



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM
GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À
INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii***

Luciana Tajany Dias do Nascimento

**Recife-PE
2023**

LUCIANA TAJANY DIAS DO NASCIMENTO

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Humberson Rocha Silva (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Jonas Alberto Rios (UFRPE/UFV)

Coorientador: Dr. Willams José de Oliveira (UFRPE/EECAC)

Recife-PE

Julho/2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N244a Nascimento, Luciana Tajany Dias do
Alterações bioquímicas e fisiológicas em genótipos de cana-de-açúcar em resposta à infecção por *Puccinia kuehnii* /
Luciana Tajany Dias do Nascimento. - 2023.
51 f. : il.
- Orientador: Humberson Rocha Silva.
Coorientador: Jonas Alberto Rios.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, 2023.
1. Saccharum officinarum. 2. Ferrugem alaranjada. 3. Estresse biótico. 4. Enzimas antioxidantes. I. Silva, Humberson
Rocha, orient. II. Rios, Jonas Alberto, coorient. III. Título

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii***

LUCIANA TAJANY DIAS DO NASCIMENTO

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/07/2023.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Humberson Rocha Silva (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFRPE)

Dr. Djalma Euzébio Simões Neto (UFRPE/EECAC)

Recife-PE

Julho/202

***Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e seus planos serão bem-sucedidos.***

Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelas oportunidades, força de vontade, coragem para superar todos os desafios e por iluminar toda a trajetória deste trabalho.

À minha família, principalmente aos meus pais, Rita Barbosa e Luciano Basílio, por todo amor, compreensão, apoio e por todas as orações.

Ao meu esposo, Victor Ricardo, por todo companheirismo, amor e dedicação.

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (PPGF), pelo apoio institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador, Prof. Dr. Humberson Rocha Silva, por seu conhecimento, orientação e apoio.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Jonas Rios e Dr. Willams Oliveira, por todas as experiências, ensinamentos e ajuda que foram fundamentais para condução da pesquisa.

À Dra. Larissa Almeida, que prestou ajuda essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, em especial, aos meus amigos que levarei para a vida, Maria Roselane, Walter Wagner e Ana Flávia, por toda ajuda e companheirismo na realização deste trabalho.

À Beatriz Damasceno e Keyla Waleska por me auxiliarem na condução deste trabalho.

A todos, dedico os meus sinceros agradecimentos –
Luciana Tajany Dias do Nascimento

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
GENERAL ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I.....	11
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. Cana-de-açúcar: cultivo e importância econômica.....	12
2. Doenças na cultura da cana-de-açúcar.....	13
3. Ferrugem alaranjada – <i>Puccinia kuehnii</i> (W. Krüger) E.J. Butler	13
4. Estratégias de controle	15
5. Mecanismos de defesa das plantas	16
5.1. Mecanismos estruturais (pré e pós-formados).....	16
5.2. Mecanismos bioquímicos (pré e pós-formados).....	17
5.2.1. Enzimas do sistema antioxidante e de defesa	18
6. Parâmetros fisiológicos	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO II.....	29
ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE- AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR <i>Puccinia kuehnii</i>	30
RESUMO	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Reações dos genótipos em casa de vegetação	33
Instalação do experimento	33
Quantificação da severidade da Ferrugem alaranjada.....	34
Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	35
Determinação dos parâmetros fisiológicos.....	37
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO III.....	49
CONCLUSÕES GERAIS.....	50

1 RESUMO GERAL

2 A Ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E. J. Butler, é uma
3 das principais doenças que afetam a produção de cana-de-açúcar no Brasil, acarretando danos
4 de até 50% no rendimento da cultura. A resistência do hospedeiro, principal estratégia de
5 controle adotada, é mediada por uma complexa rede de eventos bioquímicos e fisiológicos que
6 determinam a ocorrência de suscetibilidade ou resistência. A compreensão dos eventos
7 resultantes da interação patógeno-hospedeiro desempenha papel vital na identificação de
8 genótipos com resistência eficaz e durável. Diante deste contexto, o presente estudo objetivou
9 investigar as alterações bioquímicas e fisiológicas em genótipos de cana-de-açúcar resistente e
10 suscetível a *P. kuehnii*, em resposta à infecção. Os ensaios foram conduzidos em condições de
11 casa de vegetação e campo experimental. O experimento em casa de vegetação foi conduzido
12 em esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$, sendo dois genótipos (resistente e suscetível), plantas inoculadas
13 e não inoculadas e quatro épocas de avaliação (2, 20, 34 e 48 dias após a inoculação – DAI). O
14 delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As
15 plantas foram inoculadas 52 dias após o plantio, com suspensão na concentração de 5×10^4
16 urediniósporos viáveis mL^{-1} e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Em seguida foram
17 transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até o final do experimento. Os
18 períodos de incubação e latência foram determinados a partir de avaliações diárias. Após o
19 aparecimento dos primeiros sintomas, foi quantificada a severidade na folha +1, com auxílio de
20 escala diagramática, aos 2, 20, 34 e 48 DAI. A partir dos dados de severidade, os valores de
21 Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) foram determinados. Nesse mesmo
22 período foi quantificada a atividade de enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase
23 (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX), e de defesa,
24 fenilalanina amônia liase (FAL). No experimento conduzido em condições de campo, sob
25 delineamento em blocos casualizados, avaliaram-se a severidade da doença e os componentes
26 fisiológicos, para os mesmos genótipos, sob condições de infecção natural. Foram avaliados
27 pigmentos fotossintéticos, eficiência quantântica do fotossistema II e extravasamento de
28 eletrólitos. As avaliações foram realizadas em plantas com 130 dias de idade após o segundo
29 corte. Em casa de vegetação, os períodos de incubação e latência para o genótipo suscetível
30 foram de 8 e 19 dias, respectivamente. A curva de progresso da doença apresentou evolução
31 gradual, no genótipo suscetível, atingindo severidade final de 1,83%. As atividades das enzimas
32 SOD, CAT, APX, POX e FAL foram superiores no genótipo suscetível inoculado, coincidindo
33 com os maiores valores do progresso da doença ao longo do tempo avaliado. Nos genótipos
34 inoculados, houve aumento significativo para o suscetível na atividade da enzima SOD de 33%
35 e 25% aos 34 e 48 DAI, respectivamente, em comparação ao genótipo resistente. Da mesma
36 forma, houve aumento durante esse período para as enzimas CAT (45–22%) e APX (36–41%).
37 Para a atividade da POX observou-se mudanças no padrão de comportamento em ambos os
38 genótipos ao longo do tempo de avaliação, com maior atividade para o genótipo resistente (26%
39 e 31%) aos 2 e 20 DAI, respectivamente, em comparação com o genótipo suscetível. No
40 entanto, aos 48 DAI, o genótipo suscetível apresentou aumento de 56% na atividade da enzima.
41 A atividade da FAL foi significativamente maior no genótipo suscetível em comparação ao
42 genótipo resistente. Houve aumento de 18%, 12% e 19% aos 2, 20 e 48 DAI, respectivamente,
43 no genótipo suscetível. Em campo, houve reduções na taxa fotossintética devido a ação
44 infecciosa do patógeno, resultando em baixas concentrações de pigmentos (60, 40 e 44% para
45 Clorofila *a*, Clorofila *b* e carotenoides) e eficiência quantântica do fotossistema II
46 (fluorescência da clorofila *a* em 12%) no genótipo suscetível em relação ao genótipo resistente.
47 Para o extravasamento de eletrólitos não houve diferença significativa entre os genótipos, com
48 média geral de 53%. A resposta diferencial dos genótipos suscetível e resistente indica que a

1 suscetibilidade pode estar associada ao acúmulo tardio de compostos antioxidantes. Os
2 resultados do presente trabalho fornecerão melhor entendimento dos mecanismos de resistência
3 da cana-de-açúcar contra *P. kuehnii* e auxiliarão nas estratégias de seleção visando o
4 desenvolvimento de cultivares resistentes.

5 **Palavras-chave:** *Saccharum officinarum*, Ferrugem alaranjada, Estresse biótico, Enzimas
6 antioxidantes.

7

1 GENERAL ABSTRACT

2 Orange rust, caused by the fungus *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E. J. Butler, is one of the main
3 diseases affecting sugarcane production in Brazil with damages of up to 50% in the crop yield.
4 Host resistance is the main control strategy, being mediated by a complex network of
5 biochemical and physiological events that will result in either susceptibility or resistance.
6 Understanding the events associated with the host-pathogen interaction plays a vital role in
7 identifying genotypes with effective and reliable resistance. In this context, the present study
8 aimed to investigate the biochemical and regulatory changes in response to the *P. kuehnii*
9 infection in sugarcane genotypes with resistant and susceptible reactions to this fungus. The
10 experiments were carried out under greenhouse and open-field conditions. The greenhouse
11 experiment was established in a 2x2x4 factorial scheme, with two genotypes (resistant and
12 susceptible), inoculated and non-inoculated plants and four evaluation times (2, 20, 34 and 48
13 days after inoculation – DAI). The experimental design adopted was completely randomized,
14 with four replications. The plants were inoculated 52 days after planting, with a suspension at
15 a concentration of 5×10^4 viable urediniospores mL^{-1} and kept in a humid chamber for 24 hours.
16 Then the plants were transferred to the greenhouse, where they remained until the end of the
17 experiment. Incubation and latent periods were estimated at a daily basis. After the appearance
18 of the first symptoms, severity was quantified on the leaf +1, with the aid of a diagrammatic
19 scale, at 2, 20, 34 and 48 DAI. From the severity scores, the Area Under the Disease Progress
20 Curve (AUDPC) values were calculated. During the same period, the activity of enzymes of the
21 antioxidant system, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX),
22 peroxidase (POX)), and defense system, phenylalanine ammonia lyase (PAL) were quantified.
23 In the controlled experiment under field conditions, in a randomized block design, disease
24 severity and physiological components were evaluated for the same genotypes, under
25 conditions of natural infection. Photosynthetic pigments, photosystem II quantum efficiency
26 and electrolyte leakage were considered. The evaluations were carried out 130 days old after
27 the second cut. In the greenhouse, the incubation and latent periods for the susceptible genotype
28 were 8 and 19 days, respectively. The disease progress curve of the susceptible genotype
29 showed a gradual evolution, reaching a final severity of 1.83%. The activities of SOD, CAT,
30 APX, POX, and PAL enzymes were higher in the inoculated susceptible genotype, coinciding
31 with the highest values of disease progress over the evaluated period. In the inoculated
32 genotypes, a significant increase was observed for the susceptible genotype in comparison with
33 the resistant genotype for the SOD enzyme activity: 33% and 25% at 34 and 48 DAI,
34 respectively. Likewise, there was an increase during this period for CAT (45–22%) and APX
35 (36–41%) activity. For POX activity, changes in the behavior pattern were observed in both
36 genotypes over the evaluation time, with greater activity for the resistant genotype (26% and
37 31%) at 2 and 20 DAI, respectively, compared to the susceptible genotype. However, at 48
38 DAI, the susceptible genotype showed a 56% increase in enzyme activity. PAL activity was
39 significantly higher in the susceptible genotype compared to the resistant genotype. There was
40 an increase of 18%, 12%, and 19% at 2, 20 and 48 DAI, respectively, in the susceptible
41 genotype. In the field, there were reductions in the photosynthetic rate due to the infectious
42 action of the pathogen, followed by pigment concentrations (60, 40 and 44% for chlorophyll *a*,
43 chlorophyll *b*, and carotenoids) and photosystem II quantum efficiency (chlorophyll *a*
44 fluorescence in 12%) in the susceptible genotype compared to the resistant genotype. For the
45 leakage of electrolytes, there was no significant difference between the genotypes, with an
46 overall average of 53%. The differential response of the susceptible and resistant genotypes
47 indicates that susceptibility may be associated with the late buildup of antioxidant compounds.
48 The results of the present work will provide a better understanding the sugarcane resistance
49 mechanisms against *P. kuehnii* and will help in selection strategies aimed at developing resistant

1 cultivars.

2 **Keywords:** *Saccharum officinarum*, Orange rust, Biotic stress, Antioxidant enzymes.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii*

INTRODUÇÃO GERAL

1. Cana-de-açúcar: cultivo e importância econômica

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura semiperene, originária da Nova Guiné, que pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Andropogoneae*, subtribo *Saccharinae* e gênero *Saccharum*. Este compreende seis espécies: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* Brandes Jeswit ex Grassl, *S. barberi* Jeswit, *S. sinensis* Roxb e *S. edule* Hassk (DANIELS; ROACH, 1987; MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005). Atualmente, as variedades comerciais de cana-de-açúcar, desenvolvidas e cultivadas no Brasil e no mundo, são híbridos resultantes do cruzamento entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*.

