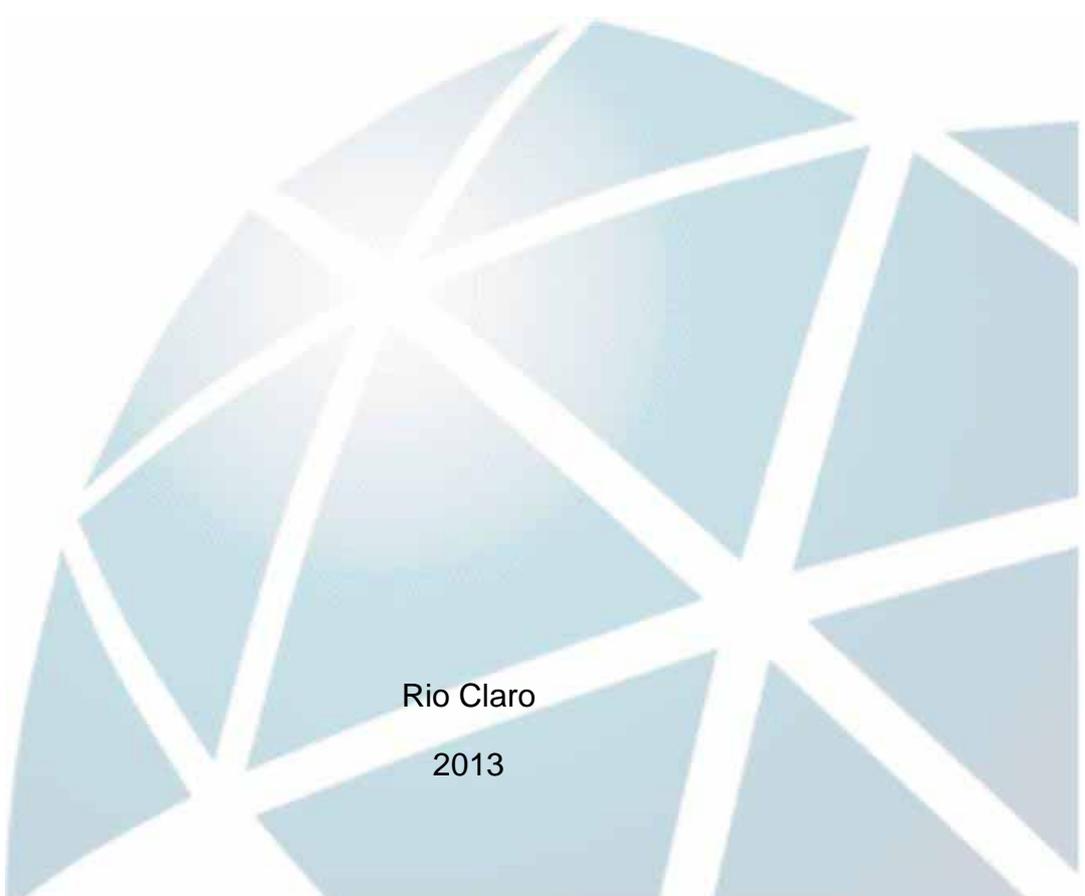

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RENATO AUGUSTO CORRÊA DOS SANTOS

**CARVÃO (*Sporisorium scitamineum*) E PODRIDÃO-ABACAXI
(*Ceratocystis paradoxa*) EM CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum spp.*): UMA REVISÃO**



Rio Claro

2013

RENATO AUGUSTO CORRÊA DOS SANTOS

CARVÃO (*Sporisorium scitamineum*) E PODRIDÃO-ABACAXI (*Ceratocystis paradoxa*) EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*): UMA REVISÃO

Orientador: Dr. ALFREDO SEIITI URASHIMA

Supervisor: Dr. MARCOS APARECIDO PIZANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2013

630 Santos, Renato Augusto Corrêa dos
S237c Carvão (*Sporisorium Scitamineum*) e podridão-abacaxi (*Ceratocystis Paradoxa*) em cana-de-açúcar (*Saccharum SPP.*): uma revisão / Renato Augusto Corrêa dos Santos. - Rio Claro, 2013
95 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Alfredo Seiiti Urashima

1. Agricultura. 2. Fitossanidade. 3. Doença de cana-de-açúcar. 4. Biotecnologia. 5. Mudanças climáticas. I. Título.

Aos meus pais, Waldeglace Rodrigues dos Santos e Alcione Christina Corrêa, em especial à minha mãe, pela presença, amor, incentivo e pela referência que é, tanto em casa como no trabalho.

Ao meu irmão, Maurício Corrêa dos Santos, pelo amor e companheirismo.

À minha namorada, Marina Naufel Bonini, pelo amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

Pelo desenvolvimento deste trabalho, agradeço:

Ao orientador, Dr. Alfredo Seiiti Urashima (UFSCar, Araras/SP);

Ao Dr. Marcos Aparecido Pizano (UNESP, Rio Claro/SP);

À Dra. Silvana Perissatto Meneghin (UFSCar, Araras/SP);

À Dra. Cláudia Monteiro-Vitorello (USP, Piracicaba/SP);

Ao Dr. Roberto Chapola (UFSCar, Araras/SP).

