mantidas na temperatura de 20°C, no escuro. A germinação foi interrompida após 24h, utilizando-se lactofenol.

Para a avaliação, cada placa foi subdividida em quadrantes, procedendo-se então a contagem de 50 urediniósporos por quadrante, totalizando 200 urediniósporos por placa, com o auxílio de microscópio ótico. Consideraram-se como urediniósporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo maior que o seu diâmetro.

Figura 1 – Equipamento utilizado na extração dos urediniósporos de *P. kuehnii* em folhas de cana-de-açúcar: bomba de vácuo, coletor de vidro e mangueira para sucção dos urediniósporos.



4.3.2 Preservação de Urediniósporos de *Puccinia kuehnii* com Diferentes Métodos de Reidratação

Os urediniósporos de ferrugem alaranjada foram obtidos e processados segundo o mesmo método do bioensaio anterior. Posteriormente, estes foram acondicionados em tubos de microcentrífuga (0,2 mg cada um). Os tratamentos, em esquema fatorial com 3 fatores, foram constituídos de: I: desidratação em sílica gel (24h em dissecador a 20°C) e sem desidratação, II: temperatura ambiente (20°C), geladeira (5°C), congelador (-20°C) e deep-freezer (-80°C), III: com reidratação e sem reidratação (câmara úmida por 24h) (Tabela 2).

Tabela 2 – Métodos de desidratação (com e sem desidratação), Temperaturas de armazenamento (20°C, 5°C, -20°C, -80°C) e reidratação (com e sem reidratação) de urediniósporos de *P. kuehnii*, para o segundo bioensaio.

Tratamentos	Fatores Testados		
	Temperatura	Desidratação	Reidratação
T1	20°C	sílica gel	Sim
T2	20°C	sílica gel	Não
T3	20°C	S/ desidratação	Sim
T4	20°C	S/ desidratação	Não
T5	5°C	sílica gel	Sim
T6	5°C	sílica gel	Não
T7	5°C	S/ desidratação	Sim
T8	5°C	S/ desidratação	Não
T9	-20°C	sílica gel	Sim
T10	-20°C	sílica gel	Não
T11	-20°C	S/ desidratação	Sim
T12	-20°C	S/ desidratação	Não
T13	-80°C	sílica gel	Sim
T14	-80°C	sílica gel	Não
T15	-80°C	S/ desidratação	Sim
T16	-80°C	S/ desidratação	Não

Procedeu-se avaliação inicial da germinação antes de submeter os urediniósporos aos tratamentos. Realizou-se outras avaliações com 15 dias e 30 dias de armazenamento, e posteriormente avaliações a cada 30 dias até completar 150 dias de armazenamento. Para a avaliação de viabilidade prepararam-se suspensões de urediniósporos em água e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para placas de Petri contendo meio ágar-água (15g L⁻¹). Cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri. Sendo que cada tratamento foi composto por oito repetições. As placas inoculadas foram mantidas na temperatura de 20°C, no escuro. A germinação foi interrompida após 24h, utilizando lactofenol.

Para a avaliação, cada placa foi subdividida em quadrantes, procedendo-se então a contagem de 50 urediniósporos por quadrante, totalizando 200 urediniósporos por placa, com o auxílio de microscópio ótico. Consideraram-se como urediniósporos germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo maior que seu diâmetro.

4.3.3 Análise dos Dados

O delineamento experimental foi em esquema fatorial, para ambos os bioensaios, porém não foi possível observar homocedasticidade da variância e normalidade dos dados coletados. Fato este, decorrente do aparecimento de porcentagens iguais a zero e próximas a zero, ao longo das avaliações nos dois bioensaios. Assim os dados foram submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, e complementadas com o teste de Dunn, para identificação de diferenças significativas entre as amostras, duas a duas. Os dados foram analisados no programa Bioestat.

4.4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.4.1 Preservação de Urediniósporos de *Puccinia kuehnii* com Diferentes Métodos de Desidratação

Os resultados obtidos no experimento de preservação de urediniósporos de *P. kuehnii*, com diferentes métodos de desidratação, demonstraram que a porcentagem de viabilidade dos urediniósporos de ferrugem alaranjada decresceu em função do tempo, independente dos tratamentos testados (Tabela 3).

Os urediniósporos desidratados em sílica gel, preservados a 20°C, obtiveram maior valor para porcentagem de germinação aos 15 dias de armazenamento. Este tratamento diferiu significativamente ($p < 0,01$) dos tratamentos onde os urediniósporos foram desidratados em liofilizador e preservados a 20°C, 5°C e -20°C.

Tabela 3 – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* (ferrugem alaranjada), após armazenamento por períodos de 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, desidratados em sílica gel (DS), desidratados em liofilizador (DL) e sem desidratação (SD), em temperaturas de 20, 5, -20 e -80°C.

Tratamentos	% Germinação (DAA)**													
	15		30		60		90		120		150		180	
DS, 20°C	25,6	a	27,6	a	0,6	bcd	0,2	ab	0	a	0	A	0	a
DS, 5°C	7,0	abc	7,2	b	1,0	abcd	1,0	ab	0	a	0	a	0	a
DS, -20°C	11,0	abc	12,2	ab	10,6	abc	0,6	ab	0	a	0	a	0	a
DS, -80°C	14,6	abc	13,4	ab	6,2	abc	0,2	ab	6,2	a	1,0	a	1,2	a
DL, 20°C	4,0	c	7,6	b	0	d	0,4	ab	0	a	0	a	0	a
DL, 5°C	4,6	bc	10,0	ab	1,8	abcd	0,6	ab	0	a	0	a	0	a
DL, -20°C	5,2	bc	10,0	ab	0	d	0,4	ab	0	a	0	a	0	a
DL, -80°C	6,4	abc	12,0	ab	2,4	abcd	0	b	0	a	0	a	0	a
SD, 20°C	7,0	abc	9,4	b	0,2	cd	0	b	0	a	0	a	0	a
SD, 5°C	12,8	abc	12,8	ab	0	d	0	b	0,2	a	0	a	0	a
SD, -20°C	4,0	bc	15,8	ab	5,0	abcd	0	b	0	a	0	a	0	a
SD, -80°C	15,0	ab	11,2	ab	12,0	a	2,8	a	0	a	0	a	0	a
p-valor	< 0,01		< 0,01		< 0,01		0,03		0,23		1		0,99	

* A germinação no dia do armazenamento, foi igual a 43,5% para todos os tratamentos.

