

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

**PRESERVAÇÃO DE UREDINIÓSPOROS DE *Puccinia kuehnii*,
AGENTE CAUSAL DE FERRUGEM ALARANJADA EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Carolina de Cássia Pani Medeiros^{1,3}; Nelson Sidnei Massola Junior²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a adaptação do método de preservação dos urediniósporos de *Puccinia melanocephala* proposto por Garcia (Summa phytopathol. v.33 n.2, 2007) para *Puccinia kuehnii*, de modo a manter a sua viabilidade por períodos prolongados. Esporos coletados em plantas infectadas foram armazenados em diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 5°C, -20°C e -80°C). Em cada temperatura foram armazenados esporos desidratados (em sílica gel) ou sem desidratação. Mensalmente, os esporos tiveram a viabilidade testada por meio de plaqueamento em Agar-Água. O ensaio foi conduzido três vezes. Os esporos rapidamente perderam a viabilidade em todos os tratamentos. Testes com o corante vital Trypan Blue mostraram que parte dos esporos permaneceu viva, porém há necessidade de quebrar a dormência deles após a preservação.

Palavras-chave: preservação, urediniósporos, *Puccinia kuehnii*, cana-de-açúcar.

PRESERVATION OF THE *Puccinia kuehnii* UREDINIOSPORES, CAUSAL AGENT
OF ORANGE RUST IN SUGAR CANE

SUMMARY

This study aimed to adapt the method of *Puccinia melanocephala* urediniospores preservation, proposed by Garcia (Summa Phytopathol. V.33 n.2, 2007) to *Puccinia kuehnii*, in order to keep their viability for long periods. Spores collected from diseased plants were stored at different temperatures (room temperature, 5°C, -20°C and -80°C). At each temperature it were stored dried spores (silica gel) or without dehydration. For each month, spores viability was tested by plating them on agar-water medium. The experiment was conducted three times. The spores viability was quickly lost in all treatments. Tests with the vital dye Trypan Blue showed that part of the spores remained alive, but it is necessary to break their dormancy after storage.

Key-words: preservation, urediniospores, *Puccinia kuehnii*, sugar cane.

¹Graduando em Engenharia Agrônômica na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)

INTRODUÇÃO

A Ferrugem alaranjada é uma doença muito antiga da cana-de-açúcar, presente durante anos, apenas no sudeste da Ásia e Oceania, sem qualquer impacto econômico. Em 1999, chegou à Austrália, onde, entre 2000 e 2002, reduziu em 20% a produtividade da cana. Em julho de 2007, surgiu no continente americano, inicialmente na Flórida. Dois meses depois, apareceu na Guatemala e países vizinhos (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) notificou a primeira ocorrência de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar no Brasil, em Araraquara, interior de São Paulo, no início de 2010. O Departamento de Sanidade Vegetal da Secretaria de Defesa Agropecuária do MAPA (SDA/DSV) foi informado por pesquisadores da região sobre a presença da praga em uma propriedade do município em dezembro de 2009 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A ferrugem alaranjada é causada por *Puccinia kuehnii*, um fungo basidiomiceto, da ordem uredinales, parasita obrigatório dos tecidos foliares, reduzindo a capacidade de fotossíntese da planta e, em consequência, a produção de sacarose (Tokeshi, 1997). Nos países onde ocorre a ferrugem, variedades resistentes a essa doença estão entre os objetivos almejados por todos os programas de melhoramento dessa cultura. Para o desenvolvimento de variedades de cana resistentes à ferrugem, se fazem necessárias inoculações controladas de grande número de genótipos, durante o processo de seleção. Como a ferrugem é uma doença que apresenta sazonalidade na manifestação de sintomas, nem sempre é possível conseguir quantidades adequadas de esporos para realizar essas inoculações. A preservação dos esporos em condições ambientes ou em geladeira tem se mostrado inadequada, pois os mesmos perdem a viabilidade com muita rapidez, tornando-se impróprios para os testes. Dessa forma, torna-se necessário desenvolver uma metodologia para preservar os esporos por períodos relativamente prolongados, mantendo suas características de patogenicidade.