Pela Conclusão da Graduação, agradeço ainda:

À Natália de Oliveira Marin (UNESP, Rio Claro/SP);

Ao Dr. Jonas Contiero (UNESP, Rio Claro/SP);

À Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, Vanda Renata Reis, Ana Paula Bassi, Cristina Martini e Jéssica Carolina Gomes da Silva (UFSCar, Araras/SP);

Ao Dr. Fernando Carlos Pagnocca (UNESP, Rio Claro/SP);

À Dra. Marcia Reami Pechula (UNESP, Rio Claro/SP);

Ao Dr. Fernando Gustavo Tonin (USP, Pirassununga/SP);

À Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira (CNPEN, Campinas/SP);

Ao Dr. Gustavo Henrique Goldman (USP, Ribeirão Preto/SP);

Ao Dr. Marco Aurélio Takita (IAC, Araras/SP);

Ao Dr. Luciano Ângelo de Souza Bernardes (UESC, Ilhéus/BA);

Ao Dr. Carlos Norberto Fischer e Dra. Milene Ferro (UNESP, Rio Claro/SP);

Ao Dr. João Trindade Marques, Eric Aguiar e André Nicolau (UFMG, Belo Horizonte/MG);

Ao Dr. Diego Mauricio Riaño-Pachón (CNPEN, Campinas/SP);

À Juliana Bombecini (UFSCar, Araras/SP);

À Amanda Beatriz Goinski (USP, Ribeirão Preto/SP).

“O DNA é como um programa de computador, mas muito, muito mais avançado que qualquer software por nós criado”. (Gates, 2013)

RESUMO

Cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma gramínea de grande importância, cultivada nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, como no Brasil, na China e na Índia, sendo sua biomassa matéria-prima para a produção de açúcar, etanol combustível e diversos outros produtos. As doenças fúngicas frequentemente acarretam prejuízos à cultura em todo o planeta, gerando danos ao campo e, conseqüentemente, grandes perdas econômicas. Estruturas fúngicas especializadas atuam durante todo o Ciclo de Relação Patógeno-Hospedeiro (CRPH) (sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno), podendo as populações do patógeno permanecer no solo de cultivo, infectando plantas em safras subsequentes e a propagação vegetativa utilizando toletes infectados pode permitir, ainda, o transporte para regiões onde não havia incidência da doença. Métodos e abordagens da Biotecnologia têm contribuído significativamente para o entendimento da relação entre o parasita e o hospedeiro, assim como para o manejo das doenças (controle, detecção e prevenção). Muitas de suas técnicas têm aplicabilidade no cotidiano do agricultor, enquanto outras são utilizadas na pesquisa e no desenvolvimento de variedades resistentes do hospedeiro. Entre as doenças de destaque, carvão (*Sporisorium scitamineum*) e podridão-abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*) são importantes e causam prejuízos já registrados em todas as regiões onde há o cultivo de cana-de-açúcar, embora os períodos de maior incidência sejam distintos. Neste trabalho, são revisados os CRPHs para estes patossistemas, os métodos e perspectivas da Biotecnologia aplicados no estudo e manejo das doenças. Considerando a importância do fator ambiente para a efetivação do CRPH, um capítulo trata as Mudanças Climáticas Globais (MCG) e as possíveis influências sobre os patossistemas, a longo prazo.

Palavras-chave: Doença de Cana-de-açúcar. Podridão abacaxi. Carvão. Biotecnologia. Mudanças Climáticas.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum sp.*) is an important grass cultivated in tropical and subtropical regions of the world, such as in Br, Ind, and Ch, and has its biomass being raw material for production of sugar, fuel ethanol, and some other derivatives. Fungal diseases infect sugarcane fields worldwide, damaging crops and thus, causing great economic losses. Fungal specialized structures act during all Pathogen-Host Relationship Cycle (PHRC) (survival, dissemination, infection, colonization, and reproduction of pathogen), maintaining fungal populations in cultivation soil, infecting plants in following crops and vegetative propagation of sugarcane by infected seeds may allow fungal transportation into regions where diseases haven't occurred before. Biotechnological methods and approaches have significantly contributed to understanding of the relationship among parasite and host, as to diseases management (control, detection, and prevention). Some techniques have daily applications in Agriculture, while others are only used in research and to breeding of host resistant varieties. Among notable diseases, smut (*Sporisorium scitamineum*) and pineapple disease (*Ceratocystis paradoxa*) are important because they cause damage and losses in sugarcane regions, although there are different periods for each one to occur. This work aims to review the PHRC for each pathosystem, the biotechnological methods and approaches and its perspectives in the study and management of these diseases. As environment is an important factor to the effectiveness of PHRC, one chapter is dedicated to Global Climate Change (GCC) and its possible influences over these diseases in a long-term period.