** DAA: Dias Após o Armazenamento.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$), 5placas/tratamento.

Os urediniósporos desidratados em liofilizador, preservados a 20°C, também foram significativamente ($p < 0,01$) diferentes dos urediniósporos sem desidratação, preservados a -80°C. Já os urediniósporos de ferrugem alaranjada submetidos à desidratação em liofilizador, preservados a 20°C, foram os que apresentaram menor porcentagem média de germinação na avaliação aos 15 dias após o armazenamento.

Na avaliação aos 30 dias de armazenamento foi possível constatar diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os urediniósporos submetidos à desidratação em sílica gel, preservados a 20°C e os urediniósporos submetidos a desidratação em sílica gel preservados a 5°C, liofilizador preservados a 20°C e sem desidratação preservados a 20°C. Os urediniósporos desidratados em sílica gel, preservados a 20°C apresentaram melhores porcentagens de viabilidade no período analisado. Os urediniósporos desidratados em sílica gel e armazenados a 5°C apresentaram menor porcentagem média de germinação.

Aos 60 dias após o armazenamento, o número de tratamentos que diferiram foi superior aos das avaliações anteriores (tabela 3). Neste período de armazenamento, os urediniósporos que apresentaram melhores porcentagens de germinação foram os que não receberam desidratação, preservados a -80°C . Os urediniósporos desidratados em liofilizador preservados a 20°C e -20°C e os urediniósporos sem desidratação preservados a 5°C não apresentaram germinação ($p < 0,01$).

Com 90 dias de armazenamento, os urediniósporos sem desidratação preservados a -80°C obtiveram as melhores porcentagens de germinação. Este tratamento diferiu significativamente ($p \leq 0,03$) dos tratamentos onde os urediniósporos foram desidratados em liofilizador, preservados a -80°C , e também dos urediniósporos sem desidratação preservados a 20°C , 5°C e -20°C . Nestes tratamentos a porcentagem de germinação foi igual a zero.

A partir da 4ª avaliação (90 dias) não foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos devido ao elevado número de médias iguais ou próximas a zero em todos os tratamentos analisados. Os urediniósporos de *P. kuehnii* submetidos à desidratação em sílica gel e preservados a -80°C apresentou os melhores resultados ao longo do período de armazenamento (180 dias). Apesar da brusca queda de germinação em relação à porcentagem inicial, 36 pontos percentuais a menos, este foi o único tratamento que apresentou germinação em todos os períodos avaliados (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 2 – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre três diferentes desidratações (sílica gel, liofilização e sem desidratação) e quatro temperaturas 20°C (A), 5°C (B), -20°C (C) e -80°C (D).

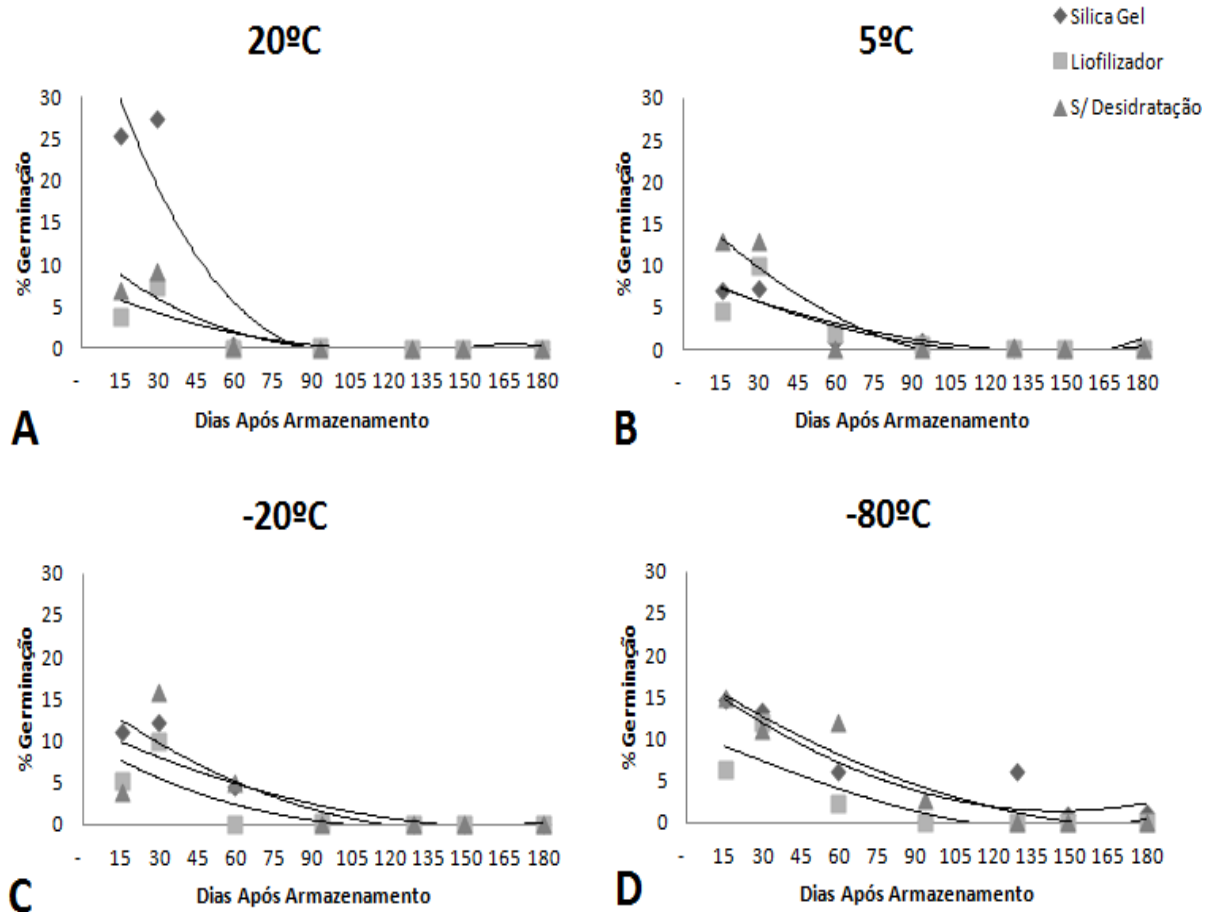


Figura 3 – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre quatro temperaturas (20°C, 5°C-20°C e -80°C) e três diferentes desidratações: sílica gel (A), liofilização(B) e sem desidratação(C).