As plantas deste gênero desenvolvem-se em forma de touceira, que é dividida em parte aérea (colmos, folhas e inflorescência) e radicular (raízes e rizomas). Apresenta metabolismo fotossintético C4, sendo considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, e possui capacidade de armazenar grandes quantidades de sacarose em seu colmo. Essa sacarose é processada e convertida em diferentes produtos, os principais são o açúcar e o etanol (NEVES; CONEJERO, 2010).

O cultivo da cana-de-açúcar é economicamente importante em diversos países do mundo (FAO, 2020). O principal país produtor da cultura é o Brasil, com aproximadamente 40% da produção mundial, seguido por Índia, China, Tailândia e Paquistão, respectivamente. A produção nacional de cana-de-açúcar, na safra 2022/23, foi de 610,1 milhões de toneladas, com crescimento de 5,4% em relação à safra anterior, em área plantada de 8.288,9 mil hectares, obtendo uma produtividade de 73,6 t.ha⁻¹. Diante do volume colhido, a região centro-sul representa o maior eixo produtivo do país, respondendo por 90% da produção nacional (CONAB, 2023). A cultura apresenta importância para a economia brasileira, uma vez que fornece matéria-prima para diversos produtos, principalmente para a produção de açúcar e etanol. Dessa forma, a produção de açúcar na safra 2022/23 alcançou 37 milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol atingiu 26,53 bilhões de litros, provenientes da cana-de-açúcar (CONAB, 2023).

A expansão da área cultivada e diversificação da cadeia produtiva da cana-de-açúcar foram acompanhadas pelo emprego de tecnologias agroindustriais. O melhoramento genético foi uma importante ferramenta, desenvolvendo variedades mais produtivas, com melhor

desempenho industrial e adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009). Embora a cana-de-açúcar seja uma cultura produtiva e rentável, alguns fatores interferem no seu rendimento, principalmente problemas fitossanitários, geralmente associados a condições climáticas (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005).

2. Doenças na cultura da cana-de-açúcar

As doenças de plantas são responsáveis por causar perdas significativas na produtividade de culturas de importância agrícola. Mundialmente, as perdas aproximam-se de 220 bilhões de dólares. De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), mais de 30% da produção agrícola global é perdida anualmente devido a ocorrência de patógenos de plantas como os fungos, bactérias e vírus, além do ataque de pragas. Na cultura da cana-de-açúcar foram identificadas cerca de 216 doenças, com 58 delas descritas no Brasil (SANTIAGO; ROSSETTO, 2021).

Dentre as principais doenças que afetam o rendimento da cultura, destacam-se o Carvão (*Sporisorium scitamineum*), Estria vermelha (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*), Escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), Mosaico (Sugarcane mosaic virus – ScMV), Raquitismo das soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), Mancha parda (*Cercospora longipes*), Podridão abacaxi (*Thielaviopsis paradoxa*), Ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*) e Ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) (SIMON et al, 2016).

As Ferrugens marrom (*Puccinia melanocephala*) e alaranjada (*Puccinia kuehnii*), são doenças foliares de importância significativa na cultura da cana-de-açúcar, pois reduzem a área fotossintética da planta, resultando em crescimento retardado, morte de perfilhos, encurtamento dos entrenós, redução do diâmetro de colmos e da produção de sacarose (SANTOS, 2013).

3. Ferrugem alaranjada – *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler

A Ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *P. kuehnii* (W. Krüger) E. J. Butler, que pertence à divisão *Basidiomycota*, classe *Pucciniomycetes*, ordem *Pucciniales*, família *Pucciniaceae* e gênero *Puccinia*. Este patógeno é classificado como biotrófico, e apresenta gama de hospedeiros restrita, entre os principais, as plantas do gênero *Saccharum* (SHAW, 1963). O primeiro relato da doença ocorreu em 1890 na Austrália. Porém, as perdas econômicas na cana-de-açúcar foram relatadas no ano de 2000. Nesse período, a doença acarretou redução de 50% na produtividade da cultura, resultando em perdas na economia australiana em cerca de 200 milhões de dólares (MAGAREY et al., 2004). Em 2007, foi relatada no Hemisfério Ocidental, quando ocorreu um surto da doença nos Estados Unidos. Em poucos anos, a doença

1 foi encontrada em regiões de cultivo de cana-de-açúcar na América do Sul, América Central e
2 no Caribe (COMSTOCK et al., 2008). Em 2009, a Ferrugem alaranjada foi reportada pela
3 primeira vez no Brasil, na região de Araraquara, interior do estado de São Paulo. Ainda em
4 2009 e ao longo de 2010, a doença foi constatada nos estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás,
5 Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e, em 2012, foi observada na região
6 Nordeste (BARBASSO et al., 2010). Durante a safra de 2015/16, na Flórida, as variedades de
7 cana-de-açúcar cultivadas apresentaram mais de 90% de suscetibilidade à Ferrugem alaranjada
8 (RAID et al., 2015). Em 2012, no Brasil foram registrados níveis de severidade de até 25% na
9 variedade SP81-3250, uma das três variedades mais plantadas no país, deixando os produtores
10 em estado de alerta (CANTERI et al., 2012).

11 Os sintomas iniciais da Ferrugem alaranjada são pequenas manchas cloróticas, levemente
12 arredondadas, evoluindo para coloração alaranjada, geralmente na face abaxial das folhas. As
13 manchas apresentam evolução gradativa até a formação das pústulas, que rompem a epiderme
14 das folhas, e expõem a massa de urediniósporos. As pústulas da Ferrugem alaranjada formam-
15 se mais próximo da bainha, além disso, são menores em relação à Ferrugem marrom, variando
16 entre 4 e 5 mm de comprimento (FERRARI et al., 2013). Segundo Croft et al. (2000), em
17 condições de alta severidade, geralmente ocorre a coalescência das lesões (pústulas) seguida de
18 necrose, levando à perda de água, que pode causar estresse hídrico e redução do rendimento
19 dos colmos. Além disso, as lesões reduzem o teor de clorofila das folhas infectadas, a eficácia
20 da fixação de carbono, a condutância dos estômatos e a taxa fotossintética da planta (ZHAO et
21 al., 2011).

22 No processo de infecção da Ferrugem alaranjada, ocorre a germinação do urediniósporo,
23 em seguida, a formação do tubo germinativo, às vezes com ramificações, e a diferenciação do
24 apressório em cima do estômato (LITTLEFIELD; HEATH, 1979). Posteriormente, ocorre a
25 passagem do “peg” de penetração através das células-guarda, formando uma vesícula na câmara
26 subestomática, e uma hifa infectiva, que dará origem ao primeiro haustório a partir da célula-
27 mãe de haustório. Em seguida, crescem ramificações de hifas intercelulares, formando novos
28 haustórios, com a colonização das células do mesofilo (HARDER, 1984; PURDY, 1985). No
29 interior das células do hospedeiro, os haustórios são formados e possuem papel importante na
30 troca de substâncias entre o hospedeiro e o fungo (HARDER, 1984).

31 Na cultura da cana-de-açúcar, o patógeno apresenta crescimento intracelular paralelo aos
32 feixes vasculares da folha, nos dois sentidos, após o ponto de penetração (PURDY, 1985). De
33 acordo com Wolf (1982), a diferenciação do apressório acontece em resposta aos sinais
34 topográficos específicos na superfície foliar (tigmotropismo), bem como pela emissão de

compostos voláteis através do estômato (quimiotropismo), e sua formação depende de reservas endógenas dos urediniósporos.

A disseminação dos urediniósporos de *P. kuehnii* ocorre principalmente por ação do vento em curtas e longas distâncias. As condições ideais para a germinação de urediniósporos, são temperaturas entre 22 e 24°C e umidade relativa do ar acima de 90% (MAGAREY et al., 2004; OLIVEIRA; MENDES, 2008). Na região Nordeste, Lima (2022) observou evolução da severidade com temperaturas mínimas e máximas variando entre 19,05°C e 29,05°C em genótipos suscetíveis de cana-de-açúcar.

4. Estratégias de controle

A infecção pelo fungo *P. kuehnii* nos tecidos vegetais da cana-de-açúcar reflete em diversos efeitos negativos que afetam o crescimento e a produtividade da cultura. Contudo, estratégias de controle como, o uso de fungicidas e adoção de variedades resistentes são implementadas para minimizá-los.

Em relação ao controle químico, a utilização de fungicidas se justifica em canaviais que apresentam baixa severidade da doença, visando à manutenção da produtividade agrícola a curto prazo. Atualmente, existem 46 fungicidas registrados para o controle da Ferrugem alaranjada (MAPA, 2023), os quais devem ser aplicados levando-se em consideração a rotação de produtos de diferentes modos de ação ou princípios ativos, caso haja a necessidade de mais de uma aplicação. Embora o manejo da doença com a utilização de fungicidas seja uma opção viável, a utilização de variedades resistentes é considerada o método mais eficaz e econômico (MATSUOKA; GARCIA; ARIZONO, 2005), com o propósito de reduzir a quantidade de inóculo do patógeno.

Nesse sentido, a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), estabelecida por convênio de cooperação técnica entre dez universidades federais brasileiras, tem se dedicado ao desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar, identificadas pela sigla RB (República do Brasil). Algumas dessas variedades apresentam resistência à Ferrugem alaranjada. Na região Nordeste, destacam-se diversas variedades resistentes à doença, incluindo RB961552, RB991556, RB064292, RB041443, RB011549, RB07818, RB08791, RB01494 e RB0442. Essas variedades foram desenvolvidas em colaboração entre a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). De acordo com Oliveira, Barbosa e Daros (2021), atualmente as variedades RB são responsáveis pela ocupação de 60% da área canavieira brasileira, contribuindo significativamente na elevação dos rendimentos agroindustriais e rentabilidade do

setor, sendo resultados de pesquisa e inovação.

As plantas resistentes podem reconhecer a invasão de agentes patogênicos e acionar mecanismos de defesa para impedir o estabelecimento de parasitismo (CARVALHO; BARCELLOS, 2012). A eficácia dos mecanismos de defesa determina a resistência da planta a infecções por patógenos. No entanto, sabe-se que diferentes genótipos de uma mesma espécie podem desenvolver e utilizar mecanismos de defesa iguais ou diferentes, com intensidade diferente, mediados por vários reguladores ativados de forma direta ou indireta (TORRES, 2010).

Por outro lado, estudos confirmam a adaptabilidade de *P. kuehnii* para suplantar genes de resistência da planta hospedeira (HOY et al., 2014). Dessa forma, é necessário estudar detalhadamente a interação da cana-de-açúcar x Ferrugem alaranjada e os mecanismos de defesa empregados pela planta, com o propósito de auxiliar no desenvolvimento de novas variedades resistentes.

5. Mecanismos de defesa das plantas

A capacidade de defesa das plantas contra patógenos é efetiva de modo geral, dada a multiplicidade de mecanismos disponíveis. Estes são classificados em ativos ou passivos, sendo divididos em estruturais e bioquímicos, ambos pré e pós-formados. De acordo com Pascholati e Dalio (2018), os pré-formados existem nos hospedeiros antes da chegada do patógeno, enquanto os pós-formados estão ausentes ou em baixos níveis antes da infecção, sendo ativados por meio da atividade e/ou percepção do patógeno.

Segundo Pascholati et al. (2008), dentre esses mecanismos, a particularidade da interação hospedeiro-patógeno vai definir maior ou menor envolvimento de algumas dessas respostas de defesa, além destas variarem com a idade e a condição de desenvolvimento da planta. Para Johal et al. (1995), a resposta de defesa da planta também pode variar de acordo com o modo de colonização do patógeno, visto que, microrganismos biotróficos buscam impedir o desencadeamento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, enquanto nos necrotróficos, os genes de resistência buscam anular os mecanismos de patogenicidade do invasor. Diante disso, as plantas lançam seus mecanismos de defesa de acordo com a finalidade de cada microrganismo.

5.1. Mecanismos estruturais (pré e pós-formados)

Os mecanismos de defesa estruturais são basicamente barreiras físicas, impedindo a penetração e colonização do patógeno (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Os mecanismos estruturais pré-formados pertencem à própria

constituição da planta. Dentre os que podem contribuir para a resistência estão a cutícula, tricomas, estômatos e fibras ou vasos condutores. Em relação aos estruturais pós-formados, estes surgem no hospedeiro após o contato com o patógeno, por exemplo, papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e abscisão, tiloses e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (PASCHOLATI; LEITE, 2008).

Respostas de defesa associadas à parede celular de cana-de-açúcar contra o Carvão (*Sporisorium scitamineum*) foram caracterizadas por Marques et al. (2018), ao observarem respostas histopatológicas relacionadas a alterações parietais em variedades resistentes em dois momentos: respostas precoces (24 horas após inoculação) e tardias (72-96 h.a.i.). Os primeiros estágios de infecção estavam associados a deposição parietal de compostos fenólicos e de lignina. Em relação as respostas tardias, houve a formação de uma faixa composta por células com paredes providas de lignina, calose, celulose e arabinosilano. Tais modificações na parede celular podem evitar ou atrasar a entrada do fungo nos tecidos meristemáticos.