OBJETIVOS

Adaptar o método de preservação dos urediniósporos de *Puccinia melanocephala* proposto por Garcia *et al.* (2004) para *Puccinia kuehnii*, agente causal da ferrugem alaranjada da cana, de modo a manter a sua viabilidade por períodos prolongados, possibilitando a sua utilização em testes posteriores.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesses ensaios foram usadas plantas sadias de cana-de-açúcar, sendo da variedade RB72-454, considerada suscetível à ferrugem alaranjada, e foram utilizados esporos obtidos a partir de folhas dessa variedade de cana infectadas naturalmente, na área comercial da Usina São José de Rio das Pedras, SP. Parte destes esporos foi “desidratada” em sílica gel ou liofilizada e parte permaneceu sem passar por estes processos de “desidratação”. Os tratamentos consistiram em

¹Graduando em Engenharia Agrônoma na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)

armazenar esses esporos em diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 5°, -20°C e -80°C). Mensalmente, os esporos tiveram viabilidade e infectividade avaliadas segundo a metodologia proposta por Asnaghi et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto no primeiro quanto no segundo experimento, os esporos preservados perderam a viabilidade muito rapidamente em todos os tratamentos. Como esse fato foi verificado logo no primeiro experimento, no segundo experimento os testes de viabilidade foram feitos com maior frequência (quinzenalmente). No entanto, mesmo realizando os testes com menor tempo de preservação, os esporos mostraram baixa viabilidade depois de preservados por 15 dias. Esse fato pode ser verificado pela baixa porcentagem de germinação dos esporos preservados quando comparada à porcentagem de germinação antes da preservação, em qualquer dos tratamentos. Os resultados da viabilidade dos esporos nos dois experimentos encontram-se na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Viabilidade dos esporos de *Puccinia kuehnii* preservados durante 3 meses, por diferentes métodos.

Tratamentos	Viabilidade (%)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Ac*	4,17	—	—
As	2,67	—	—
Gc	3,67	—	—
Gs	5,5	—	—
Fc	2	1,4	0
Fs	3,33	1,73	0
Dc	2,17	0,86	0
Ds	3,33	1,4	0
L	1,5	0,93	0

Viabilidade inicial: Exp.1=16,3%, Exp. 2=39,3%, Exp.3=3%(39,8 com nonanol):.*Ac=Temperatura ambiente com sílica gel, As=Temperatura ambiente sem sílica gel, Gc=Geladeira com sílica gel, Gs=Geladeira sem sílica gel, Fc=Freezer com sílica gel, Fs=Freezer sem sílica gel, Dc=Deep-freezer com sílica gel, Ds=Deep-freezer sem sílica gel, L=Liofilizado.

Portanto, com os resultados acima expostos, podemos afirmar que todos os tratamentos foram igualmente ineficientes em preservar a viabilidade dos esporos de *Puccinia kuehnii* coletados de folha de cana-de-açúcar. Como uma tentativa de comprovar se os esporos preservados, os quais se mostravam inviáveis, estavam realmente mortos ou apenas dormentes, realizou-se testes de viabilidade com o corante Trypan Blue, o qual possui a capacidade de penetrar e, conseqüentemente, corar células mortas. Dessa forma, enquanto as células vivas se mantiveram em sua coloração original, as células mortas adquiriram coloração azul. Os resultados da viabilidade dos esporos no teste com corante Trypan Blue encontram-se na tabela 2 abaixo.

¹Graduando em Engenharia Agrônoma na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)

Tabela 2. Avaliação da reação dos esporos de *Puccinia kuehnii* depois de 48 horas de receber o corante Trypan Blue.

Tratamentos	Esporos Mortos (%)	Esporos Vivos (%)	Viabilidade em ágar (%)
Campo	34,75	62,25	42,00
Ambiente	66,75	33,25	0,00
Freezer com sílica gel	67,00	33,00	0,00
Freezer sem sílica gel	54,75	45,25	0,00
Deep-freezer com sílica gel	47,00	53,00	0,00
Deep-freezer sem sílica gel	44,75	55,25	0,00
Liofilizado	62,25	34,75	0,00