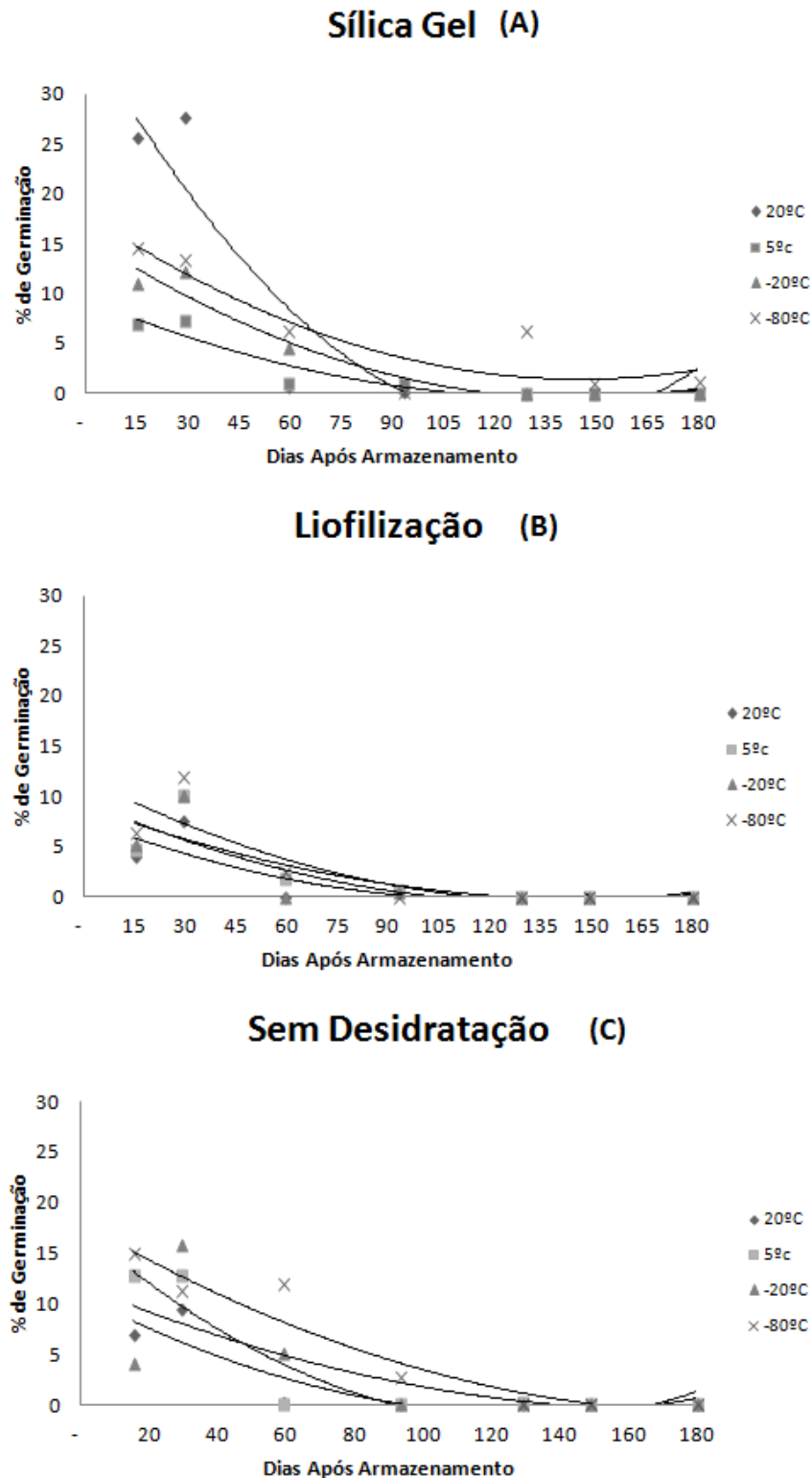
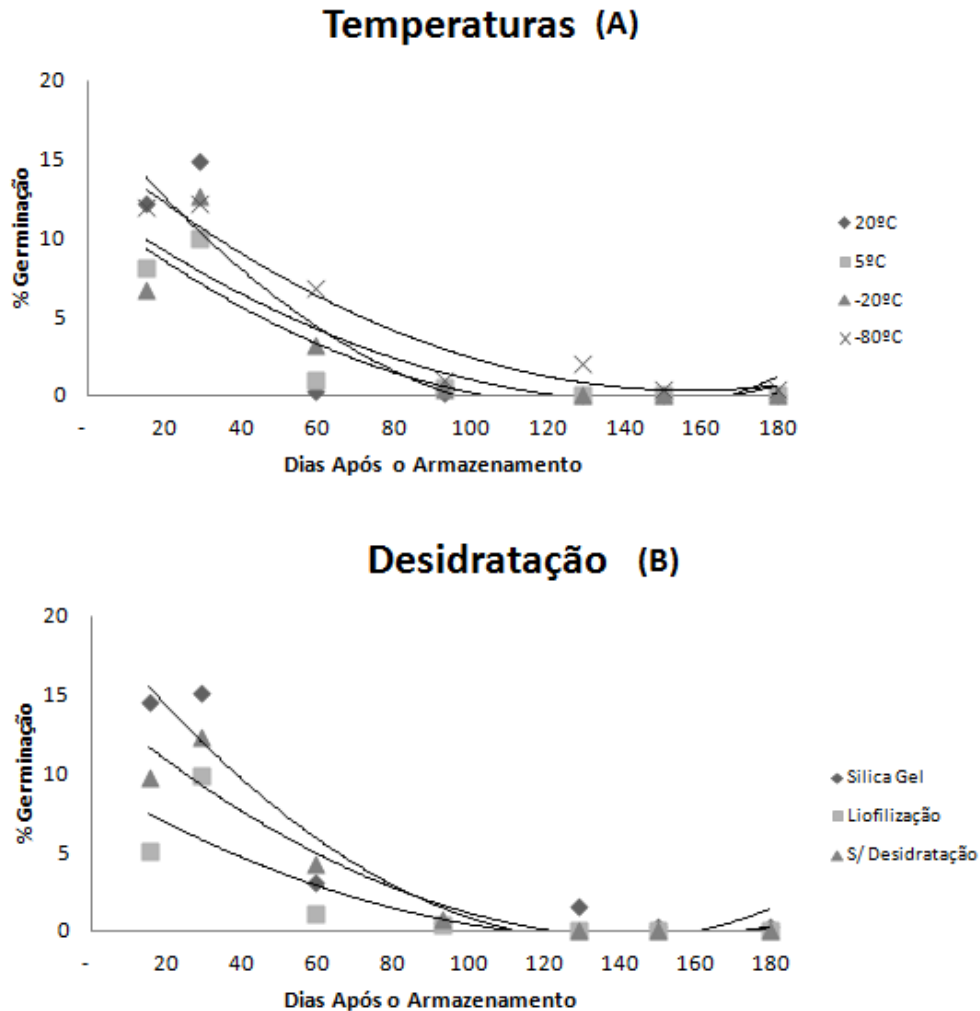


Figura 4 – Média das porcentagens médias de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função dos dias após o armazenamento, sobre a influência dos fatores temperaturas (A) e desidratações (B).