Key words: Sugarcane disease. Pineapple disease. Smut. Biotechnology. Climate Change.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – Diagrama com ciclos monocíclicos e policíclicos.....	20
Ilustração 2 – Chicote que surge em cana-de-açúcar infectada por <i>Sporisorium scitamineum</i> , causador do carvão.....	28
Ilustração 3 – Sintomas não usuais da infecção por carvão.....	29
Ilustração 4 – Paredes dos teliósporos de fungos de carvão por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	31
Ilustração 5 – Soros de fungos de carvão economicamente importantes.....	31
Ilustração 6 – Colônias in vitro de <i>S. scitamineum</i>	33
Ilustração 7 – Teliósporos de <i>S. scitamineum</i> e germinação.....	35
Ilustração 8 – Ciclo reprodutivo de <i>S. scitamineum</i>	37
Ilustração 9 – Organização genética de loci de mating-types de alguns Basidiomicetos.....	37
Ilustração 10 – Cana-de-açúcar com podridão abacaxi.....	46
Ilustração 11 – Conídios e clamidiósporos de <i>T. paradoxa</i> (anamorfia de <i>C. paradoxa</i>) causando podridões em palma.....	47
Ilustração 12 – Aleurioconídios com paredes espessas formados em cadeias e filoconídios de <i>T. paradoxa</i>	48
Ilustração 13 – Comunicação química entre a célula da planta e o patógeno.....	58
Ilustração 14 – Perfil de microssatélites para isolados de <i>U. scitamineum</i> de diversas regiões diferentes.....	65
Ilustração 15 – Resumo das principais influências decorrentes de mudanças na composição atmosférica, uso da terra e clima, sobre doenças de plantas.....	74
Ilustração 16 - Triângulo de doença.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de estruturas reprodutivas de fungos causadores de carvão.....	17
Tabela 2 – Modulação gênica após infecção por <i>S. scitamineum</i> , em variedades resistentes de cana-de-açúcar.....	62
Tabela 3 – Efeitos potenciais das mudanças climáticas sobre patossistemas, nas diferentes escalas biológicas.....	80
Tabela 4 – Causas e conseqüências das MCG para as principais doenças fúngicas de cana-de-açúcar no Brasil.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Introdução à cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>) e histórico de híbridos com enfoque nas doenças.....	11
1.2	Doenças fúngicas de cana-de-açúcar.....	13
1.3	Carvões.....	15
1.4	Podridões.....	18
1.5	Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro.....	18
1.6	Danos e perdas, detecção, diagnóstico e controle de doenças: definições.....	21
2	CARVÃO.....	24
2.1	Registros da doença no mundo (Histórico)	24
2.2	Danos e perdas.....	25
2.3	Detecção.....	26
2.4	Sintomas e Sinais.....	27
2.5	Caracterização do patógeno (etiologia)	30
2.6	Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro.....	33
2.6.1	<i>Sobrevivência do patógeno</i>	33
2.6.2	<i>Disseminação do patógeno</i>	34
2.6.3	<i>Infecção</i>	35
2.6.4	<i>Colonização</i>	35
2.6.5	<i>Reprodução e mecanismos genéticos de Mating-types e patogenicidade</i>	36
2.7	Controle.....	39
2.8	Diversidade de virulência do patógeno (variabilidade).....	42
3	PODRIDÃO-ABACAXI.....	43
3.1	Danos e perdas.....	43
3.2	Detecção.....	44
3.3	Sintomas e Sinais.....	45
3.4	Caracterização do patógeno (etiologia).....	46
3.5	Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro.....	48
3.5.1	<i>Sobrevivência do patógeno</i>	48

3.5.2	<i>Disseminação do patógeno</i>	49
3.5.3	<i>Infecção</i>	50
3.5.4	<i>Colonização</i>	51
3.5.5	<i>Reprodução</i>	52
3.6	Controle.....	52
4	BIOTECNOLOGIA.....	57
4.1	Biotecnologia e carvão.....	57
4.1.1	<i>Entendendo as respostas da planta e mecanismos de resistência</i>	57
4.1.2	<i>Aplicando os conhecimentos para entender a epidemiologia da doença e verificar a diversidade do patógeno</i>	63
4.1.3	<i>Aplicando os conhecimentos na detecção precoce da doença</i>	66
4.1.4	<i>Engenharia Genética: aplicando os conhecimentos para a defesa da plantação</i>	67
4.2	Biotecnologia e podridão-abacaxi.....	68
4.2.1	<i>Revisão de literatura</i>	68
4.2.2	<i>Possíveis aplicações biotecnológicas do patógeno</i>	70
5	MUDANÇAS CLIMÁTICAS GLOBAIS.....	72
5.1	Aspectos gerais das Mudanças Climáticas Globais.....	72
5.2	Fatores alterados pelas Mudanças Climáticas Globais.....	72
5.3	Mudanças Climáticas Globais e a ocorrência de doenças.....	73
5.4	Mudanças Climáticas Globais e métodos de avaliação.....	78
5.5	Mudanças Climáticas Globais e as doenças de cana-de-açúcar.....	79
5.6	Mudanças Climáticas Globais: carvão e podridão abacaxi.....	81
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução à cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e histórico de híbridos com enfoque nas doenças

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) constitui uma gramínea tropical da família Poaceae que atinge entre dois e quatro metros de altura e entre dois e meio e cinco centímetros de diâmetro. Tecidos, hastes ou toletes com alguns brotos constituem formas de propagação. O tecido sólido e não ramificado é constituído de nós e internós, espaçados entre 15 e 25 cm, e apresentando brotos com localização e morfologia de acordo com a variedade. Em geral, eles aparecem onde emergem as folhas, que se dispõem alternadamente em fileiras opostas, a partir da base dos nós. Uma casca grossa e encerada (proteção contra desidratação) cobre o tecido parenquimático, onde se localizam as fibras vasculares (rigidez e força). Neste tecido (parênquima), células com parede celular menos espessa que as demais reservam a sacarose (JAMES, 2004).