Segundo Matiello, Barbieri e Carvalho (1997), quando um fungo fitopatogênico começa a penetrar através da parede celular, seja com hifas ou haustórios, as plantas resistentes respondem a esse ataque com a síntese de novos carboidratos, principalmente com calose e celulose, localizadas no interior da parede celular. Chowdhury et al. (2014) relataram que a cutícula e a parede celular servem como barreira para a primeira linha de defesa das plantas para proteger as células da invasão bem-sucedida por patógenos fúngicos.

5.2. Mecanismos bioquímicos (pré e pós-formados)

Os mecanismos de defesa bioquímicos produzem substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno, ou geram condições adversas a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Nos mecanismos bioquímicos pré-formados, estão envolvidos compostos fenólicos, alcalóides, fototoxinas, inibidores proteicos, quitinases, β -1,3 glucanases, entre outros. Por sua vez, os fatores bioquímicos pós-formados compreendem as fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas à patogênese (PR) e reação de hipersensibilidade (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Substâncias bioquímicas pré-formadas estão presentes em altas concentrações nos tecidos saudáveis das plantas, e em alguns casos, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas, como resposta à infecção (PASCHOLATI et al., 2008). Su et al. (2016) analisaram as alterações fisiológicas e bioquímicas causadas pelo Carvão (*S. scitamineum*) em cana-de-açúcar. Os autores observaram o agrupamento de enzimas relacionado à eliminação de espécies reativas

de oxigênio (ERO), como peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase, β -1,3-glucanase, molécula como malondialdeído e proteínas ligadas à patogênese (PR), em três componentes principais nas variedades resistentes. A taxa de contribuição cumulativa desses componentes para avaliar resistência em cana-de-açúcar foi de 80,18%, sugerindo esses como indicadores biológicos úteis para resistência ao Carvão na cultura.

5.2.1. Enzimas do sistema antioxidante e de defesa

As plantas sofrem mudanças bioquímicas significativas em resposta ao ataque de estressores bióticos, em especial os fitopatógenos (HILDEBRAND et al., 1986). Nesse sentido, Zhao et al. (2011) afirmam que a eficiência destas respostas de defesa resulta em padrões que caracterizam suscetibilidade ou resistência. Dessa forma, Miller et al. (2010) relataram que para sobreviver, as plantas passam por mudanças fisiológicas, suportam a duração de condições de estresse e apresentam capacidade de rápida resposta de defesa.

Quando as plantas são expostas aos estressores bióticos, ocorre alteração na homeostase celular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) se torna maior do que a capacidade antioxidante da célula, caracterizando assim o estresse oxidativo (PANDHAIR; SEKHON, 2006). De acordo com Cassells e Cury (2001) e Müller et al. (2001), o estresse oxidativo é definido como sendo um desequilíbrio, em qualquer compartimento celular, entre os níveis endógenos de compostos oxidantes e antioxidantes, ocasionando assim o acúmulo de EROs. A produção e o acúmulo de EROs nas plantas resulta em destruição severa de organelas e afeta funções celulares, causando a peroxidação da membrana celular, degradação de macromoléculas biológicas e, finalmente, morte celular (BARTELS; SUNKAR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010). De acordo com Mittler (2002), as EROs funcionam como moléculas sinalizadoras em plantas, estando envolvidas no fechamento estomático, gravitropismo radicular, tolerância à deficiência de oxigênio, fortalecimento da parede celular, senescência, produção de fitoalexinas, fotossíntese, abertura estomática e controle do ciclo celular. No entanto, é importante salientar que a função de um sinalizador de estresse depende do equilíbrio entre a produção de EROs e a produção de substâncias antioxidantes (MITTLER, 2002).

Os compostos antioxidantes são a primeira linha de defesa contra os danos causados pelos radicais livres e são essenciais para a saúde das células vegetais (MILLER et al., 2010; RAJPUT et al., 2016). Na bioquímica das plantas, existem EROs classificadas como radicais livres. Essas moléculas são formas reduzidas do oxigênio molecular (O_2), extremamente reativas e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares. Eles incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico ($OH^\cdot$) e oxigênio singlete

1 ($^1\text{O}_2$) (MITTLER, 2002).

2 Os principais locais de geração das EROs são os cloroplastos e as mitocôndrias. O sistema
3 fotossintético de transporte de elétrons (ETS) gera oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e superóxido
4 (O_2^-). As mitocôndrias possuem ambiente rico em O_2 e carboidratos, além de estarem
5 associadas à fotorrespiração. Entretanto, há outros locais para a geração de EROs, como o
6 retículo endoplasmático, membrana celular, parede celular e apoplasto (RHOADS et al., 2006).

7 Soares e Machado (2007) afirmam que na estrutura das EROs existe um ou mais elétrons
8 desbalanceados. Assim, no processo de respiração celular, o oxigênio (O_2) é completamente
9 reduzido ao longo da cadeia respiratória por quatro elétrons, gerando duas moléculas de água.
10 Bartosz (1997) e Mittler (2002) justificam a formação de moléculas reativas, devido escapes de
11 alguns elétrons da cadeia, resultando em redução parcial do O_2 . Neste sentido, na linha de
12 produção das EROs, Apel e Hirt (2004) e Halliwell (2006) explicam que os radicais de
13 superóxido (O_2^-) são os primeiros a serem produzidos nos cloroplastos, por meio da redução de
14 O_2 durante o transporte de elétrons na etapa fotoquímica da fotossíntese, sob condições de alta
15 relação NADPH/NADP. Já o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), considerado altamente prejudicial às
16 células pela sua alta reatividade, é formado na fotossíntese durante o processo de dissipação do
17 excesso de energia de moléculas de clorofila excitadas associadas ao fotossistema II (MÜLLER
18 et al., 2001).

19 O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula moderadamente reativa, que pode
20 atravessar membranas através das aquaporinas (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006),
21 apresenta meia-vida relativamente longa (1ms) e seu excesso nas células ocasiona estresse
22 oxidativo (BHATTACHARJEE, 2012). Ele desempenha dois papéis, um de sinalizador em
23 baixa concentração, acionando a tolerância a vários estresses bióticos e abióticos, e outro de
24 programador, quando em alta concentração, liderando a morte programada da célula
25 (BHATTACHARJEE, 2012). O radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) é o mais reativo entre as EROs, e é
26 produzido a partir de O_2^- e H_2O_2 , na reação de Haber-Weiss, sendo responsável por mediar a
27 toxicidade de oxigênio *in vivo*. Os $\text{OH}^\cdot$ podem potencialmente reagir com todas as moléculas
28 biológicas, como DNA, proteínas e lipídios, onde a produção excessiva leva à morte celular
29 (GILL; TUTEJA, 2010; VRANOVÁ et al., 2002).

30 Pesquisas anteriores relataram que para garantir a sobrevivência, as plantas
31 desenvolveram um sistema antioxidante eficiente com dois caminhos, que trabalham lado a
32 lado para eliminar as EROs. O primeiro envolve componentes antioxidantes enzimáticos como
33 superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POX), ascorbato peroxidase
34 (APX), guaiacol peroxidase (GPX), glutathione redutase (GR), monodesidroascorbato redutase

(MDHAR), e dehidroascorbato redutase (DHAR). Já o segundo envolve antioxidantes não-enzimáticos como ácido ascórbico (AA), glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenoides, flavonoides e o osmólito prolina (GILL; TUTEJA, 2010; MILLER et al., 2010).

A SOD fornece a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das EROs, uma vez que remove o O_2^- , catalisando a sua dismutação, onde um O_2^- é reduzido a H_2O_2 e outro é oxidado a O_2 . Portanto, ela remove o O_2^- e diminui o risco de formação de OH^- no interior das células. As SODs são classificadas em três isoenzimas com base no íon metálico a que se ligam, Mn-SOD (localizada nas mitocôndrias), Fe-SOD (localizada nos cloroplastos) e Cu/Zn-SOD (localizada no citosol, peroxissomos e cloroplastos) (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2002).

Seguindo com a desintoxicação das células, entra em ação a Catalase (CAT), enzima responsável pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo este peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidas na oxidação de ácidos graxos, fotorespiração e catabolismo de purinas (GILL; TUTEJA, 2010). Níveis elevados de H_2O_2 são tóxicos para a planta, enquanto concentrações baixas desempenham papel importante na transdução de sinal nas plantas atacadas e nos seus estressores bióticos, como os fitopatógenos (PRASAD et al, 1994). A CAT é a principal via de degradação do H_2O_2 quando as plantas ativam este sistema, ao serem infectadas por patógenos, e ocasiona inibição do crescimento do agente causal (GAYATRIDEVI; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2012).

Por sua vez, a ascorbato peroxidase (APX) é um componente integral do ciclo Ascorbato-Glutathiona (ASC-GSH). Enquanto a CAT elimina predominantemente H_2O_2 nos peroxissomos, a APX desempenha a mesma função no citosol e no cloroplasto. O APX reduz H_2O_2 a H_2O e dehidroascorbato (DHA), utilizando o ácido ascórbico (AA) como agente redutor. A APX é amplamente distribuída e tem afinidade melhor para H_2O_2 do que CAT, sendo um eliminador mais eficiente de H_2O_2 em momentos de estresse (SHARMA; DUBEY, 2004).

Em seguida, a peroxidase (POX) cataliza a oxidação entre H_2O_2 e vários redutores, desempenha importante papel nos processos fisiológicos das plantas, aumentando as barreiras mecânicas, tornando a penetração do patógeno mais lenta. Está presente na lignificação, suberização, formação e reticulação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas, senescência, proteção contra o ataque de patógenos, insetos e estressores abióticos. Esta enzima é relativamente estável em altas temperaturas, e atualmente é usada como modelo em estudos de estrutura protéica, reações e funções enzimáticas, e está relacionada a diversos processos de defesa da planta em resposta a estresses bióticos e abióticos (ALMAGRO et al., 2009; GULSEN et al., 2010; HIRAGA et al., 2001; WAR et al., 2012).

A compreensão do mecanismo de resistência do hospedeiro e a interação bioquímica patógeno-hospedeiro desempenham papel vital na identificação de genótipos com resistência eficaz e durável. Os compostos de defesa mais comumente estudados que atuam como primeira linha de defesa são proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), peroxidase (POD) e fenilalanina amônia liase (FAL). Essa última, é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas, devido à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. A FAL é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonoides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Pesquisas anteriores realizadas por Kurama et al. (2002) descreveram a expressão das enzimas superóxido dismutase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase e catalase, envolvidas na desintoxicação de EROs em momentos iniciais da interação *Puccinia melanocephala* x cana-de-açúcar. Almeida et al. (2012) observaram aumento na atividade das enzimas lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e da proteína total β -1,3-glucanases, em genótipos de soja contra *Phakopsora pachyrhizi*.

6. Parâmetros fisiológicos

A cana-de-açúcar apresenta metabolismo fotossintético C4, o qual é caracterizado por uma série de adaptações anatômicas e bioquímicas capazes de concentrar CO₂ ao redor do sítio de carboxilação da rubisco. Para que ocorra o processo fotossintético, a energia radiante disponível deve primeiro ser absorvida pelos cloroplastos, onde ocorre a fotossíntese, por meio de receptores chamados pigmentos fotossintéticos, os quais funcionam principalmente como um complexo de antenas, captando a luz e enviando a energia para os locais apropriados, os centros de reação. Esses receptores são clorofilas e pigmentos acessórios (LARCHER, 2006).

A concentração desses pigmentos fotossintéticos está relacionada com a capacidade de absorção de radiação. A redução de pigmentos de clorofila em órgãos vegetais pode estar relacionada a vários fatores de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, sendo reconhecida pela mudança de cor do tecido fotossintético, caracterizando um quadro de clorose (BACCI et al., 1998; LARCHER, 2006). Assim, a mensuração das clorofilas *a* e *b* nas folhas pode ser um indicador útil quanto à ação de algum fator de estresse capaz de provocar a redução do potencial fotossintético a partir da degradação das clorofilas. Estudos mostram que variedades de cana-

de-açúcar respondem diferentemente a determinados estresses dependendo da maior ou menor capacidade em manter o teor de pigmentos fotossintéticos. Essa diferença de capacidade é uma característica importante a ser utilizada em testes de seleção de variedades resistentes a diferentes tipos de estresses (SILVA et al., 2014).