Analisando os tratamentos por avaliação, foi possível observar que para os 15 e 30 dias de armazenamento os urediniósporos que apresentaram melhores porcentagens de germinação foram os submetidos à desidratação em sílica gel preservados a 20°C. A porcentagem média observada aos 15 dias foi de 25,6%, valor, em média, 17 pontos percentuais superior aos demais tratamentos testados. Na avaliação de 30 dias a porcentagem média foi de 27,6%, em torno de 16 pontos percentuais, acima dos demais tratamentos analisados.

Nas avaliações realizadas aos 60 e 90 dias após o armazenamento, os urediniósporos sem desidratação, preservados a -80°C tiveram acréscimo médio de 10 pontos percentuais aos 60 dias. Aos 90 dias a porcentagem de todos os

tratamentos teve queda acentuada na germinação, valores estes iguais ou próximos a zero. Os urediniósporos, sem desidratação seguidos de armazenamento a -80°C apresentaram em média 2,5 pontos percentuais, índice acima da média geral dos demais tratamentos.

Os resultados do experimento corroboram com os resultados alcançados por outros autores para preservação de fungos, parasitas obrigatórios de plantas. Teste semelhante a este foi realizado com urediniósporos de *P. melanocephala*. No qual os autores observaram que a preservação dos urediniósporos a baixas temperaturas (-20°C e -80°C), antecedidos de desidratação em sílica gel, manteve a viabilidade por um período de até um ano de armazenamento (GARCIA et al., 2007).

Resultados semelhantes foram obtidos por Pérez-García et al. (2006) testando diferentes técnicas de armazenamento de *Podospaera fusca* Fr. Os autores observaram que a desidratação em sílica gel seguida de armazenamento em deep-freezer (-80°C) foi o método mais viável.

Faleiro et al. (2000) verificaram que a germinação de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* Pers, decresceu rapidamente em todas as temperaturas testadas. Ensaio realizado com *Puccinia psidii* G., sobre diferentes temperaturas de armazenamento, mostraram que o fungo se manteve viável e suas estruturas infectivas foram preservadas. Os tratamentos nitrogênio líquido (-196°C), deep-freezer (-80°C) e geladeira (5°C) foram os que apresentaram melhores resultados ao final do período de preservação. Estes tratamentos mantiveram os urediniósporos viáveis e infectivos por um período de até 150 dias após o armazenamento (SALUSTIANO et al., 2008).

Zambenedetti et al.(2007) avaliaram o efeito de diferentes métodos de armazenamento na viabilidade de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd & P. Syd. Os autores testaram o armazenamento de folhas herborizadas com urediniósporos (24°C), armazenamento de urediniósporos em dessecador (10°C) + nitrogênio líquido (-196°C), em geladeira (4°C), deep-freezer (-80°C) e em nitrogênio líquido e concluíram que o melhor métodos para o armazenamento deste patógeno foi o nitrogênio líquido.

A desidratação em sílica gel anidra foi testada para o fungo *Duddingtonia flagrans* (Dudd.). Diferentes isolados foram preservados em frascos contendo sílica gel por um período de 7 anos. Estes mantiveram a sua atividade

predatória, sobre Cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae), (BRAGA et al., 2011).

Menzies, Nielsen e Thomas (1997) utilizaram coleções de isolados de *Ustilago tritici*. As sementes foram armazenadas em dessecador com sílica gel a -15 °C. Após 20 anos de testes os autores concluíram que entre 57 e 83% das sementes produziram plantas adultas. Destas, 56 e 98% mostraram sintomas da doença.

Todos os trabalhos citados corroboram com os resultados obtidos neste bioensaio, no qual se constatou que o método mais adequado para preservação depende do período em dias que se deseja preservar os urediniósporos. Para períodos superiores a 90 dias o método que preservou a viabilidade dos urediniósporos de *P. kuehnii* foi à desidratação em sílica gel seguida de armazenamento a -80°C.

4.4.2 Preservação de Urediniósporos de *Puccinia kuehnii* com Diferentes Métodos de Reidratação

Inicialmente, este bioensaio foi planejado em delineamento fatorial com 4 fatores, ou seja, além dos fatores temperatura, desidratação e reidratação, haviam também o fator choque térmico (com e sem). O choque térmico foi executado mantendo os tubos de microcentrífuga contendo os urediniósporos a 40°C /5min antes da avaliação da germinação (Furtado, 2008). Porém em função da utilização da análise não paramétrica houve necessidade da redução do número de tratamentos totais para aplicação do teste de Dunn. Assim, procedeu-se o teste de Mann-Whitney, que visou verificar a existência de diferenças dentro de cada fator, isoladamente, e desta forma desconsiderar nas análises o fator que não apresentou diferença.

Com a realização do teste de Mann-Whitney, verificou-se que o fator choque térmico não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). Desta forma foram excluídos os tratamentos com choque térmico, das análises posteriores.

Os resultados do ensaio de preservação de urediniósporos de *P. kuehnii* com diferentes métodos de reidratação, demonstraram que a porcentagem

de germinação, viabilidade, dos urediniósporos de ferrugem alaranjada, decresceu ao longo do período analisado (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* (ferrugem alaranjada), após armazenamento por períodos de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias desidratados (CD) ou sem (SD) desidratação em sílica gel e com (CR) ou sem reidratação (SR), em temperaturas de 20, 5, -20 e -80°C.