Muitos tecnólogos da cana-de-açúcar consideram a existência de seis espécies do gênero *Saccharum*: *S. spontaneum* e *S. robustum*, selvagens, que crescem na Ásia e Indonésia, *S. officinarum* que suportou a produção mundial de cana-de-açúcar por séculos, *S. barberi* e *S. sinense*, antigas raças da Ásia (IRVINE, 1999), que originaram clones do norte indiano e China, respectivamente (MENOSSI et al., 2008) e *S. edule*, cuja inflorescência pode ser comestível como verdura (IRVINE, 1999) e que, para alguns autores, não é considerada espécie de *Saccharum* (JAMES, 2004).

Como importante cultura das regiões tropicais e subtropicais, seu cultivo teve início ao redor de 2.500 anos a.C., na Índia (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005), que junto com a China, tornaram-se primeiros produtores comerciais de açúcar. A cultura de cana-de-açúcar foi introduzida ao Novo Mundo na época de seu descobrimento (1493) e sua importância mundial aumentou à medida que a demanda pelo produto final, o açúcar, aumentava (JAMES, 2004).

Um histórico do cultivo de cana-de-açúcar realizado por James (2004) mostra a importância das doenças que acometeram a cultura e que, ao longo de sua

história, instigaram o desenvolvimento de variedades resistentes. Algumas das primeiras variedades comerciais de cana-de-açúcar, a partir de *S. officinarum*, foram EK e SW11 (Java, Indonésia), Q813 (Austrália), HQ409 (Badilla), H109 (Havaí, EUA), D109, D145 e D625 (Guiana). A variedade comercial Otaheite (Bourbon ou Criola), também originada de *S. officinarum*, foi a base do desenvolvimento da indústria açucareira nas colônias espanholas e portuguesas no Novo Mundo e primeira cultivada em escala global. Ela foi altamente prejudicada no final do século XIX pelas espécies fúngicas *Pheacystostroma sacchari* (*Melanconium sacchari*) e *Glomerella tucumanensis* (*Colletotrichum falcatum*), causadores de “rind disease” e podridão vermelha, respectivamente. Após o colapso da variedade, Cheribon, também originada de *S. officinarum*, se destacou e tornou-se a principal na maioria dos países produtores de cana-de-açúcar nos séculos XIX e XX.

Embora *S. officinarum* tenha se destacado por muito tempo por seu conteúdo de açúcar, suas variedades eram limitadas em ambientes naturais e solos pobres, e eram suscetíveis a doenças importantes, como a causada pelo nematoide *Tylenchus similis*, mosaico e “Mal de Sereh” (vírus). O vírus do mosaico, por exemplo, ocasionou dano de 200.000 toneladas para 47.000 toneladas/ ano, na produção de cana-de-açúcar em Louisiana (EUA), em 1920. Portanto, a partir do início do século XX, muitos países tornaram-se dependentes de híbridos resistentes: em Louisiana, na época do surto acima, a introdução de híbridos resistentes recuperou rapidamente a produção; no Havaí, a partir de 1940, híbridos locais já predominavam nas áreas de cultivo (H32-8560); Guiana, Barbados (Caribe) e Jamaica, a partir dos anos 1940, também se tornaram dependentes de híbridos resistentes (JAMES, 2004), forma de manejo que permanece até os dias atuais, em todas as regiões de cultivo.

Atualmente, diversas doenças atingem a cultura de cana-de-açúcar. Uma revisão de microrganismos associados à cana-de-açúcar apresenta principais patógenos fúngicos e bacterianos. Os gêneros de bactérias são *Acidovorax*, *Herbaspirillum*, *Leifsonia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*; entre os fungos, são conhecidos 45 gêneros causando doenças em cana-de-açúcar, em todo o mundo (MEHNAZ, 2013).

Na Índia, maior produtor mundial de açúcar a partir da cultura (2012), entre 10-15% da produção é afetada pelo fator doenças, sendo registradas mais de 55 (fúngicas, bacterianas, virais, por fitoplasmas e nematoides) para a cana-de-açúcar cultivada no país (VISWANATHAN; RAO, 2011). Neste país, mais de 60 doenças em cana-de-açúcar haviam sido registradas até 1975. Doenças importantes no país são podridão-vermelha, murcha, carvão e podridão abacaxi (fúngicas), escaldadura-das-folhas e raquitismo-da-soqueira (bacterianas), “grassy shoot” (micoplasma) e mosaico (vírus) (AGNIHOTRI, 1996).