Os pigmentos fotossintéticos, após receberem a energia dos fótons de luz e passarem para um estado excitado (instável e de curta duração), dissipam essa energia radiante absorvida (desexcitação), e apenas parte dela é utilizada no processo fotoquímico; o restante é convertido em radiação fluorescente, fosforescente e calor (LARCHER, 2006). Este fato é extremamente importante, pois ao registrar a emissão de fluorescência em folhas intactas e tecidos verdes (clorofila e fluorescência *in vivo*), é possível avaliar com sensibilidade o estado do fotossistema, bem como o efeito de influências ambientais na fotossíntese. O uso da eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) como ferramenta de fenotipagem tem sido bem-sucedido para identificar cultivares de trigo com diferentes desempenhos fotossintéticos sob várias condições de estresse térmico, bem como para cultivares de milho tolerantes à seca (SHARMA et al., 2015; SOUSA et al., 2017). O parâmetro F_v/F_m tem sido utilizado para diferenciar tecidos foliares saudáveis e doentes, bem como para determinar as alterações temporais e espaciais que ocorrem durante o processo de infecção de patógenos (ROLFE; SCHOLLES, 2010). A análise quantitativa e as imagens de F_v/F_m permitiram a seleção de cultivares de feijão mais resistentes ao míldio bacteriano (ROUSSEAU et al., 2013). Este método consiste na medição da fluorescência da clorofila *a* emitida por uma determinada amostra de tecido vegetal exposta a um pulso saturante de luz, após adaptação prévia ao escuro, induzindo o aparato fotossintético (BAKER; ROSENQVIST, 2004; BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007; LARCHER, 2006).

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar processos bioquímicos e fisiológicos alterados em genótipos de cana-de-açúcar suscetível e resistente à *P. kuehnii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROSBARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p.377-390, 2009.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. D. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p.163-172, 2012.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BACCI, L.; VINCENZI, M.; RAPI, B.; ARCA, B.; BENINCASA, F. Two methods for the analysis of colorimetric components applied to plant stress monitoring. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 19, p. 167186, 1998.
- BAKER N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.
- BARBASSO, H. D.; MACCHERONI, W. J. J.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J.; CANAVIALIS, S. A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane in Brazil. **Plant Disease**, v. 94, n. 9, p. 1170, 2010.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Review Plant Science**, v. 24, p.23-58, 2005.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 47-64, 1997.
- BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets Phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15/16, p.4019-4026, 2007.
- BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.
- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p.994-1003, 2006.
- CANTERI, M. G.; GIGLIOTI, E. A.; ARAUJO, K. L., NEUBAUER, R. A., SANCHES, P. R. B., SUMIDA, C. H. Eficiência de fungicidas no controle da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. Lavras: Editora, v. 45, 662p., 2012.
- CARVALHO, N. L.; BARCELLOS, A. L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia**

- Ambiental**, v. 5, n. 5, p.749–766, 2012.
- CASSELLS, A. C.; CURY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p.145-157, 2001.
- CHOWDHURY, J.; HENDERSON, M.; SCHWEIZER P.; BURTON, R. A.; FINCHER, G. B.; LITTLE, A. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. hordei. **New Phytologist**. v. 204, n. 3, p.650-660, 2014.
- COMSTOCK, J. C.; SOOD, S. G.; GLYNN, N. C.; SHINE JR, J. M.; MCKEMY, J. M.; CASTLEBURY, L. A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in the United States and Western Hemisphere. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p. 175, 2008.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 10 - Safra 2022/23, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p.1-49, Abril de 2023.
- CROFT, B.; MAGAREY, R.; WHITTLE, P. Disease management. In: HOGARTH, M.; ALLISOPP, P. (Ed.). **Manual of Canegrowing**. Indooroopilly, Qld.: Bureau of sugar experiment stations, p.263-289, 2000.
- DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. Ed: Amsterdam: Elsevier, p.7-84, 1987.
- FAO. FAOSTAT: Food and Agriculture Data. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 07 mar. 2022.
- FERRARI, J. T.; R. HARAKAVA, R. J.; DOMINGUES, I. M. L.; TERÇARIOL, J. G. T. **Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil**. Instituto Biológico, São Paulo, v.75, n.1, p.71-74, 2013.
- GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p.154-161, 2012.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p.909-930, 2010.
- GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE, F.; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. **Arthropod Plant Interactions**, v. 4, p.45-55, 2010.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p.312-322, 2006.
- HARDER, D. E. Developmental ultrastructure of hyphae and spores. In: ROELFS, A. P.; BUSHNEL, W. R. **The cereal rusts**. I. New York: Academic Press, v. 14, p.416-460, 1984.

- 1 HILDEBRAND, D. F.; RODRIGUEZ, J. G.; BROWN, G. C.; LUU, K. T.; VOLDEN, C. S.
2 Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites
3 (Acari: Tetranychidae). **Journal Economic Entomology**, v. 79, n. 6, p.1459-1465, 1986.
- 4 HIRAGA, S.; SASAKI, K.; HIROYUKI, I.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of
5 class III plant peroxidase. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p.462-468, 2001.
- 6 HOY, J. W.; AVELLANEDA, M. C.; BOMBECINI, J. Variabilidade na patogenicidade e
7 resistência de *Puccinia melanocephala* em cultivares de cana-de-açúcar. **Plant Disease**, v. 98,
8 n. 12, p.1728-1732, 2014.
- 9 JOHAL, G. S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S. P. Convergent insights into mechanisms
10 determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal**
11 **Botany**. v.73, p.468-474, 1995.
- 12 KURAMA, E. E.; FENILLE, R. C.; ROSA, V. J. R, ROSA, D.; ULIAN, E. C. Mining the
13 enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane.
14 **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 4, p.251-259, 2002.
- 15 LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**, São Carlos, SP: RiMa, 531p., 2006.
- 16 LIMA, A. F. T. **Epidemiologia comparativa das ferrugens marrom e alaranjada em**
17 **genótipos de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade
18 Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 63p., 2022.
- 19 LITTLEFIELD, L. J.; HEATH, M. C. **Ultrastructure of rust fungi**. New York: Academic
20 Press, v. 12, p.3-91, 1979.
- 21 MAGAREY, R. C.; NEILSEN, W.A.; BULL, J.I. The effect of orange rust on sugarcane yield
22 in breeding selection trials in Central Queensland: 1999-2001. In: **2004 Conference of the**
23 **Australian Society of Sugar Cane Technologists held at Brisbane, Queensland,**
24 **Australia, 4-7 May 2004**. PK Editorial Services Pty Ltd, p.1-6, 2004.
- 25 MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxico**
26 **Fitossanitário**, 2023. Disponível em:
27 <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 09 de
28 abril de 2023.
- 29 MARQUES, R. P. J.; HOY, J. W.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VIVEROS, G. F. A.;
30 VIEIRA, C. L. M.; BAISAKH, N. Sugarcane cell wall- associated defense responses to
31 infection by *Sporisorium scitamineum*. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, article 698, 2018.
- 32 MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Plant resistance to fungal
33 diseases. Santa Maria: **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p.161-168, 1997.
- 34 MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In:
35 BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora da UFV, p.225-274,
36 2005.
- 37 MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol
38 industry. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 45, n. 3, p.372-381, 2009.

- 1 MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species
2 homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant Cell Environ.** v. 33,
3 p.453-467, 2010.
- 4 MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant**
5 **Science**, v. 7, p.405-410, 2002.
- 6 MÜLLER, P.; LI, X.-P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to
7 excess light energy. **Plant Physiology**, v. 125, p.1558-1566, 2001.
- 8 NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A. Estratégias da indústria da cana. In:
9 Estratégias para a cana no Brasil: Um negócio classe mundial. São Paulo: **Atlas**. p.59-88,
10 2010.
- 11 OLIVEIRA, C. S.; MENDES, M. A. S. **Puccinia kuehnii**, um risco para a cultura de cana-
12 **de-açúcar no Brasil**. Comunicado Técnico 184. Brasília- DF, 2008.
- 13 OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S.; DAROS, E. **50 anos de variedades RB de cana-**
14 **de-açúcar: 30 anos de RIDESA**. Curitiba: UFPR, 199p., 2021.
- 15 OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; HOFFMANN, H. P. **Liberação nacional de variedades RB**
16 **de cana-de-açúcar**. Curitiba: Graciosa, 1. Ed, 72p., 2015.
- 17 PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta-**
18 **Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. FEALP, Piracicaba, 627p., 2008.
- 19 PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do Parasitismo: como as plantas se
20 defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. M. A.; BERGAMIM FILHO, A
21 (eds). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5th edn. Editora Agronômica Ceres
22 Ltda, Piracicaba, p.424-450, 2018.
- 23 PANDHAIR, V.; SEKHON, B. S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: An
24 overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p.71-78, 2006.
- 25 PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; MARTIN, B. A.; STEWART, C. R. Evidence for
26 chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for
27 hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v. 6, n. 1, p.65-74, 1994.
- 28 PURDY, L. H. Sugarcane rust. In: ROELFS, A. P., BUSHNELL, W. R. **The cereal rusts**. New
29 York: Academic Press, v. 2, p.238-255, 1985.
- 30 RAID, R. N.; ROTT, P. C.; COMSTOCK, J. C. Varietal resistance to sugarcane rusts in
31 Florida: A historical perspective and future prospects. In: **Abstract of the XIth Pathology**
32 **and IXth Entomology Workshops**, September, p.14-18, 2015.
- 33 RAJPUT, V. D.; MINKINA, T.; YANING, C.; SUSHKOVA, S.; CHAPLIGIN, V. A.;
34 MANDZHIEVA, S. A review on salinity adaptation mechanism and characteristics of
35 *Populus euphratica*, a boon for arid ecosystems. **Acta Ecológica Sinica**. v. 36, p.497-503,
36 2016.
- 37 RHOADS, D. M.; UMBACH, A. L.; SUBBAIAH, C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial
38 Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar

- 1 Signaling. **Plant physiology**. v. 141, n. 2, 357p., 2006.
- 2 ROLFE, S. A.; SCHOLLES, J. D. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen
3 interactions. **Protoplasma**, v. 247, p.163-175, 2010.
- 4 ROUSSEAU, C.; BELIN, E.; BOVE, E.; ROUSSEAU, D.; FABRE, F.; BERRUYER, R.;
5 BOUREAU, T. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using
6 chlorophyll fluorescence image analysis. **Plant methods**, v. 9, 13p., 2013.
- 7 SANTIAGO, A. D.; ROSSETO, R. Doenças causadas por fungos. Árvore do conhecimento
8 da Cana-de-Açúcar. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <
9 [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/doencas/doencas-fungicas)
10 [tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/doencas/doencas-fungicas](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/doencas/doencas-fungicas)>. Acesso
11 em: 02 de abril de 2023.
- 12 SANTOS, D.L. **Zoneamento da favorabilidade climática para a ocorrência da ferrugem**
13 **alaranjada da cana-de-açúcar nas principais regiões produtoras do Brasil e da**
14 **Austrália**. Dissertação (Mestrado em Ciências, Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola
15 Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 101p., 2013.
- 16 SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos
17 bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.;
18 CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**.
19 Piracicaba: FEALQ, p.227-248, 2008.
- 20 SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: Properties of
21 enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v. 167,
22 n. 3, p.541-550, 2004.
- 23 SHARMA, D. K.; ANDERSEN, S. B.; OTTOSEN, C. O.; ROSENQVIST, E. Wheat cultivars
24 selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll,
25 stomatal conductance, transpiration and dry matter. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 2,
26 p.284-298, 2015.
- 27 SHAW, M. The physiology and host-parasite relations of the rusts. **Annual Review of**
28 **Phytopathology**, v.1, p.259-294, 1963.
- 29 SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos
30 fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por
31 deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p.173-181, 2014.
- 32 SIMON, E. D. T.; VERÍSSIMO, M. A. A.; HÄRTER, A.; UENO, B. Doenças da Cana-de-
33 açúcar. In: SILVA, S. D. et al. de (Ed.). **Sistema de produção de cana-de-açúcar no Rio**
34 **Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 247p., 2016.
- 35 SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e
36 espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v. 1, n. 1, p.9-19, 2007.
- 37 SOUSA, C. A. F.; PAIVA, D. S.; CASARI, R. A. D. C. N.; OLIVEIRA, N. G.; MOLINARI,
38 H. B. C.; KOBAYASHI, A. K.; SOUZA, M. T. A procedure for maize genotypes
39 discrimination to drought by chlorophyll fluorescence imaging rapid light curves. **Plant**
40 **Methods**, v. 13, 17p., 2017.