Tratamentos	% Germinação (DAA)*											
	15		30		60		90		120		150	
20°C, CD, CR	3,75	bc	4,00	a	0,50	a	0,00	a	0,00	a	0	A
20°C, CD, SR	3,75	bc	3,13	a	0,13	a	0,00	a	0,00	a	0	A
20°C, SD, CR	3,06	bc	4,19	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0	A
20°C, SD, SR	2,50	c	5,63	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0	A
5°C, CD, CR	5,69	ab	3,06	a	0,38	a	0,00	a	0,00	a	0	A
5°C, CD, SR	3,19	bc	3,63	a	0,00	a	0,38	a	0,38	a	0	A
5°C, SD, CR	3,75	bc	3,75	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0	A
5°C, SD, SR	2,88	bc	4,44	a	1,00	a	0,75	a	0,00	a	0	A
-20°C, CD, CR	5,06	abc	5,94	a	0,00	a	0,13	a	0,00	a	0	A
-20°C, CD, SR	2,88	bc	5,38	a	0,88	a	0,25	a	0,00	a	0	A
-20°C, SD, CR	11,94	a	3,38	a	0,00	a	0,00	a	0,13	a	0	A
-20°C, SD, SR	3,35	bc	4,44	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0	A
-80°C, CD, CR	3,88	bc	4,00	a	1,88	a	0,25	a	0,00	a	0	A
-80°C, CD, SR	3,50	bc	6,63	a	0,13	a	0,00	a	0,00	a	0	A
-80°C, SD, CR	4,88	abc	2,94	a	0,25	a	0,13	a	0,00	a	0	A
-80°C, SD, SR	4,94	abc	5,69	a	0,25	a	0,63	a	0,00	a	0	A
p- valor	< 0,001		0,003		0,068		0,973		1		1	

* * A germinação no dia do armazenamento, foi igual a 43,2% para todos os tratamentos.

** DAA: Dias Após o Armazenamento.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$), 8placas/tratamento.

Os urediniósporos sem desidratação em sílica gel, preservados a -20°C e submetidos a reidratação antes da avaliação, proporcionaram maior porcentagem de germinação aos 15 dias de armazenamento. Este tratamento foi semelhante aos urediniósporos submetidos à desidratação em sílica gel, preservados a 5°C, com reidratação; desidratação em sílica gel, preservados a -20°C, com reidratação; sem desidratação em sílica gel, preservados a -80°C, com e sem reidratação. Para os demais tratamentos, a porcentagem de germinação dos urediniósporos sem desidratação em sílica gel, preservados a -20°C e submetidos a reidratação foram significativamente ($p < 0,05$) superiores.

O tratamento sem desidratação em sílica gel preservado a 20°C, sem reidratação apresentou menores porcentagens de germinação no período de 15 dias após o armazenamento, 40 pontos percentuais a menos que a porcentagem média obtida no início do experimento. Aos 30 dias de armazenamento, não foi possível constatar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, dois a dois, pelo teste de Dunn.

A partir dos 60 dias após armazenamento, foram constatados valores médios iguais ou próximos de zero. Não sendo possível detectar diferenças significativas ($p < 0,05$), entre os tratamentos.

Os resultados demonstraram que a viabilidade dos urediniósporos decresceu em relação a porcentagem inicial (43%), sendo que os melhores tratamentos atingiram 6,63% aos 30 dias e 1,88% aos 60 dias (Tabela 4). Apesar de ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$) a partir dos 30 dias, os urediniósporos desidratados, preservados a 5°C, sem reidratação e os urediniósporos sem desidratação, preservados a -20°C, com reidratação apresentaram viabilidade ao longo do período de 120 dias, 0,38% e 0,13%, respectivamente.

Figura 5 – Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. kuehnii* em função do tempo de armazenamento, sobre duas diferentes desidratações (sílica gel e sem desidratação), e duas diferentes reidratações (Com e sem reidratação em câmara úmida) e quatro temperaturas 20°C (A), 5°C (B), -20°C (C) e -80°C (D).

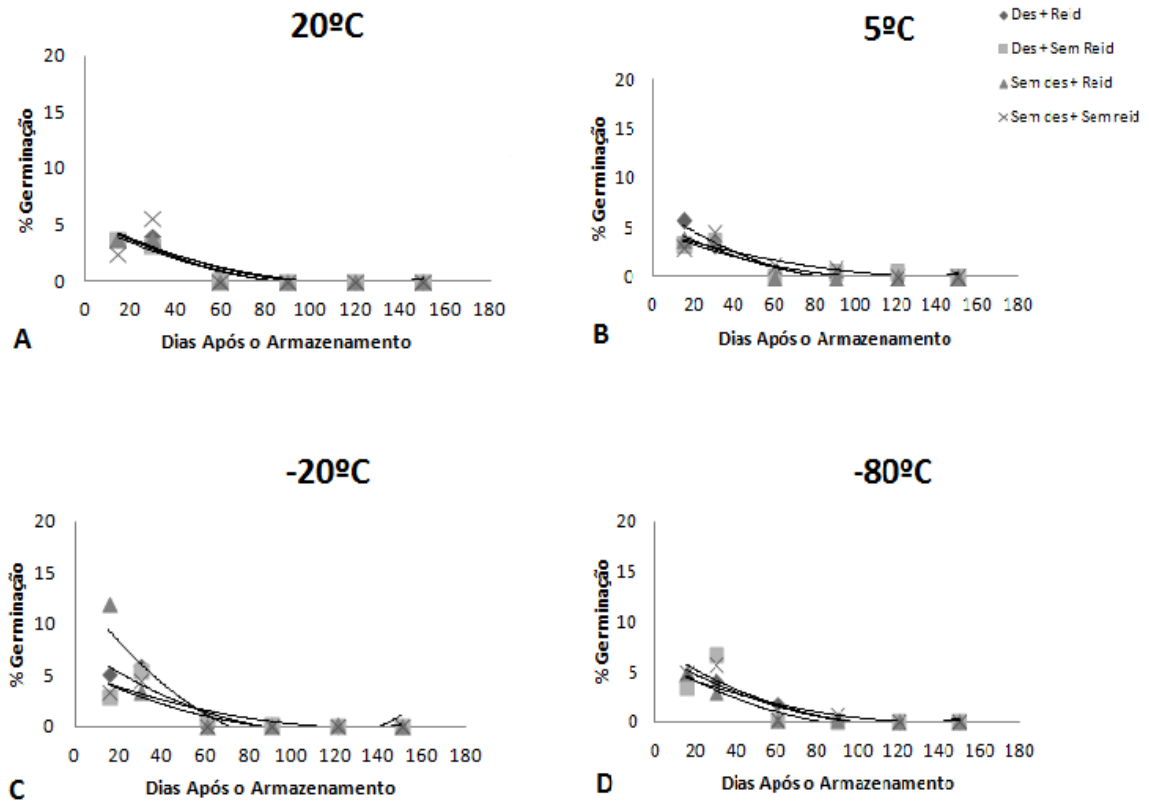
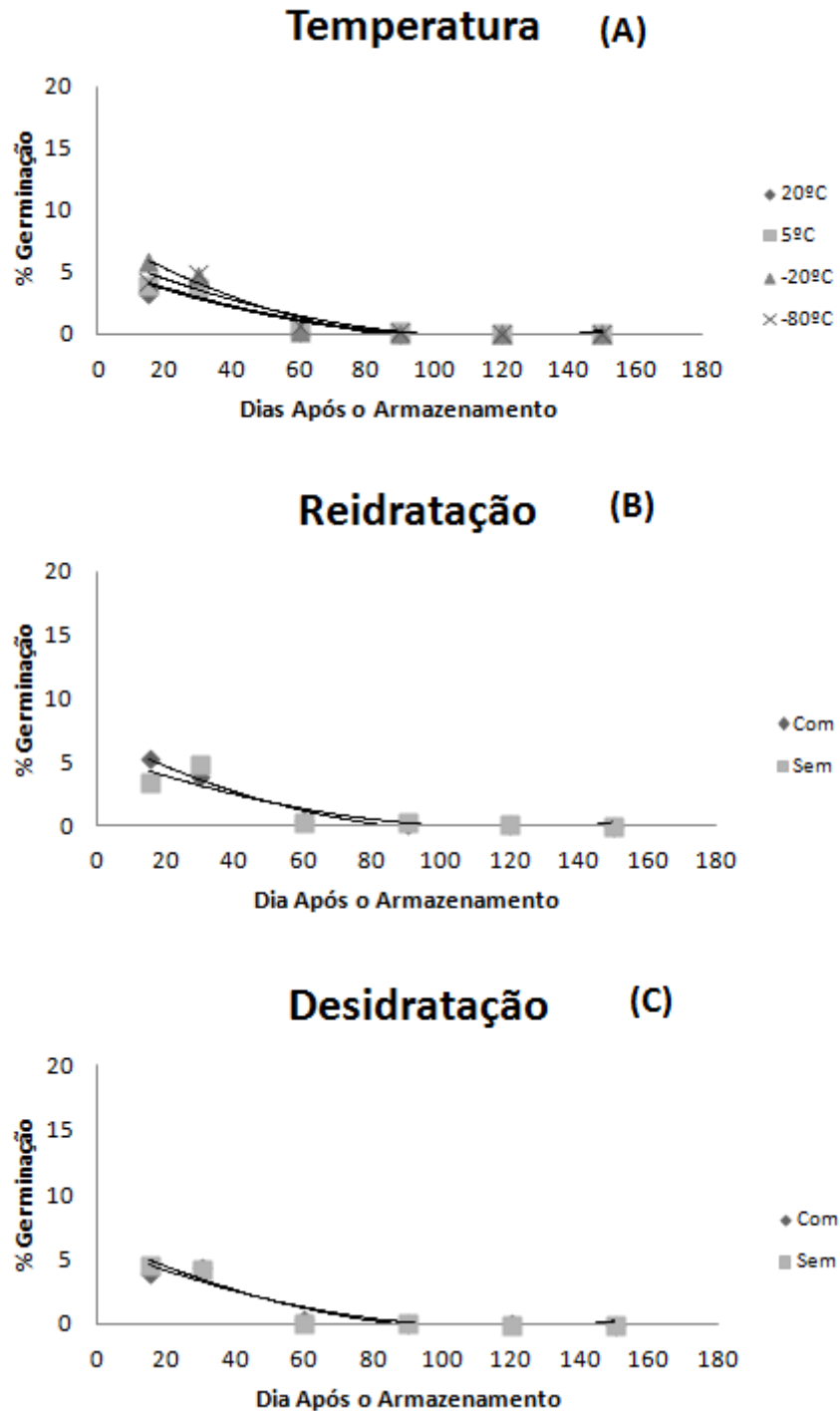