Na China, há pelo menos 39 doenças reportadas para a cana, sendo elas fúngicas (maioria), bacterianas ou virais. Na Tailândia, pelo menos 60 doenças foram registradas para a cultura (HUANG, 2004).

Na África do Sul, algumas doenças já registradas são carvão, ferrugem, podridão-vermelha (fúngicas), escaldadura-das-folhas, raquitismo-das-soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp *xyli*) (bacterianas), mosaico (vírus) (BAILEY; BECHET; TUCKER, 1994).

No Brasil, destacam-se doenças causadas por fungos, tais como *Puccinia melanocephala*, *Sporisorium scitamineum*, *Mycovellosiella koepkei*, bactérias, destacando-se *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (raquitismo das soqueiras), *Xanthomonas albilineans* (escaldadura das folhas) e vírus (do mosaico, do amarelecimento foliar) também têm ocorrências registradas no país (DOS SANTOS; DE ALMEIDA; GONÇALVES, 2008).

1.2 Doenças fúngicas de cana-de-açúcar

Os fungos são heterotróficos, crescendo rapidamente nas superfícies em que penetram. A capacidade de viver na ausência de luz, o alto potencial de absorção de água e utilização de vários substratos como fonte de carbono, devido à liberação de enzimas extracelulares, são algumas das características que favorecem o parasitismo de plantas por diversos gêneros de fungos. Em especial, grande parte dos patógenos de plantas são, ainda, bastante versáteis na obtenção de alimentos, podendo ser biotróficos e saprófitos ao mesmo tempo, o que lhes permite sobreviver no ambiente embora o hospedeiro não esteja vivo (saprófitos facultativos). Há ainda

os necrotróficos (matam o hospedeiro e se alimentam da matéria orgânica restante), biotróficos, ou parasitas obrigatórios (vivem ou se reproduzem necessariamente no hospedeiro vivo) e semibiotróficos (alternando gerações biotróficas e necrotróficas).

Os sintomas na planta decorrentes da infecção por fungos dependem do órgão ou tecido infectado e o sistema de obtenção de nutrientes; em geral, destacam-se as necroses, murchas, hipertrofias, hiperplasias, e etiolações, abscessões, além de substituição do tecido do hospedeiro e míldio (GOULD, 2008). Fungos possuem, ainda, dois tipos de estruturas, as assimilativas e as reprodutivas. Entre as assimilativas, a absorção de água e nutrientes é realizada por hifas especializadas. Haustórios (absorção de nutrientes a partir do citoplasma da célula do hospedeiro), apressórios (aderência à superfície do hospedeiro) e escleródios (massa de hifas de consistência firme, que abriga ou origina estruturas reprodutivas) são outras importantes estruturas assimilativas em fungos fitopatogênicos. As reprodutivas são representadas por esporos, que podem ser sexuais ou assexuais; além de servir como propágulo, estas estruturas podem ser responsáveis pela dispersão e sobrevivência (clamidósporos, oósporos e zigósporos) do patógeno (MASSOLA Jr.; KRUGNER, 2011).

Exemplos de doenças fúngicas que infectam a cana-de-açúcar são: carvão (*Sporisorium scitamineum*, anteriormente denominado *Ustilago scitaminea*), ferrugem da cana (*Puccinia melanocephala*), podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*), podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum*), Pokkah boeng (*Gibberella fujikuroi*), entre outras (BAILEY, 2004). Na Índia, doenças fúngicas representam 74% (INDIAN MINISTRY OF AGRICULTURE..., 2011), na China 69% (HUANG, 2004). Em Cuba, por exemplo, onde a cultura é de importância muito significativa, doenças de fungos acarretam cerca de 40% de danos sobre o total da produção (SANTIAGO et al., 2012).

No Brasil, pelo menos catorze doenças fúngicas de cana-de-açúcar são registradas: ferrugem (*Puccinia melanocephala*), registrada em todas as regiões de cultivo do país; carvão (*S. scitamineum*), a ser detalhado no presente trabalho; mancha amarela (*Mycovellosiella koepkei*), predominante em áreas com maior índice de precipitações (como na Amazônia); mancha ocular (*Bipolaris sacchari*), de ocorrência em pequena escala e com maior importância nos canaviais do sul, por

ser favorecida por invernos chuvosos e úmidos; mancha parda (*Cercospora longipes*), que causa poucos problemas e cujo patógeno ainda não é bem estudado; podridão de fusarium (*Fusarium moniliforme*), associada com injúrias físicas, químicas ou biológicas (brocas, por exemplo); Pokkah-Boeng (*Fusarium subglutinans*) e; podridão-abacaxi (*C. paradoxa*) (DOS SANTOS, 2008). Ferrugem alaranjada (*P. kuehni*) foi recentemente reportada como ocorrendo no Estado de São Paulo (BARBASSO et al., 2010), e é considerada atualmente uma das doenças mais temidas do país, neste setor.