- 1 SU, H. Y.; WANG, Z.; XU, L.; PENG, Q.; LIU, F.; LI, Z.; QUE, Y. Selection for Smut
2 Resistance in Sugarcane Using Pathogen Proliferation and Changes in Physiological and
3 Biochemical Indices. **Frontiers in Plant Science**. v.7, p. 1133, 2016.
- 4 TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 414-429,
5 2010.
- 6 VRANOVÁ, E.; ATICHARTPONGKUL, S.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M. V.;
7 DIRK INZÉ, D.; CAMP, W. V. Comprehensive analysis of gene expression in
8 *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. **Proceedings of National Academy**
9 **of Sciences USA (PNAS)**, v. 99, p.10870-
10 10875, 2002.
- 11 WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.;
12 IGNACIMUTHU, S.; SHARMA H. C. Mechanisms of plant defense against insect
13 herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p.1306-1320, 2012.
- 14 WOLF, G. Physiology and biochemistry of germination. In: SCOTT, K. J.;
15 CHAKRAVORTY, A. K. **The rust fungi**. Antrim: Academic Press, v. 4, p.151-178, 1982.
- 16 ZHAO, D.; GLYNN, N. C.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C.; SOOD, S. Orange rust effects on
17 leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p.640-647,
18 2011.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE- AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii*

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Puccinia kuehnii*

Luciana Tajany Dias do Nascimento¹, Larissa Cavalcante Almeida¹, Jonas Alberto Rios^{1,2*}, Willams José de Oliveira³, Djalma Euzébio Simões Neto³, Edivan Rodrigues de Souza¹, Humberson Rocha Silva¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia.

² Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Florestal-MG.

³ Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina - UFRPE, Carpina-PE.

* Autor para correspondência

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar as alterações bioquímicas e fisiológicas em genótipos de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis a *Puccinia kuehnii* em resposta à infecção. O primeiro experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação em esquema fatorial $2 \times 2 \times 4$, sendo dois genótipos (resistente e suscetível), plantas inoculadas e não inoculadas e quatro épocas de avaliação (2, 20, 34 e 48 dias após a inoculação – DAI). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. As plantas foram inoculadas 52 dias após o plantio, com suspensão na concentração de 5×10^4 urediniósporos viáveis mL⁻¹ e mantidas em câmara úmida por 24 horas. Em seguida as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até o final do experimento. Os períodos de incubação e latência foram determinados a partir de avaliações diárias. Após o aparecimento dos primeiros sintomas, foi quantificada a severidade da doença na folha +1, com auxílio de escala diagramática, aos 2, 20, 34 e 48 DAI. A partir dos valores de severidade, foi construída a curva de progresso da doença e calculados os valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da doença (AACPD). Nesse mesmo período foi quantificada as atividades de enzimas do sistema antioxidante [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (POX)] e de defesa: fenilalanina amônia liase (FAL). No experimento conduzido em condições de campo, sob delineamento em blocos casualizados, avaliaram-se a severidade da doença e os componentes fisiológicos, para os mesmos genótipos, mas sob condições de infecção natural. Foram avaliados pigmentos fotossintéticos, eficiência quantântica do fotossistema II e extravasamento de eletrólitos. As avaliações foram determinados em plantas com 130 dias de idade após o segundo corte. Em casa de vegetação, os períodos de incubação e latência para o genótipo suscetível foram de 8 e 19 dias, respectivamente. A curva de progresso da doença apresentou evolução gradual, no genótipo suscetível, atingindo severidade final de 1,83 %. As atividades das enzimas SOD, CAT, APX, POX e FAL foram superiores no genótipo suscetível inoculado, coincidindo com os maiores valores do progresso da doença ao longo do tempo avaliado. Nos genótipos inoculados, houve aumento significativo para o suscetível na atividade da enzima SOD de 33% e 25% aos 34 e 48 DAI, respectivamente, em comparação ao genótipo resistente. Da mesma forma, houve aumento durante esse período para as enzimas CAT (45–22 %) e APX (36–41 %). Para a atividade da POX observou-se mudanças no padrão de comportamento em ambos os genótipos ao longo do tempo de avaliação, com maior atividade para o genótipo resistente (26% e 31%) aos 2 e 20 DAI, respectivamente, em comparação com o genótipo suscetível. No entanto, aos 48 DAI, o genótipo suscetível apresentou aumento de 56% na atividade da enzima. A atividade da FAL foi significativamente maior no genótipo suscetível em comparação ao genótipo resistente. Houve aumento de 18%, 12% e 19% aos 2, 20 e 48 DAI, respectivamente, no genótipo suscetível. Em campo, houve reduções na taxa fotossintética devido a ação infecciosa do patógeno, resultando em baixas concentrações de pigmentos (60, 40 e 44% para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, respectivamente) e eficiência quantântica do fotossistema II (fluorescência da clorofila *a* em 12%) no genótipo suscetível em relação ao genótipo resistente. Para o extravasamento de eletrólitos não houve diferença significativa entre os genótipos, com média geral de 53%. A resposta diferencial dos genótipos suscetível e resistente indica que a suscetibilidade pode estar associada ao acúmulo tardio de compostos antioxidantes. Os resultados do presente trabalho fornecerão melhor entendimento dos mecanismos de resistência da cana-de-açúcar contra *P. kuehnii* e auxiliarão nas estratégias de seleção visando o desenvolvimento de cultivares resistentes.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, Ferrugem alaranjada, Estresse biótico, Enzimas antioxidantes.

1 INTRODUÇÃO

2 O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção de 610,1 milhões
3 de toneladas na safra 2022/23, o que corresponde a aproximadamente 40% da produção
4 mundial. Os principais produtos obtidos desta cultura são o açúcar e o etanol (CONAB 2023).
5 Embora a produção e a produtividade nacional sejam elevadas, a cana-de-açúcar é
6 negativamente afetada por diversos fatores que podem comprometer o seu rendimento. Dentre
7 eles, cita-se o ataque de pragas e doenças, ocasionando danos na produtividade estimados em
8 30% (Cheavegatti-Gianotto et al. 2011; FAO 2020).

9 Dentre as principais doenças que impactam a produção de cana-de-açúcar, destaca-se a
10 Ferrugem alaranjada causada pelo fungo biotrófico *Puccinia kuehnii* (W. Krüger) E.J. Butler.
11 O patógeno foi inicialmente relatado por Krüger em 1890 em cana-de-açúcar, na Ilha de Java.
12 Posteriormente, chegou ao hemisfério ocidental como decorrência do intenso comércio global
13 (Rott et al. 2016). No Brasil, a doença foi relatada em 2009 nas principais áreas produtoras,
14 sendo responsável por redução de até 50% no rendimento de variedades consideradas
15 suscetíveis e moderadamente resistentes (Barbasso et al. 2010; Chapola et al. 2016; Hoy et al.
16 2014; Magarey et al. 2001). Os sintomas iniciais são pequenas manchas foliares levemente
17 arredondadas, de coloração alaranjada, geralmente na face abaxial das folhas. As manchas
18 evoluem de forma gradativa para as pústulas, que rompem a epiderme das folhas, e expõem a
19 massa de urediniósporos. Segundo Croft et al. (2000), em condições de alta severidade,
20 geralmente ocorre a coalescência das lesões (pústulas), seguidas de necrose, ocasionando
21 estresse hídrico e redução do rendimento dos colmos. Além disso, as lesões reduzem o teor de
22 clorofila das folhas infectadas, a eficácia da fixação de carbono, a condutância dos estômatos e
23 a taxa de fotossíntese (Zhao et al. 2011).

24 A resistência da planta hospedeira tem sido o método mais sustentável de manejo da
25 Ferrugem alaranjada (Matsuoka et al. 2005). Plantas resistentes podem reconhecer a invasão de
26 agentes patogênicos e acionar mecanismos de defesa para impedir o estabelecimento de
27 parasitismo (Carvalho e Barcellos 2012). O estabelecimento de patógenos biotróficos requer
28 tecidos vivos do hospedeiro para capturar nutrientes para seu desenvolvimento e secreções de
29 efetores (Correr et al. 2020). A relevância biológica deste grupo de moléculas essenciais
30 secretadas pelos patógenos envolve o controle/modulação do sistema imune da planta. Os
31 efetores podem ser eventualmente reconhecidos por proteínas de resistência de plantas, que
32 geralmente são seguidas por uma explosão de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs).
33 Isso induz uma série de reações bioquímicas, metabólicas e fisiológicas na planta hospedeira.
34 Dentre essas reações, a atividade das enzimas de defesa desempenha um papel importante na

planta durante os estágios iniciais da invasão do patógeno (Blokhina et al. 2003).

Apesar de inúmeros relatos envolvendo alterações bioquímicas e fisiológicas em diferentes interações patógeno-hospedeiro, poucos são os estudos envolvendo o presente patossistema. Assim, o trabalho tem por objetivo determinar as alterações nos processos bioquímicos (via análise da atividade de enzimas do sistema antioxidativo) e fisiológicos (denotados pelos pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*) em genótipos de cana-de-açúcar infectados por *P. kuehnii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Reações dos genótipos em casa de vegetação

Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Campus Sede da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife-PE. Os genótipos de cana-de-açúcar utilizados foram RB101130, resistente à Ferrugem alaranjada, e RB021754, suscetível à doença. Avaliaram-se nesses genótipos a severidade da Ferrugem alaranjada e parâmetros bioquímicos associados à resistência. Para isso, mini rebolos de gema única, foram plantados em sacos de polietileno com capacidade de 1 L (15 x 20 cm), contendo mistura de areia e substrato, na proporção 1:1. As mudas foram regadas diariamente, com aplicação semanal de solução nutritiva, preparada de acordo com Hoagland e Arnon (1950). As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante a condução do experimento.

A coleta dos urediniósporos de *P. kuehnii* foi realizada com auxílio de cápsulas de gelatina devidamente esterilizadas. Os urediniósporos foram obtidos diretamente de folhas de variedade suscetível, com sintomas da doença, oriundas do campo. Em seguida, os esporos coletados foram mantidos no escuro em temperatura ambiente até o momento da inoculação.

Para avaliar a viabilidade dos urediniósporos, foi preparada uma suspensão e depositada em quatro placas de Petri, contendo meio ágar-água (2%), sendo espalhada em seguida, com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas no escuro por 24 horas, em temperatura 24,3 °C e posteriormente, avaliaram-se 200 urediniósporos, entre germinados e não germinados, para determinar a porcentagem de urediniósporos viáveis (Minchio et al. 2011), apresentando 68% de viabilidade.

A suspensão de esporos foi preparada em água destilada e ajustada para a concentração

de 5×10^4 urediniósporos viáveis mL⁻¹, utilizando hemacitômetro (Sood et al. 2009). Em seguida, plantas com 52 dias de idade foram transferidas para câmara de crescimento e inoculadas com a suspensão obtida, com auxílio de um pulverizador manual (Chapola et al., 2016).

Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, por 24 horas, com temperatura média de 21,4 °C e umidade relativa do ar média de 93,5%, condições consideradas favoráveis à germinação dos esporos (Minchio et al. 2011). Posteriormente, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, para a condução dos ensaios e avaliações. A temperatura média durante a condução do experimento em casa de vegetação foi de 27°C (mínima de 20°C e máxima de 41,3°C), e a umidade relativa do ar média foi de 76,7% (mínima de 33,2% e máxima de 100%).

O experimento foi instalado em esquema fatorial 2 x 2 x 4, sendo dois genótipos (resistente e suscetível), plantas não inoculadas e inoculadas com *Puccinia kuehnii* e quatro épocas de avaliação, 2, 20, 34 e 48 dias após a inoculação (DAI). As parcelas foram dispostas em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. Cada parcela consistiu de uma planta, das quais foram coletadas as folhas +1 para amostragem destrutiva, para as análises bioquímicas. Os tratamentos foram comparados quanto a inoculação e seu controle em cada tempo avaliado para cada genótipo. Em seguida, comparação entre os genótipos dentro de cada tratamento em cada tempo avaliado. As médias dos tratamentos foram comparadas usando o teste *t* ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software R (R Core Team, 2023).

Quantificação da severidade da Ferrugem alaranjada

Para quantificar a severidade da doença, após a inoculação, as plantas foram avaliadas diariamente, até o aparecimento dos primeiros sintomas, com auxílio de escala diagramática para Ferrugem alaranjada (Klosowski et al. 2013). As notas de severidade foram atribuídas considerando a distribuição da doença em toda a extensão do limbo foliar, determinando o período de incubação e o período de latência da doença. Com esses dados, foram confeccionadas as curvas de progresso da doença, e calculados os valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), conforme a equação 1, proposta por Shaner e Finney (1977). Na última avaliação, determinou-se o número de lesões por cm² em três posições na folha +1 (base, médio e ápice), sendo considerada a média das três leituras para cada amostra.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{y^i + y^{i+1}}{2} \right) \times (t^{i+1} - t^i)$$

Equação (1)

Em que:

AACPD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença; y_i = Proporção da doença na i -ésima observação; t_i = Tempo da i -ésima observação (em dias); n = Número total de observações.

Determinação dos parâmetros bioquímicos

Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

Para todas as análises bioquímicas, foram coletadas amostras da folha +1 das plantas de cada tratamento aos 2, 20, 34 e 48 DAI. Coletou-se 0,2 g de fragmentos de folhas por parcela, os quais foram macerados separadamente em almofariz com N_2 líquido até a obtenção de um pó fino (Nunes-Nesi et al. 2007). Este foi homogeneizado em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12.000 \times g$, por 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi usado como extrato para as determinações enzimáticas da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX).