Figura 6 – Média das porcentagens médias de germinação de urediniósporos de *P. kuehnii* em função dos dias após o armazenamento, sob a influência dos fatores temperaturas (A), desidratações (B) e reidratações (C).



A preservação de patógenos parasitas obrigatórios de plantas tem sido estudada ao longo dos anos por diversos autores. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com os dados alcançados por outros pesquisadores

para preservação destes patógenos. A preservação em baixas temperaturas, antecedidas de diferentes métodos de desidratação, vem sendo empregada com sucesso para preservação destes patógenos por períodos prolongados (CRUZ et al., 2009; SALUSTIANO et al., 2008; GARCIA et al., 2007; ZAMBENEDETTI et al., 2007; FALEIRO et al., 2000).

Furtado et al. (2008) compararam diferentes temperaturas e procedimentos de reversão de dormência para urediniósporos de *P. pachyrhizi*. Os tratamentos testados foram: temperatura ambiente, 5°C, -20°C e -80°C, urediniósporos desidratados e não desidratados, reversão de dormência com choque térmico (40°C/5 min.) e com reidratação (câmara úmida/ 24h). As conclusões foram que urediniósporos armazenados em temperatura ambiente não sobreviveram mais que um mês independentemente da hidratação. Já os urediniósporos armazenados a baixas temperaturas tiveram sua viabilidade aumentada em função da desidratação. Dentre os tratamentos que passaram pelo choque térmico, os que foram armazenados a -80°C e que envolveram hidratação alcançaram de 85 a 92% da germinação inicial.

Resultados semelhantes foram observados no presente bioensaio, onde urediniósporos armazenados a 20°C apresentaram baixa porcentagem de germinação aos 60 dias (0,5%, 0,13%, 0% e 0%), nos quatro tratamentos. Chegando a zero nos demais períodos avaliados, independentemente da desidratação e reidratação. Os urediniósporos armazenados em baixas temperaturas, 5°C e -20°C, apresentaram melhores porcentagens de viabilidade aos 120 dias de armazenamento. Ao contrário, do que foi observado por Furtado, os tratamentos que passaram por choque térmico, não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Furtado et al. (2009), utilizaram urediniósporos de *P. pachyrhizi*, submetidos o método de preservação proposta por Furtado et al. (2008) modificada. Esta consiste em desidratar os urediniósporos em sílica gel (dissecador/24h), armazenar a -80°C, submetê-los ao choque térmico (40°C/ 1min) e reidratá-los (câmara úmida/16h). Constatou-se com o trabalho que o método empregado na preservação dos urediniósporos foi adequada, possibilitando a realização de outros experimentos *in vitro*.

Os trabalhos citados corroboram com os resultados obtidos neste bioensaio. Onde se pode observar que o método mais eficiente para preservação, a

curtos períodos de tempo, foram aqueles onde os urediniósporos de *P. kuehnii* foram desidratados, armazenado em baixas temperaturas e reidratados.

Os ensaios foram realizados em intervalo de 5 dias de diferença, sendo que a porcentagem inicial de germinação foi de 43,5% para o primeiro bioensaio e 43,2% para o segundo bioensaio.