Além destas, também têm sido registrados no Brasil: podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum*), de significativa importância, devido à inversão de sacarose que ocorre na planta infectada, e pelas grandes perdas registradas (50 a 70%) quando o ataque pelo fungo é realizado em conjunto com brocas; podridão das raízes (complexos de *Pythium spp.*), principalmente em solos argilosos passíveis de encharcamento do Rio de Janeiro, Pernambuco e Alagoas, e; podridão de Marasmius (*Marasmius sacchari*), de ocorrência esporádica no Estado de Pernambuco, mas considerada secundária, pelas condições restritas (solos ácidos) e baixa frequência de ocorrência. Embora de ocorrência global (em mais de 80 países) e em todo Brasil, mancha anelar (*Leptosphaeria sacchari*) tem pouca importância econômica, sendo somente necessário eliminar variedades muito suscetíveis durante o programa de melhoramento (TOKESHI; RAGO, 2005).

1.3 Carvões

Em geral, carvões se caracterizam pelo surgimento de massas pulverulentas escuras (soros) na parte aérea das plantas, constituídas por estruturas reprodutivas do patógeno, tornando as doenças identificáveis não tanto pelos sintomas, mas pelos sinais presentes na planta doente. A maior frequência de ocorrência de carvão é em grãos ou sementes, já que o patógeno invade o ovário das plantas; no entanto, em outros casos, os soros podem ser formados nas hastes, folhas ou componentes florais do hospedeiro (BEDENDO, 2011), como para a cana-de-açúcar.

Os fungos causadores de carvão são basidiomicetos, constituindo cerca de 1100 espécies que infectam plantas pertencentes a mais de 75 famílias botânicas.

Existe uma especificidade planta-patógeno, chegando a ocorrer raças fisiológicas do patógeno (BEDENDO, 2011).

A classe Ustilaginomicetes é composta por fungos geralmente parasitas de Angiospermas, particularmente ciperáceas e gramíneas, de presença global, e infectam importantes culturas, como cevada, milho, trigo, aveia e cana-de-açúcar. A morfologia destes fungos é simples, caracterizados pela presença de estruturas de reprodução denominadas teliósporos, micélios intercelulares e soros (maioria dos táxons), cuja massa de teliósporos permanece no interior até amadurecimento e dispersão. Os teliósporos são geralmente unicelulares, possuem paredes escuras e espessas, cujo tamanho pode variar entre 3,5 e 50 μm de diâmetro (TRIGIANO, 2008). Como corpos de frutificação (basidiomas) não ocorrem nos fungos de carvão, os esporídios (ou basidiósporos, esporos sexuais que em outros Basidiomicetos se formam exogenamente no basídio) são formados a partir dos teliósporos, quando originam um tubo germinativo denominado pró-micélio, que então dá origem aos esporídios haploides (BEDENDO, 2011).

As espécies do gênero *Ustilago* são igualmente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (MUELLER; FOSTER; BILLS, 2004) e apresentam algumas características únicas, como a presença de soros sem columelas ou perídios, de coloração marrom, cujas paredes são compostas por endósporos elétron-transparentes e exósporos elétron-densos, o último podendo ser liso ou com protuberâncias; grânulos podem estar presentes nas superfícies do esporo, entre e abaixo destas protuberâncias. Todas as espécies do gênero restringem-se aos hospedeiros da família Poaceae. Espécies de importância econômica na Fitopatologia são *U. maydis* (causador de carvão em milho), *U. esculenta* (patógeno de *Zizania latifolia*) (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002), entre outros.

O gênero *Sporisorium* também inclui causadores de carvão em Poaceae, com soros incluindo uma, várias ou numerosas columelas e perídios, formados pelo tecido do hospedeiro e células do fungo estéreis. Columelas correspondem a uma ou várias fibras vasculares do hospedeiro, com tecido parenquimático adjacente. Geralmente há hipertrofia do tecido do hospedeiro envolvido com perídios e

columelas. Teliósporos de *Ustilago* são muito semelhantes aos de *Sporisorium*, com grânulos entre e abaixo de protuberâncias e cristas (BEDENDO, 2011).

No caso dos carvões, como um fator evolutivo do parasita, sintomas tornam-se visíveis após longo tempo da infecção. Em cereais, o patógeno se desenvolve às custas da planta desde a germinação, mas os sintomas e danos somente aparecem quando há produção de sementes (formação de grãos). Dois tipos de esporos são produzidos durante o ciclo vital do fungo: esporídios (basidiósporos) e teliósporos (BEDENDO, 2011). Em *S. scitamineum*, tanto a produção de teliósporos como de esporídios ocorrem, durante o ciclo de relações patógeno-hospedeiro e serão descritos detalhadamente mais a frente. A tabela 1 mostra características gerais de teliósporos e esporídios.

Tabela 1 - Características de estruturas reprodutivas de fungos causadores de carvão.

Teliósporos	Esporídios (basidiósporos)
Unicelulares	Ovalados
Esféricos	Unicelulares
Binucleados	Uninucleados
Superfície lisa ou ornamentada	Hialino
Desenvolvimento no interior de grãos ou meristemas modificados (como na cana)	Sem ornamentações

Fonte: (BEDENDO, 2011).