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1 (Nomenclatura do Comitê da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)) foi determinada pela metodologia de Del Longo et al (1993), medindo a capacidade da enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de p-nitrotetrazólio (NBT). A reação foi iniciada adicionando 5 μ L do extrato enzimático bruto a 245 μ L de uma mistura contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 75 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ M. A reação foi realizada a 25 °C sob luz de lâmpada de 15 W por 10 minutos. Seguindo o método, a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Multiskan SkyHigh), a 560 nm por 1 minuto (Giannopolitis e Ries 1977). Para as amostras de controle, a mistura de reação foi mantida no escuro por 10 minutos e a absorbância medida a 560 nm. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971).

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pelo método de Cakmak e

Horst (1991). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) e de H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 5 µL do extrato foliar a 245 µL da mistura, e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 240 nm, durante 1 minuto, a 25 °C, em espectrofotômetro (Multiskan SkyHigh). A atividade da CAT foi expressa em mmol/minuto/mg⁻¹ de proteína (Anderson et al. 1995).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada pela adição de 5 µL do extrato foliar bruto a 245 µL de uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 1 mM de H₂O₂ e 0,8 mM de ascorbato. A atividade foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm, durante 1 minuto, a 25 °C, em espectrofotômetro (Multiskan SkyHigh). Um coeficiente de extinção de 2,8 mM cm⁻¹ foi utilizado para calcular a atividade de APX. A atividade da APX foi expressa em µmol/minuto/ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia de Kar e Mishra (1976). A reação foi iniciada após a adição de 5 µL do extrato enzimático bruto a 245 µL de uma mistura de reação contendo fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. A absorbância foi medida a 420 nm em espectrofotômetro (Multiskan SkyHigh), durante 1 minuto, após adição do extrato à mistura. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da POX (Chance e Maehley 1955), expressa em mM de purpurogalina produzida por minuto/mg de proteína.

Determinação da atividade de enzima de defesa

O processo de avaliação da atividade da fenilalanina amônia liase (FAL, E.C. 4.3.1.5) foi conduzido pela metodologia empregada por Guo et al. (2007), com modificações. A reação foi iniciada pela introdução de 10 µL da enzima na mistura de reação composta por 240 µL de solução contendo 40 mM de tampão borato de sódio (pH 8,8) e 20 mM de L-fenilalanina. A incubação da mistura reacional ocorreu a 30°C durante uma hora. Para as amostras de controle, o tampão borato foi empregado no lugar do extrato. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de HCl 6N e a absorbância dos derivados do ácido transcinâmico foi registrada a 290 nm. O coeficiente de extinção de 10 M cm⁻¹ (Zucker 1965) foi empregado para estimar a atividade da FAL. A atividade enzimática foi expressa com base na concentração de proteína obtida para cada amostra determinada pelo método de Bradford (1976).

Reação dos genótipos em campo

Determinação dos parâmetros fisiológicos

O experimento de campo foi conduzido na Estação de Floração e Cruzamento de Devaneio/Universidade Federal Rural de Pernambuco, situada no município de Amaraji, mesorregião da Zona da Mata de Pernambuco. As coordenadas do ponto de referência da área experimental são latitude - 8,327928°, longitude -35,409199° e 514 m altitude, com precipitação pluvial média anual de 2.600mm.

Cada genótipo consistiu de um tratamento, onde as plantas foram distribuídas em parcelas constituídas por três linhas de 5 m de comprimento cada, com espaçamento de 1,4 m entre fileiras. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, sob condições de infecção natural por *P. kuehnii* provenientes de cultivos comerciais localizados no entorno da área experimental e plantio de dois sulcos de bordadura e entre os blocos com linhas infectivas com variedade SP 78-4764 (padrão de suscetibilidade à Ferrugem alaranjada).

Para quantificar as alterações fisiológicas, em cada parcela avaliou-se a severidade da doença e os componentes fisiológicos, para os mesmos genótipos estudados em casa de vegetação, RB101130 e RB021754. Foram avaliados pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides), eficiência quântica do fotossistema II (fluorescência da clorofila *a*) e extravasamento de eletrólitos. As avaliações foram determinadas em plantas com 130 dias de idade após o segundo corte na folha +1. As médias dos tratamentos foram comparadas usando o teste *t* ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Software R (R Core Team, 2023).

Eficiência quântica do fotossistema II

Foram quantificados parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a*, com auxílio de fluorômetro portátil (FluorPen, modelo FP100, Photon Systems Instrumentes), sendo eles a Fluorescência inicial (F_0), Fluorescência variável (F_v), Fluorescência máxima (F_m) e Eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m). O protocolo de determinação da fluorescência foi adaptado de acordo com Souza et al. (2021). Para tanto, uma pinça foi fixada na porção mediana da folha +1 evitando-se a nervura central, e após adaptação da área foliar ao escuro por 30 minutos, realizaram-se as leituras.

Determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram determinadas a partir de cinco discos de folhas +1 (5 mm de diâmetro) de duas plantas por parcela, usando como extrator o dimetilsulfóxido (DMSO) (Santos et al. 2008). Os discos coletados foram imersos em tubos falcon contendo 5 mL de solução saturada de DMSO e mantidos no escuro à temperatura de 24 °C por 24 horas. As absorbâncias dos extratos foram lidas a 480, 649 e 665 nm, usando um

espectrofotômetro (Multiskan Sky Microplate, Thermo Fisher Scientific). A solução saturada de DMSO foi usada como controle. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram calculadas de acordo com Wellburn (1994).

Determinação do extravasamento de eletrólitos

O extravasamento de eletrólitos foi determinado de acordo com a metodologia de Lima et al. (2002), com modificações. Com isso, foram coletados 22 discos foliares (5 mm de diâmetro) da folha +1 de duas plantas em cada parcela, os quais foram lavados em água deionizada imediatamente após serem amostrados. Em seguida, eles foram mantidos em 50 mL de água deionizada, em tubos falcon, por 2 horas, sob 25°C. Após esse período, foi realizada a primeira leitura da condutividade elétrica inicial (X_i), com auxílio de condutivímetro (Tec-4MP Condutivímetro), em $S\ cm^{-1}$. Em seguida, os tubos foram transferidos para estufa por 2 horas a 90°C, para realizar a segunda leitura da condutividade final (X_f) de cada amostra. O nível de eletrólito (NE), dado em porcentagem, foi obtido dividindo-se o valor da primeira leitura pelo valor da segunda leitura: $[(X_i/X_f) \times 100]$ (Scotti Campos e Thu Pham Thi, 1997).

1 **RESULTADOS**

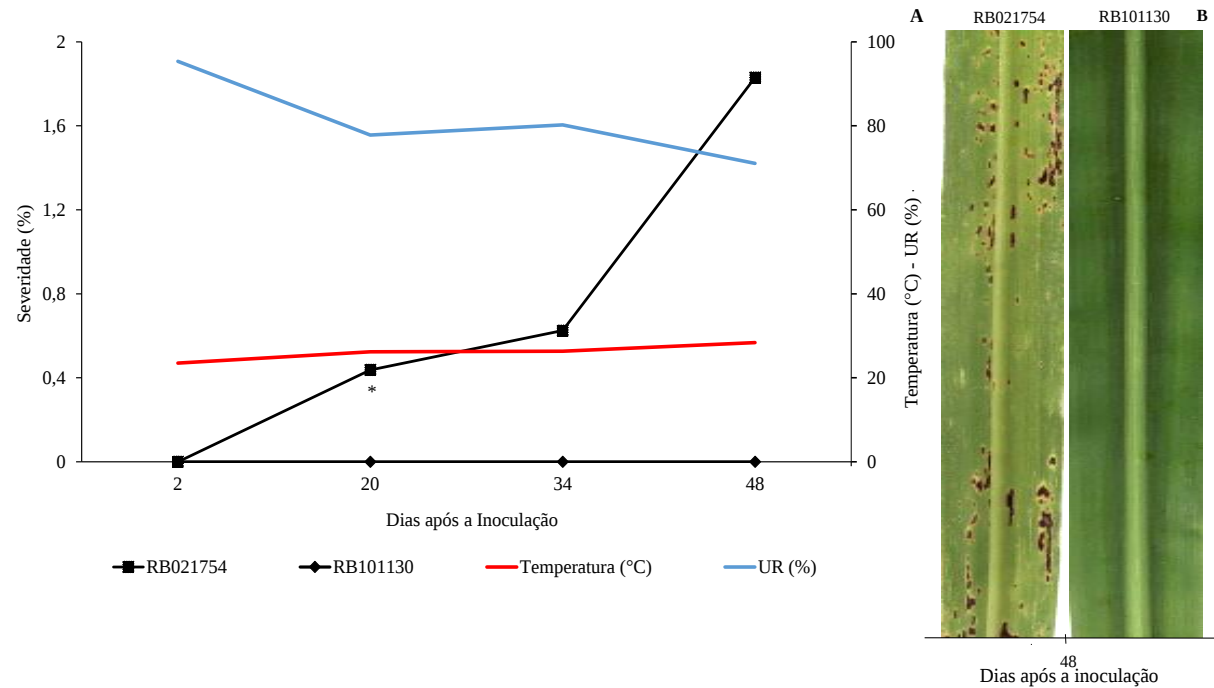
2 Para as variáveis epidemiológicas analisadas, foram observadas diferenças entre os
3 genótipos resistente e suscetível, em condições de casa de vegetação. Os sintomas da Ferrugem
4 alaranjada surgiram inicialmente como pontuações cloróticas na face inferior das folhas mais
5 jovens, evoluindo posteriormente para formação de pústulas de coloração alaranjada,
6 distribuídas por toda a superfície das folhas do genótipo suscetível. Os períodos de incubação
7 e latência foram de 8 e 19 DAI, respectivamente (Tabela 1). Não houve sintomas da doença no
8 genótipo resistente. A curva de progresso da doença para o genótipo RB021754 apresentou
9 aumento significativo no intervalo de tempo avaliado, aos 20 DAI (Fig. 1). Nesse período,
10 foram registradas temperaturas médias entre 23 e 26 °C e umidade relativa do ar entre 78 e 95%
11 (Fig. 1). O número médio de lesões (NL) no genótipo suscetível foi de 13 lesões por cm² (Tabela
12 1), enquanto a severidade final foi de 1,83% (Fig. 1). Já o valor de AACPD foi de 47,06.

13 **Tabela 1** Períodos de incubação e latência (em dias após a inoculação), Número de lesões (NL)
14 e valores de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) na folha +1 nos
15 genótipos de cana-de-açúcar.

Genótipos	Incubação (DAI)	Latência (DAI)	NL (48 DAI)	AACPD
RB021754	8	19	13	47,06
RB101130	s.d. ^(a)	s.d.	s.d.	s.d.

16 ^(a) Abreviação para genótipos sem a doença.

17



18

19 **Fig. 1** (A) Curva de progresso da severidade da Ferrugem alaranjada, temperatura média (°C) e umidade

1 relativa do ar (%) aos 2, 20, 34 e 48 dias após inoculação com *Puccinia kuehnii*. (B) Sintomas da
2 Ferrugem alaranjada em segmentos de folhas dos genótipos suscetível (esquerda) e resistente (direita),
3 aos 48 dias após a inoculação. As severidades médias dentro de cada tempo de avaliação marcadas com
4 um asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) entre cultivares de acordo com o teste *t*.

5 As atividades das enzimas do sistema antioxidativo foram influenciadas tanto pela
6 infecção causada por *P. kuehnii*, quanto pelo nível de intensidade da doença encontrada nos
7 genótipos ao longo do tempo. De modo geral, as plantas inoculadas apresentaram aumento na
8 atividade enzimática quando comparadas aos seus pares controle. No genótipo RB101130
9 (resistente), a infecção por *P. kuehnii* aumentou a atividade da SOD em 25% apenas aos 20
10 DAI. O mesmo padrão de aumento foi observado para a atividade da APX e POX aos 2 e 20
11 DAI, onde APX foi superior em 42 e 49% e POX em 38 e 47%, respectivamente. Já no genótipo
12 RB021754 (suscetível) foi observado aumento de 30% na atividade de SOD aos 34 DAI em
13 plantas inoculadas em relação as plantas não inoculadas. Para APX, as médias foram,
14 respectivamente, superiores em 24 e 33% aos 34 e 48 DAI.

15 Comparando as plantas dos dois genótipos, inoculadas com *P. kuehnii*, os resultados
16 revelaram diferenças significativas entre os genótipos avaliados, com maiores valores da
17 atividade enzimática antioxidante observados no genótipo RB021754, padrão suscetível. Neste
18 genótipo, a atividade da SOD foi, respectivamente, 33 e 25% superior aos 34 e 48 DAI em
19 relação ao RB101130. O mesmo padrão de aumento foi observado dentro desse período para
20 CAT (45–22%) e APX (36–41%). Para POX observou-se mudanças no comportamento padrão
21 dos genótipos ao longo do tempo avaliado, com maiores valores observados no padrão
22 resistente aos 2 e 20 DAI (26–31%), enquanto aos 48 DAI, o padrão suscetível elevou em 54%
23 a atividade da enzima (Fig. 2).