Por meio desses resultados e, principalmente, comparando a porcentagem de esporos vivos com a viabilidade desses esporos, pode-se afirmar que os esporos de *Puccinia kuehnii* possuem uma possível dormência após serem preservados em todos os tratamentos testados. Tal premissa pode ser explicada pelo fato de existir quantidade significativa de esporos vivos após a preservação, os quais, no entanto, não germinaram em ágar, mostrando-se, assim, dormentes. De modo a tentar quebrar essa dormência, testes de viabilidade realizando choque térmico foram preparados, de acordo com o encontrado na literatura para o gênero *Puccinia*. O choque térmico foi realizado no termociclador, sendo que a temperatura foi mantida a 40°C e variou-se o tempo (2,5 min, 5 min e 10 min), no primeiro teste, e, no segundo teste, o tempo foi fixado em 2,5 min e variou-se a temperatura (42°C, 44°C e 46°C). No entanto, mesmo realizando o choque térmico, os esporos preservados continuaram dormentes do ponto de vista da germinação, sendo que apenas os esporos do campo (controle) germinaram quando plaqueados em ágar-água. Como o choque térmico não surtiu em resultado satisfatório na quebra de dormência dos esporos de *Puccinia kuehnii*, realizou-se novo teste, sendo que gotas da suspensão de esporos, tanto do campo quanto esporos preservados, estes últimos submetidos a diferentes tratamentos, foram colocadas em agar-água e sobre a superfície de folhas de cana-de-açúcar, as quais ficaram em câmara úmida por 24 horas. Posteriormente, avaliou-se a viabilidade dos esporos em ágar e a porcentagem de esporos que germinaram sobre a folha, por meio da visualização em microscópio de luz no aumento de 400 vezes de fragmentos da folha retirados com o auxílio de cola na lâmina. No entanto, esse teste também não se mostrou eficiente em estimular a germinação dos esporos de *Puccinia kuehnii*, como pode ser observado pela Figura 1. Outra observação relevante foi a de que os esporos do campo, apesar de apresentarem viabilidade satisfatória em ágar-água, não germinaram quando inoculados em folhas de cana-de-açúcar destacadas, o que demonstra a necessidade de continuação desse tipo de estudo.

¹Graduando em Engenharia Agrônoma na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)

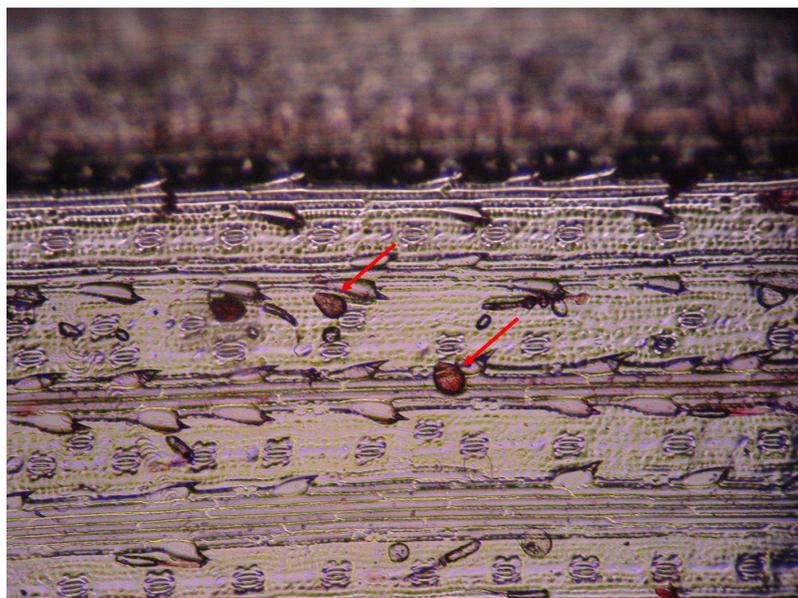


Figura 1. Esporos de *Puccinia kuehnii* não germinados (setas) sobre a superfície de folhas de cana-de-açúcar após 24 horas de câmara úmida.

CONCLUSÕES

Não houve preservação adequada em nenhum dos tratamentos. Os testes realizados com o corante Trypan Blue mostraram que parte dos esporos foi preservada, porém há necessidade de quebrar a dormência dos mesmos após a preservação. O choque térmico e o contato com folhas de cana não foram eficientes para quebrar a dormência dos esporos preservados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C.O.N.; MORAES, V.A.; FERNANDES, C. R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia Melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, n.43, p.13-16, 1987.
- ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R570 to *Puccinia Melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, v.85, n. 3, p.443-450, 2001.
- GARCIA, E.O., CASAGRANDE, M.V., RAGO, A.M. and MASSOLA JR., N.S. Preservação de urediniósporos de *Puccinia melanocephala*, agente causal de ferrugem em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v.33 n.2, 2007.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. São

¹Graduando em Engenharia Agrônoma na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)

Paulo: Agrônômica Ceres, 1997. v.2: Doenças das plantas cultivadas, cap.19, p.207-225.

¹Graduando em Engenharia Agrônômica na ESALQ-USP, ²Professor Doutor da ESALQ-USP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, C.P. 11, 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: carolina.medeiros@usp.br ³Bolsista da FAPESP (Proc. 2011/20999-7)