Nos tratamentos que foram desidratados em sílica gel e posteriormente reidratados, a porcentagem de germinação foi maior no primeiro bioensaio para todas as temperaturas testadas. Os resultados demonstraram a viabilidade dos urediniósporos aos 30 dias foram de: 27,6% e 4,0% em 20°C, 7,2% e 3,1% em 5°C, 12,2% e 6,0% em -20°C e 13,4% e 4,0% em -80°C, para primeiro e segundo bioensaios, respectivamente.

Isso pode ter ocorrido, devido ao fato de que no primeiro bioensaio, após a desidratação em dessecador de sílica gel, os tubos de microcentrífuga contendo os urediniósporos receberam um grânulo de sílica gel, antes de serem lacrados. Já no segundo bioensaio não foram adicionados aos tubos de microcentrífuga o grânulo de sílica gel. Essa variação no método pode explicar o fato da viabilidade dos urediniósporos terem sido menores, neste bioensaio do que no primeiro.

Aos 30 dias de armazenamento comparando os resultados de germinação, do melhor tratamento do primeiro bioensaio, com os resultados do segundo bioensaio, para o mesmo tratamento, constatou-se um incremento de 23,6 pontos percentuais a preservação de urediniósporos que continham o grânulo de sílica gel.

4.5 CONCLUSÕES

Conclui-se com o presente trabalho que a desidratação de urediniósporos em sílica gel, com a inclusão do grânulo de sílica gel no tubo de microcentrífuga, seguido do armazenamento a -80°C foi o método que preservou a viabilidade dos urediniósporos de *P. kuehnii* até os 180 dias (1,2%).

O fator choque térmico não apresentou influência na recuperação de urediniósporos viáveis, neste experimento.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A.A.S. Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém – Pará, 2007, p 324.
- BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J; SANGUINO, A.; First report of *Puccinia kuehnii*, causal agente of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2010.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; ARAUJO, M. A.; TAVELA, A. O.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F.; BENJAMIN, L. A.; FRASSY, L. N.; Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). **Experimental Parasitology**, v.128, p.460–463, 2011.
- CONAB. **Cana-de-açúcar safra 2011-2012**. Disponível em: <www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_27_11_53_13_boletim_cana_portugues_-_maio_2011_1o_lev.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2011.
- CRUZ, J.C.S.; SOUZA, N.L.; PADOVANI, C.R.; FURTADO, E.L.; Preservação do inóculo de *Plasmodiophora brassicae* utilizando o método de congelamento. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, p.57-59, 2009.
- FALEIRO, F.G.; RAGAMIN, V.A.; VINHADELLI, W.S.; MESQUITA, A.G.G.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G.; Redução da capacidade de infecção de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* após o armazenamento em diferentes condições. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.1, p.98-100, 2000.
- FERRARI, J. T.; HAKAKAVA, R.; DOMINGUES, R. J.; TERÇARIOL, I. M. L.; Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, Agência paulista de Tecnologia dos agronegócios, Instituto Biológico. **Documento Técnico**, n.5, p.1-8, maio 2010.
- FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; GODOY, C. V.; SALATINO, M. L.F.; MASSOLA JR, N. S.; Influência da luminosidade e da camada de cera epicuticular de superfícies de folhas de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*, **Tropical plant pathology**, v. 34, n.5, p. 306-312, 2009.
- FURTADO, G. Q.; ALVES, S.A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C.; MASSOLA JR, N. S.; Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Uredospores. **Journal of Phytopathology** n.156, p. 62–64, 2008.
- GARCIA, E.O.; CASAGRANDE, M.V.; RAGO, A.M.; MASSOLA JR, N.S.; Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**. v.33, n.2, p.1-9, 2007.
- IMBABY, I. A.; NAZARIM, M.; ALI, M. M.; NAGWA, I. A.; Viability of Wheat Rust Urediniospores Produced on Different Stages of Susceptible Plants, **Egypt. Journal Phytopathology**, v. 33, n.1, p. 59-76, 2005.

INDEX FUNGORUM. Disponível em:

<<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=243512>>.

Acesso em: 09 ago. 2011.

INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, E.; GONZALEZ, N.; *Puccinia kuehnii* (KRÜGER) butler y *Puccinia melanocephala* H. sydow y *P. sydow* en el cultivo de la caña de azúcar. **Revista Protección Vegetal**, v.24, p.22-28, 2009.

MARTINS, T.D. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar**. 2011. 65 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba , 2011.

MENZIES, J. G.; NIELSEN, J.; THOMAS, P. L.; Long-term storage of *Ustilago tritici*. **Plant Disease**, v. 81, p.1328-1330, 1997.

OVALLE, W. COMSTOCK, J.C.; GLYNN N.C.; CASTLEBURY L.A.; First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Guatemala. **Plant Disease**. v. 92, n.6, p.973, junho-2008.

PÉREZ-GARCÍA, A.; MINGORANCE, E.; RIVERA, M. E.; DEL PINO, D.; ROMERO, D.; TORÉS, J. A.; DE VICENTE, A.; Long-term Preservation of *Podospheera fusca* Using Silica Gel, **Journal of Phytopathology**, n.154, p.190–192, 2006.

PICININI, E.; PASCHOLATI, S.F.; Crescimento, esporulação e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum graminicola* após 14 anos de preservação pelo método de Castellani. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.499-502, 1996

SALUSTIANO M.E.; POZZA, E.A.; FERRAZ FILHO, A.C.; CASTRO, H.A. Viability of *Puccinia psidii* urediniospores stored in different environments. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p. 313-316, 2008

TOKESHI, H; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.(Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2. p. 185-196.

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E, POZZA, E.A.; ARAÚJO, D.V.; Germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.83-85, 2007.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Urediniósporos provenientes das variedades de cana-de-açúcar, RB72 454 e SP89 1115, apresentaram porcentagem de germinação suficiente para iniciar o processo de infecção após 16 dias de armazenamento. Extrato aquoso da variedade de cana-de-açúcar resistente RB86 7515 ao fungo *P. kuehnii* reduziu a porcentagem de germinação e o extrato aquoso da variedade suscetível RB72 454 não incrementou a porcentagem de germinação em relação à testemunha ágar-água *in vitro*.

Urediniósporos de *P. kuehnii* desidratados em sílica gel, que receberam um grânulo de sílica gel no tubo de microcentrifuga, seguidos de armazenamento a -80°C tiveram sua viabilidade preservadas até os 180 dias (1,2%). A utilização de choque térmico para reversão de dormência, não apresentou influência na recuperação de urediniósporos viáveis, neste experimento.