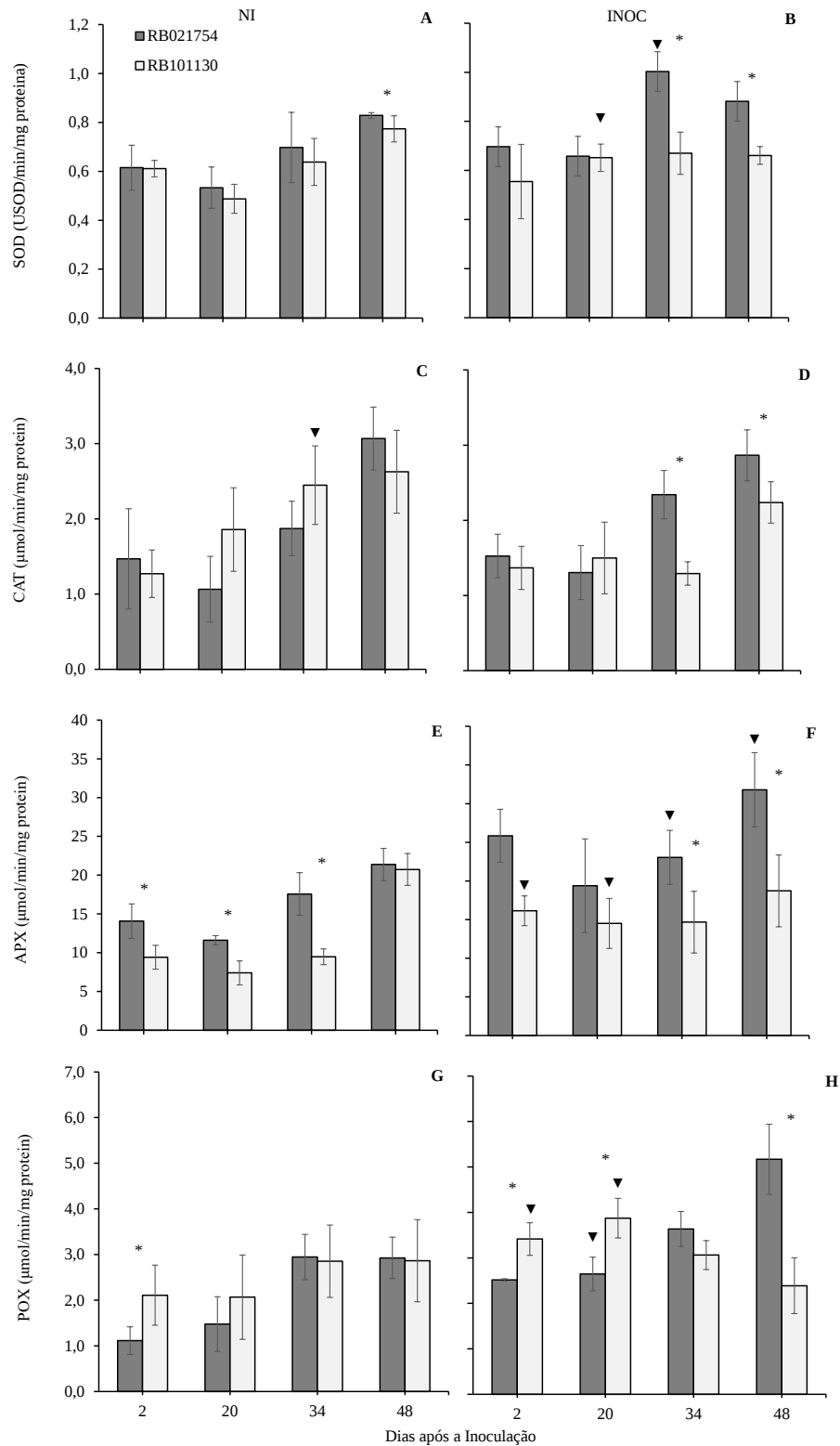


Fig. 2 Atividade da Superóxido dismutase (SOD) (A e B), Catalase (CAT) (C e D), Ascorbato peroxidase (APX) (E e F) e Peroxidase (POX) (G e H) determinadas a partir de folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar, nos genótipos RB021754 (suscetível) e RB101130 (resistente) não inoculadas (NI) e inoculadas (INOC) com *Puccinia kuehnii*. Para cada genótipo, as médias entre os tratamentos NI e INOC, dentro de cada tempo de avaliação marcadas com um triângulo invertido (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As médias entre genótipos, dentro de cada tempo de avaliação, para tratamentos NI ou INOC, marcada com um asterístico (*), são significativamente diferentes. As barras representam o desvio padrão das médias.

A análise da atividade da FAL revelou diferenças significativas entre plantas não inoculadas e inoculadas de cada genótipo dentro do tempo avaliado, com os maiores valores observados no genótipo RB101130 (resistente). Em plantas inoculadas, a atividade da FAL foi maior em 18, 12, 19%, respectivamente, aos 2, 20 e 48 DAI, para o genótipo RB021754 em relação ao genótipo RB101130 (Fig. 3).

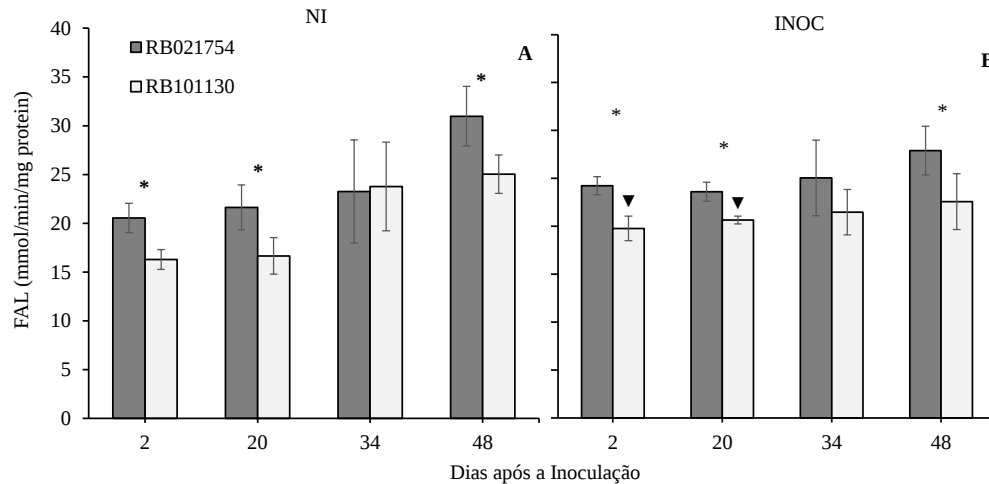


Fig. 3 Quantificação da atividade da FAL (A e B) determinadas a partir de folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar, nos genótipos RB021754 (suscetível) e RB101130 (resistente) não inoculadas (NI) e inoculadas (INOC) com *Puccinia kuehnii*. Para cada genótipo, as médias entre os tratamentos NI e INOC, dentro de cada tempo de avaliação marcadas com um triângulo invertido (▼) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As médias entre genótipos, dentro de cada tempo de avaliação, para tratamentos NI ou INOC, marcada com um asterístico (*), são significativamente diferentes. As barras representam o desvio padrão das médias.

Para a severidade da doença no experimento em campo, não houve diferença significativa entre os genótipos resistente e suscetível, sendo a média geral 0,19%. No entanto, para todos os pigmentos analisados e eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm), foram observadas diferenças significativas entre os padrões de resistência e suscetibilidade. As folhas das plantas do genótipo RB101130 (resistente) apresentaram, respectivamente, níveis superiores em 60, 40 e 44% para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides em relação ao genótipo RB021754 (suscetível). Do mesmo modo, valores superiores em 12% foram observados para Fv/Fm no padrão resistente, RB101130. Já para o extravasamento de eletrólitos não houve diferença significativa entre os genótipos, sendo a média geral de 53% (Fig. 4).

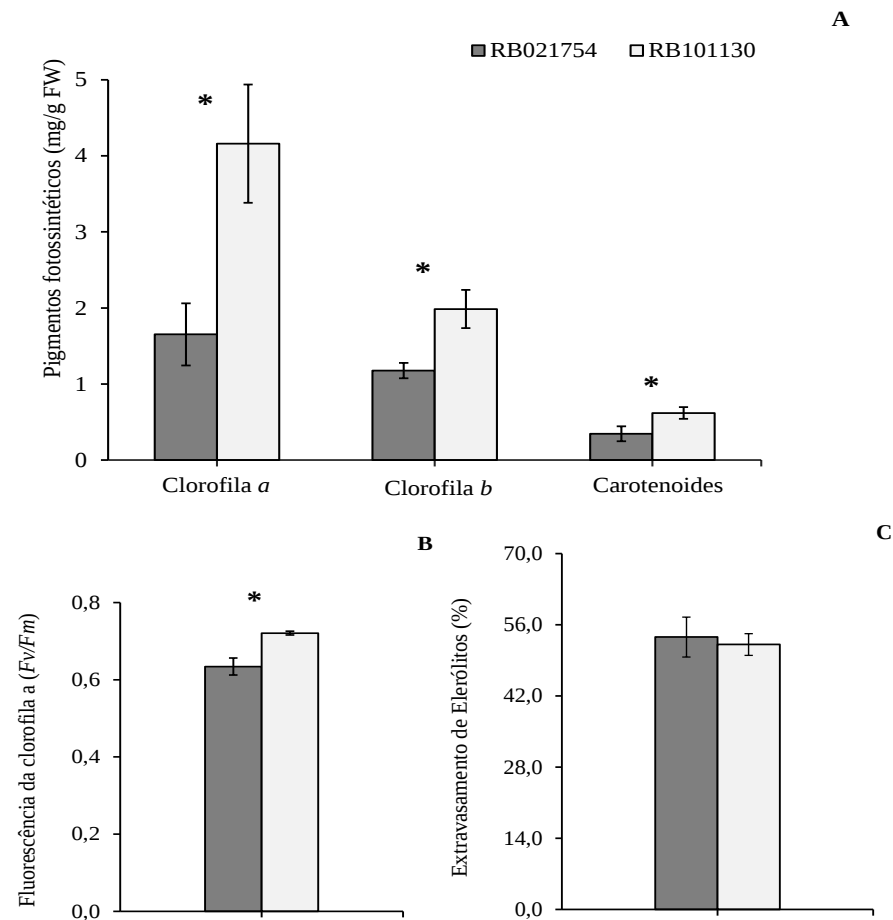


Fig. 4 Pigmentos fotossintéticos (A), Eficiência quântica do fotossistema II (B) e Extravasamento de eletrólitos (C) determinados a partir de folhas +1 de plantas de cana-de-açúcar dos genótipo RB021754 (suscetível) e RB101130 (resistente) infectadas por *Puccinia kuehnii*. Para cada genótipo, as médias marcadas com um asterisco (*) são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) pelo teste *t*. As barras representam o desvio padrão das médias.

DISCUSSÃO

O presente estudo fornece evidências das características bioquímicas e fisiológicas associadas à resposta de genótipos de cana-de-açúcar que diferem em seu nível basal de resistência à *Puccinia kuehnii*. Neste estudo, as plantas do genótipo RB101130 foram classificadas como resistentes, enquanto o genótipo RB021754 foi classificado como suscetível, confirmando os resultados obtidos por Lima (2022). Este último apresentou aumento significativo na atividade de enzimas do sistema antioxidativo, coincidindo com o estresse causado com o progresso da doença no tempo avaliado. Os achados relatados aqui são apoiados por estudos anteriores de diferentes interações hospedeiro-patógeno, que descrevem que a resposta das plantas à infecção por patógenos acarreta alterações em seu metabolismo que podem resultar em resistência ou suscetibilidade (Peters et al. 2017; Correr et al. 2020).

1 Um das reações iniciais de defesa nas plantas após o reconhecimento do patógeno é o
2 aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O acúmulo de EROs no local
3 de infecção é considerado um componente central inicial de resposta imune da planta, uma vez
4 que pode contribuir para o fortalecimento das paredes celulares do hospedeiro via reticulação
5 de glicoproteínas; peroxidação lipídica (dano à membrana); inibição do crescimento de
6 patógenos; indução de expressão gênica e agindo como molécula de sinalização (Silva et al.
7 2014; Peters et al. 2017). Além disso, a morte celular localizada induzida pelo acúmulo de
8 EROs, chamada resposta de hipersensibilidade (HR), pode aumentar a resistência do hospedeiro
9 a patógenos biotróficos (Peters et al. 2017).