Os sintomas e sinais de carvão são diferentes de acordo com o hospedeiro. No trigo e aveia, por exemplo, massas escuras de teliósporos substituem os grãos, no período de formação de espigas e panículas. No milho, bolhas preenchidas por teliósporos substituem os grãos, que muitas vezes apresentam tamanho maior que os mesmos. Em cebola, o carvão acarreta o “damping-off” da plântula, altamente suscetível à doença (tecidos jovens). Em cana-de-açúcar, carvão (*S. scitamineum*) causa modificações no meristema apical, que passa a formar um apêndice em forma de chicote (soro) cheio de teliósporos. Outros sintomas gerais podem ser o subdesenvolvimento, perfilhamento (brotamento) excessivo e, raramente, a morte do hospedeiro (BEDENDO, 2011).

1.4 Podridões

Podridões são doenças nas quais os órgãos de armazenamento da planta são destruídos, tais como sementes, frutos e órgãos de reserva. Nas podridões secas (ou duras), os tecidos afetados perdem água e são mumificados; nas podridões aquosas (ou moles), há decomposição de órgãos suculentos, como frutos, tubérculos e raízes (BEDENDO, 2011).

Podridões são causadas por fungos ou bactérias, capazes de destruir a parede celular vegetal. Tecidos que morrem e se decompõem tornam-se geralmente com coloração marrom (SHARMA, 2006).

Em qualquer momento, desde o campo até o estoque, bactérias ou fungos causadores de podridão (geralmente saprófitos) podem infectar a planta. Ferimentos produzidos durante o manuseio (como a colheita mecânica) ou por insetos podem favorecer a entrada do patógeno, geralmente favorecido por altas temperaturas (20 – 30°C) e umidade relativa (BEDENDO, 2011).

Espécies de *Ceratocystis* constituem importantes fitopatógenos e estão presentes em um grupo de fungos denominados “Ophiostomatoid”, os quais são geralmente adaptados para realizar dispersão por insetos (WITTHUHN et al., 1999).

No Brasil, uma espécie importante do gênero é *C. fimbriata*, que causa doença em uma grande diversidade de hospedeiros, tais como manga, eucalipto, figo, inhame, batata doce, entre outros (FERREIRA et al., 2010). Fora do país, *C. coerulescens* é outro exemplo de patógeno do gênero, que causa mancha de Bome em abeto e pinheiro. Há outras espécies mais agressivas, como *C. fagacearum*, causadora de murcha em carvalho (WITTHUHN et al., 1999).

1.5 Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro

O CRPH constitui cinco etapas: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução, estabelecidas quando há interações compatíveis entre patógeno e hospedeiro.

A sobrevivência é a fase de perpetuação do patógeno em situações adversas, tais como a ausência do hospedeiro ou condições climáticas desfavoráveis. Por

exemplo, os patógenos de plantas anuais, onde plantas morrem no final do ciclo, estão sujeitos a passar grande período de tempo na ausência do tecido suscetível. Entre as estratégias de sobrevivência, podem ser consideradas: estruturas especializadas de resistência, atividades saprofíticas, plantas hospedeiras e vetores (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

O incremento da doença em um campo de cultivo, em escala temporal ou espacial, consiste na disseminação do patógeno. As fases da disseminação constituem a liberação, remoção do patógeno de onde foi produzido; a dispersão, que corresponde ao processo de transporte de onde foi produzido até onde foi depositado, e; a deposição, o assentamento do patógeno em uma determinada superfície. O vento, a água da chuva ou de irrigação, insetos, podem constituir agentes de disseminação (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

O processo de infecção consiste no período desde a germinação do patógeno até a penetração e o estabelecimento de relações parasitárias estáveis, entre patógeno e hospedeiro. Antes da infecção ocorre a pré-penetração, caracterizada pelos movimentos do patógeno em direção ao hospedeiro, seguida da penetração na superfície da planta, por aberturas naturais ou ferimentos (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