REFERÊNCIAS

- BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J; SANGUINO, A. First report of *Puccinia Kuehnii*, causal agente of orange rust of sugarcane, in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, 2010.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; ARAUJO, M. A.; TAVELA, A. O.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F.; BENJAMIN, L. A.; FRASSY, L. N. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae), **Experimental Parasitology**, v.128 p.460–463, 2011.
- 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. **Australian Plant Pathology**, v.38, n.4, p.380-388, 2009.
- BRASIL. **Ferrugem alaranjada (*Puccinia Kuehnii*)**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/PRINCIPAL/DESTAQUES/FERRUGEM_ALARANJADA/CARTA_0.PDF Acesso em: 03 Maio 2010.
- BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v.32, p.42-50, 2006.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. Disponível em: http://www.ctcanavieira.com.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=507:ferrugem-alaranjada-da-cana-de-acucar-mapa>. Acesso em: 18 ago. 2011.
- CONAB. **Cana-de-açúcar safra 2011-2012**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf . Acesso em: 12 dez. 2011.
- CRUZ, J. C. S.; SOUZA, N. L.; PADOVANI, C. R.; FURTADO, E. L. Preservação do inóculo de *Plasmodiophora brassicae* utilizando o método de congelamento. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, p.57-59, 2009.
- DAHMEN, H., STAUB, T. H; SCHWINN, F. J. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen, **Phytopathology**, v.73, p.241-246, 1983.
- DELCÁN, J.; MOYANO, C.; RAPOSO, R.; MELGAREJO, P. Storage Of *Botrytis cinerea* Using Different Methods, **Journal of Plant Pathology**, v.84, n.1, p.3-9, 2002.
- FALEIRO, F. G.; RAGAMIN, V. A.; VINHADELLI, W. S.; MESQUITA, A. G. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Redução da capacidade de infecção de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus* após o armazenamento em diferentes condições. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.1, p.98-100, 2000
- FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 30 jul. 2010.

FERRARI, J. T.; HARAKAVA, R.; DOMINGUES, R. J.; TERÇARIOL, I. M. L. Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, Agência paulista de Tecnologia dos agronegócios, Instituto Biológico. **Documento Técnico**, n.5, p.1-8, maio 2010.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S.A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C.; MASSOLA JR, N. S. Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Uredospores, **Journal of Phytopathology**, n.156, p. 62–64, 2008.

GARCIA, E. O.; CASAGRANDE, M. V.; RAGO, A. M.; MASSOLA JR, N. S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia Melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.1-9, Junho/2007.

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**, v.59, p. 703-711, 2010.

GRIVELL, A. R.; JACKSON, J. F. Microbial Culture Preservation With Silica Gel, **Journal Genetic Microbiology**, v.58, p.423-425, 1969.

HOOPEN, G. M.; ORTÍZ, J. L.; AGUILAR, M. E.; KRAUSS, U. Preservation methodology for Rosellinia species, **Mycological Research**, v.108, n.3, p.274–282, 2004.

IMBABY, I. A.; NAZARIM, M.; ALI, M. M.; NAGWA, I. A. Viability of Wheat Rust Urediniospores Produced on Different Stages of Susceptible Plants, **Egypt. Journal Phytopathology**, v. 33, n.1, p. 59-76, 2005.

INDEX FUNGORUM: Disponível em:
<<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=243512>>.
Acesso em: 09 ago. 2011

INFANTE, D.; MARTINEZ, B.; GONZALEZ, E.; GONZALEZ N. *Puccinia Kuehnii* (KRÜGER) butler y *Puccinia Melanocephala* H. sydow y *P. sydow* en el cultivo de la caña de azúcar. **Revista Protección Vegetal**, v.24, p.22-28, 2009.

KRUGNER, T. L. Ação do meio ambiente sobre doenças de plantas In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1978. v. 1, p.215-225.

MARTINS, T.D. **Aspectos epidemiológicos da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar**. 2011. 65 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba , 2011.

MENZIES, J. G.; NIELSEN, J.; THOMAS, P. L. Long-term storage of *Ustilago tritici*. **Plant Disease**, v. 81, p.1328-1330, 1997.

OLIVEIRA, C. S.; MENDES, M. A. S. *Puccinia Kuehnii*, um risco para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil, **Comunicado técnico**, Brasília, n. 184, out.2008.

OVALLE, W. COMSTOCK, J. C.; GLYNN N. C.; CASTLEBURY L. A. First report of *Puccinia Kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Guatemala. **Plant Disease**, v.92, n.6, p.973, jun. 2008.

PÉREZ-GARCÍA, A.; MINGORANCE, E.; RIVERA, M. E.; DEL PINO, D.; ROMERO, D.; TORÉS, J. A.; DE VICENTE, A. Long-term Preservation of *Podosphaera fusca* Using Silica Gel, **Journal of Phytopathology**, n.154, p.190–192, 2006.

PÉREZ-VICENTE, L.; MARTÍN-TRIANA, E.L.; BARROSO, F.; MARTÍNEZ-DE-LA-PARTE, E.; BORRÁS-HIDALGO, O.; ESTÉVEZ, I.H. Definitive identification of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Cuba. **Plant Pathology**, v.59, p. 804, 2010.

PICININI, E.; PASCHOLATI, S. F. Crescimento, esporulação e patogenicidade de isolados de *Colletotrichum graminicola* após 14 anos de preservação pelo método de Castellani. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.499-502, 1996

RYAN, M. J.; SMITH, D.; JEFFRIES, P. A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.183-186, 2000.

SALUSTIANO, M. E.; POZZA, E. A.; FERRAZ FILHO, A.C.; CASTRO, H.A. Viability of *Puccinia Psidii* urediniospores stored in different environments. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.4, p. 313-316, 2008.

SOOD, S. G.; COMSTOCK, J. C.; GLYNN, N. C. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. **Plant Disease**, v.93, n.12, p.1335-1340, 2009.

TOKESHI, H; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.(Ed.) **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 4. Ed. São Paulo. Ceres. 2005. v. 2. p. 185-196.

URDANETA, S. M.; LACAZ, C. S. Preservation of fungi in distilled water preliminary results, **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.7, n.1, p.24-26, 1965.

VIRTUDAZO, E. V.; NAKAMURA, H.; KAKISHIMA, M. Ribosomal DNA-ITS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehnii*. **Mycoscience**, v.43, p. 447-453, 2001.

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

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E, POZZA, E. A.; ARAÚJO, D. V. Germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.83-85, 2007.

ZHAO, D.; GLYNN, N.C.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J.C.; SOOD, S. Orange Rust Effects on Leaf Photosynthesis and Related Characters of Sugarcane. **Plant Disease**, v.95, n. 6, p. 640-647, 2011.