10 As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato do peroxidase
11 (APX) e peroxidase (POX) são importantes na proteção das plantas, uma vez que reduzem o
12 O_2^- a H_2O_2 , e por fim geram H_2O e O_2 , prevenindo efetivamente o acúmulo das EROs (Xing
13 2013; Su et al. 2014). A velocidade e os níveis dessas reações em locais específicos do
14 hospedeiro influenciam diretamente a eficácia da defesa contra o patógeno (Blokhina et al.
15 2003). No presente estudo, os maiores níveis de enzimas antioxidantes foram registrados em
16 plantas infectadas do genótipo suscetível. Essas diferenças marcantes na atividade das enzimas
17 antioxidantes entre os genótipos demonstram que a infecção por *P. kuehnii* causou dano
18 oxidativo com consequente aumento na atividade de SOD, CAT, APX e POX. No entanto, os
19 dados sugerem que o sistema imune do genótipo suscetível foi ativado tardiamente, 34 e 48 dias
20 após a infecção (DAI), sugerindo que *P. kuehnii* não foi percebido por este genótipo como uma
21 ameaça. Os resultados do atual estudo corroboram com relatos na literatura descritos por Correr
22 et al. (2020) sobre a expressão de genes envolvidos nos processos moleculares no presente
23 patossistema, por Peters et al. (2017) para cana-de-açúcar infectada com Carvão e por Kurama
24 et al. (2002) infectada por Ferrugem marrom. Os trabalhos demonstram que plantas suscetíveis
25 têm um atraso no início da explosão oxidativa após a infecção fúngica quando comparadas com
26 plantas resistentes.

27 Por outro lado, os resultados aqui apresentados evidenciaram acúmulo de POX
28 precocemente, 2 e 20 DAI, em maior concentração no genótipo resistente, sugerindo um papel
29 importante na defesa contra a *P. kuehnii*. POX catalisa reações oxidativas usando H_2O_2 como
30 aceitor de elétrons em seu centro ativo como um metal. É uma das enzimas de primeira resposta
31 que fornece defesa rápida contra patógenos nas plantas, uma vez que sua atividade está
32 envolvida na lignificação, suberificação e polimerização de glicoproteínas ricas em
33 hidroxiprolina (Shigeto e Tsutsumi 2016; Ashfaq et al. 2021). Pesquisas anteriores relataram
34 que respostas precoces são essenciais para iniciar uma estratégia de defesa bem-sucedida na

cana-de-açúcar infectada com carvão, resultando em resistência (Que et al. 2014; Peters et al. 2017; McNeil et al. 2018).

Para a atividade da FAL, os resultados revelaram aumento significativo em plantas infectadas, principalmente, no genótipo RB021754 (suscetível). A via dos fenilpropanóides é comumente associada à defesa da planta, não apenas fornecendo moléculas para lignificação, mas também compostos antimicrobianos como cumarinas e flavonoides (Naoumkina et al. 2010). O estudo dessa enzima está relacionado com o início da biossíntese desses componentes que participam da resposta de defesa da planta durante a infecção. Apesar de maior atividade da FAL, o genótipo suscetível apresentou os sintomas de ferrugem alaranjada. É plausível hipotetizar que as rotas de defesa associadas a esta enzima não foram importantes em conter o processo infeccioso de *P. kuehnii* nos tecidos de plantas de cana-de-açúcar. Esta hipótese pode ser confirmada pelo fato de o genótipo resistente apresentar menores atividades da FAL. Assim, é necessário realizar estudos adicionais para verificar a infecção fúngica com intervalos tempo em horas após a inoculação e outros mecanismos de defesa que possam estar associados à inibição de desenvolvimento do patógeno.

Ao analisar os parâmetros fisiológicos, observou-se que a infecção por *P. kuehnii* prejudicou a capacidade fotossintética nas plantas do genótipo suscetível, aqui denotadas pela menor eficiência quântica do fotossistema II e menor conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Dessa forma, a energia absorvida pelos pigmentos fotossintéticos nas folhas infectadas por *P. kuehnii* não foi direcionada para o processo fotoquímico, devido ao dano foto-oxidativo induzido pelo patógeno (Correr et al. 2020). Esses achados estão apoiados por pesquisas anteriores sobre as alterações fisiológicas no presente patossistema, conforme descrito por Bilgin et al. (2010), mostrando que o processo fotossintético é impactado negativamente pela infecção. Similarmente, observado por Zhao et al. (2011), redução no teor de clorofila e taxa fotossintética líquida em plantas suscetíveis. Os resultados do presente estudo indicaram valores de *Fv/Fm* próximos a 0,80 para as folhas infectadas de plantas do genótipo resistente, sugerindo ausência de fotoinibição crônica.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicaram comportamento padrão distinto nos genótipos de cana-de-açúcar, quanto aos parâmetros bioquímicos e fisiológicos em decorrência da infecção por *P. kuehnii*. A doença foi observada apenas no genótipo suscetível, com consequente comprometimento do processo fotossintético aliado ao maior estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* 109(4):1247–1257
- Ashfaq B, Arshad HMI, Atiq M, Yousaf S, Saleem K, Arshad A (2021) Biochemical profiling of resistant phenotypes against *bipolaris oryzae* causing brown spot disease in rice. *Frontiers in Agronomy* 3:675895
- Barbasso D, Jordão H, Maccheroni W, Boldini J, Bressiani J, Sanguino A (2010) First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of Orange rust of sugarcane Brazil. *Plant Disease* 94(9):1170–1170
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase improved as says and as say applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276–287
- Bilgin DD, Zavala JA, Zhu J, Clough SJ, Ort DR, Delucia EH (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ* 33(10):1597–1613
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91:179–194
- Bradford MN (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83(3):463–468
- Carvalho NL, Barcellos AL (2012) Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* 5(5):749–766
- Chance B, Maehley AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2:764–775
- Chapola RG, Hoffmann HP, Massola NS (2016) Reaction of sugarcane varieties to orange rust (*Puccinia kuehnii*) and methods for rapid identification of resistant genotypes. *Trop Plant Pathol* 41(3):139–146
- Cheavegatti-Gianotto A, Abreu HMC, Arruda P, Besspalhok Filho JC, Burnquist WL, Creste S, di Ciero L, Ferro JA, Figueira AVO, Filgueiras TS, Grossi-de Sá MF, Guzzo EC, Hoffmann HP, Landell MGA, Macedo N, Matsuoka S, Reinach FC, Romano E, Silva WJ, Silva Filho MC, Ulian EC (2011) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. *Trop Plant Biol* 4(1):62–89
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2022-2023. Quarto levantamento 10(4):1-49
- Correr FH, Hosaka GK, Gómez SGP, Cia MC, Vitorello CBM, Camargo LEA, Massola Jr, SN, Carneiro MS, Margarido GRA (2020) Time-series expression profiling of sugarcane leaves infected with *Puccinia kuehnii* reveals an ineffective defense system leading to susceptibility. *Plant Cell Reports* 39:873–889
- Croft B, Magarey R, Whittle P (2000) Disease management. In: Hogarth M, Allisopp P *Manual of Canegrowing*. Indooroopilly, Qld.: Bureau of sugar experiment stations 263–289
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Montagu M, Inze D, Breusegem FV (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779–795
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology* 34:1023–1028
- FAO. FAOSTAT: Food and Agriculture Data. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso

em: 07 mar. 2022.

- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59(2):309–14
- Guo Y, Liu L, Bi Y (2007) Use of silicon oxide and sodium silicate for controlling *Trichothecium roseum* postharvest rot in China cantaloupe (*Cucumis melo* L.). *Int J Food Sci Tech* 42:1012–1018
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station 347(2nd edit)
- Hoy JW, Avellaneda MC, Bombecini J (2014) Variabilidade na patogenicidade e resistência de *Puccinia melanocephala* em cultivares de cana-de-açúcar. *Plant Disease* 98(12):1728–1732
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology* 57(2):315–319
- Klosowski AC, Ruaro L, Bessalho Filho JC, May-De Mio LL (2013) Proposta e validação de escala para a ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology* 38(2):166–171
- Kurama EE, Fenille RC, Rosa VJR, Rosa D, Ulian EC (2002) Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. *Mol Plant Pathology* 3:251–259
- Lima AFT (2022) Epidemiologia comparativa das ferrugens marrom e alaranjada em genótipos de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE p.63
- Lima ALS, Damatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and experimental botany* 47(3):239–247
- Magarey R, Willcox T, Croft B, Cordingley A (2001) Orange Rust, A Major Pathogen Affecting Crops of Q124 in Queensland in 2000. *Proc Aust Soc Sugarcane Technol* 23:274–280
- Matsuoka SA, Garcia AF, Arizono H (2005) Melhoramento da cana-de-açúcar. In: Borém A (Eds.) *Melhoramento de espécies cultivadas*. Editora UFV, Viçosa. pp. 205–251
- McNeil MD, Bhuiyan SA, Berkman PJ, Croft BJ, Aitken KS (2018) Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection using RNA-seq and microscopy. *PLoS One* 13(5):e0197840
- Minchio C. A.; Canteri, M.G.; Rocha, J.A (2011) Germination of uredospores of *Puccinia kuehnii* subjected to different temperatures and incubation times. *Summa Phytopathologica* 37(4):211–214
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology, Oxford* 22(5):867–880
- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA (2010) Genome-wide Anal Phenylpropanoid Defence Pathways
- Neves MF, Conejero MA (2010) Estratégias da indústria da cana. In: *Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial*. Atlas 59–88
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Fernie AR (2007) Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50(6):1093–1106
- Peters LP, Carvalho G, Vilhena MB, Creste S, Azevedo RA, MonteiroVitorello CB (2017) Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and -susceptible genotypes. *Planta* 245(4):749–764

- 1 Que Y, Su Y, Guo J, Wu Q, Xu L (2014) A global view of transcriptome dynamics during *Sporisorium*
2 *scitamineum* challenge in sugarcane by RNA-seq. PLoS One 9(8):e106476
- 3 R Development Core Team. 2023: R: A language and environment for statistical
4 computing. RFoundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em:
5 <https://www.rproject.org/>. Acesso em: 07 maio 2023.
- 6 Rott PC, Kaye C, Naranjo MM, Shine J Jr, Sood S, Comstock JC, Raid RN (2016) Controlling sugarcane diseases
7 in Florida: a challenge in constant evolution. Proc Int Soc Sugar Cane Technol 29:595–600
- 8 Santos RP, Cruz ACFD, Iarema L, Kuki KN, Otoni WC (2008) Protocolo para extração de pigmentos foliares em
9 porta-enxertos de videira micropropagados. Ceres 55(4):356–364
- 10 Scotti Campos P, Thu Phan Thi A (1997) Effect of abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid
11 composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subject to ormotic stress. Plant Science 130:11-18
- 12 Shaner G, Finney RR (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox
13 wheat. Phytopathology 67(8):1052-1056
- 14 Shigeto J, Tsutsumi Y (2016) Diverse functions and reactions of class III peroxidases. New Phytologist
15 209(4):1395-1402
- 16 Sood SG, Comstock JC, Glynn NC (2009) Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance.
17 Plant Disease 93:1335–1340
- 18 Souza AAB, Nascimento CWA, Souza ER (2021) Mineral composition, chlorophyll fluorescence and zinc
19 biofortification in *Vigna unguiculata* fertilized with bulk and nanoparticulate zinc oxides. Acta
20 Physiologiae Plantarum 43(12):159
- 21 Su YC, Guo JL, Ling H, Chen SS, Wang SS, Xu LP, et al (2014) Isolation of a novel peroxisomal catalase gene
22 from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. PLoS One 9:e84426
- 23 Wellburn AR (1994) The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using
24 Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. Journal of Plant Physiology
25 144(3):307–313
- 26 Xing HQ (2013) Physiological index determination of sorghum head smut group and molecular markers analysis
27 of disease resistance genes, master's degree thesis, shenyang normal university, shenyang.
- 28 Zhao D, Glynn NC, Glaz B, Comstock JC, Sood S (2011) Orange rust effects on leaf photosynthesis and related
29 characters of sugarcane. Plant Disease, Saint Paul 95(6)
- 30 Zucker M (1965) Induction of phenylalanine ammonia deaminase by light and its relation to chlorogenic acid
31 synthesis in potato tuber tissues. Plant Physiology 40(5):779

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

O genótipo RB101130 apresentou resistência à infecção por *Puccinia kuehnii* e, consequentemente, permitiu a preservação do processo fotossintético em plantas.

O genótipo resistente, RB101130, apresentou respostas precoces contra infecção por *P. kuehnii*, consequentemente, maiores atividades das enzimas antioxidantes em folhas de cana-de-açúcar no início da infecção.

O genótipo RB021754 apresentou suscetibilidade ao patógeno *P. kuehnii*, associada a redução da área fotossintética e aumento do estresse oxidativo.