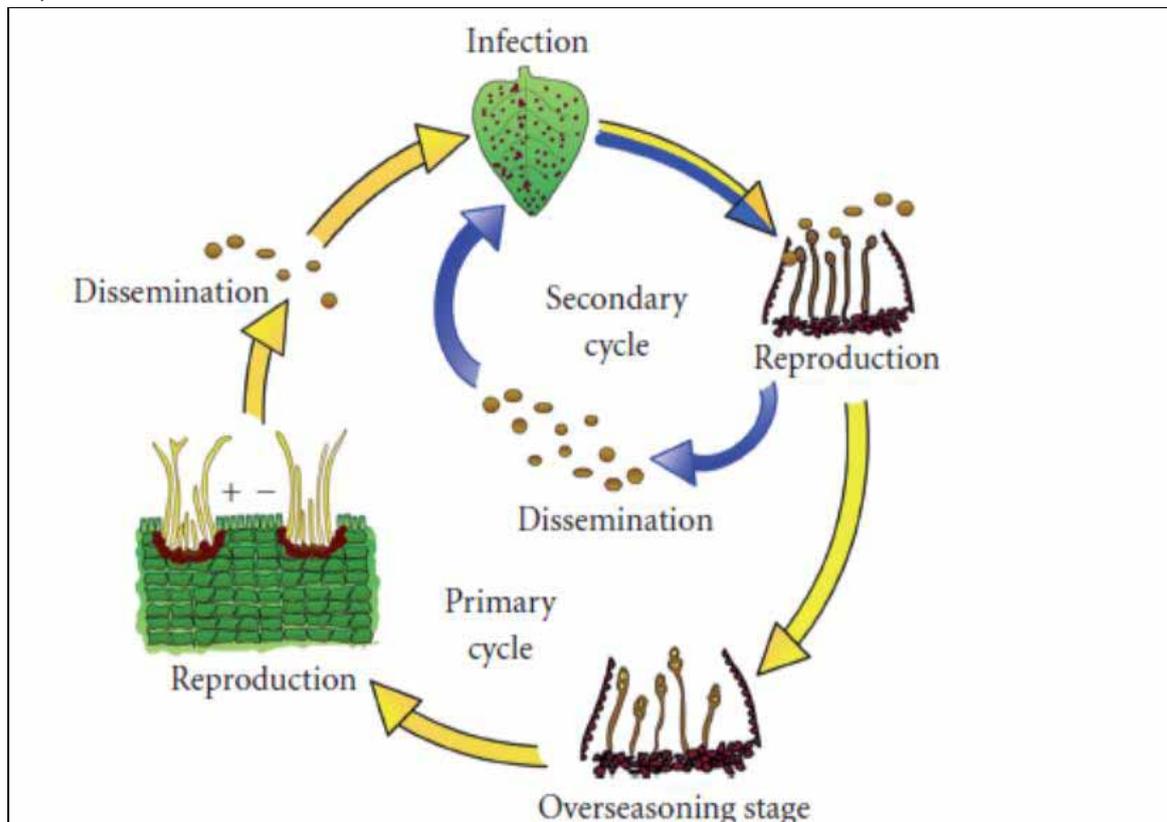
A colonização se inicia após infecção e é caracterizada pela interferência do patógeno sobre a fisiologia do hospedeiro, momento de espalhamento, com maior ou menor extensão, a partir do ponto de infecção (infecção generalizada); sintomas podem se exteriorizar em decorrência das mudanças fisiológicas. Após ou durante a colonização do hospedeiro, o patógeno deve se reproduzir para garantir a perpetuação da espécie, gerando estruturas que permitem a disseminação e infecção de novas plantas (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

A reprodução constitui a última fase do CRPH, constitui na produção de inóculo, podendo ocorrer dentro ou na superfície do hospedeiro, sendo a posição do inóculo estratégica para sua disseminação, transportado pelo vento, água, etc. Esporos podem ficar também em restos culturais no solo, que representa fonte de inóculo para o ciclo seguinte da cultura (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

Há diferentes ciclos de vida para um fitopatógeno. Nas doenças monocíclicas, o fungo produz esporos no final da estação, que servem de primeiro e único inóculo

ao ano seguinte. O inóculo primário infecta a planta durante a estação de crescimento e, no final desta fase, produz novos esporos no tecido infectado. Estes esporos permanecem no solo e correspondem ao inóculo primário da próxima estação. Nos patógenos policíclicos, o inóculo primário geralmente consiste no esporo sexual (perfeito, teleomórfico), ou então quando o fungo não possui este estágio, outras estruturas como escleródios, pseudoscleródios ou micélio no tecido infectado. Este inóculo causa a infecção primária, e então grande número de esporos assexuados (inóculo secundário) são produzidos em cada sítio de infecção e estes causam nova (secundário) infecção que produzem mais esporos assexuados, para novas infecções (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010). A figura 1 apresenta os possíveis ciclos de vida apresentados por um fitopatógeno.

Figura 1 – Diagrama com ciclos monocíclicos (amarelo) e policíclicos (amarelo e azul).



Fonte: (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010).

Interações entre patógeno e planta durante o CRPH são complexas, sendo divididas em interações (i) compatíveis, na qual a planta não está apta a responder com defesa anti-infecciosa e permite que o patógeno complete seu ciclo de vida e (ii) incompatíveis, na qual a planta encadeia uma série de respostas de defesa contra a interação patogênica, prevenindo o crescimento do patógeno na planta (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000 apud LODHA; BASAK, 2012). No presente trabalho, o detalhamento dos CRPHs entre *Sporisorium scitamineum* (carvão) ou *Ceratocystis paradoxa* (podridão abacaxi) e cana-de-açúcar, leva em conta a ocorrência de interações compatíveis. No entanto, o entendimento das interações incompatíveis é também de interesse da Biotecnologia, e também serão abordadas no presente trabalho (por exemplo, a expressão de genes de resistência ocorre tornando a interação incompatível). O melhoramento genético visa o desenvolvimento de variedades que tornam incompatível a interação planta-patógeno.

1.6 Danos e perdas, detecção, diagnóstico e controle de doenças: definições

Em geral, danos dizem respeito às reduções na quantidade e qualidade da produção; perdas, no entanto, às reduções do retorno financeiro por unidade de área cultivada (AMORIM; BERGAMIN, 2011). Diversos fatores são determinantes na quantidade e tipo de perdas ocorridas, tais como o ambiente, as práticas de controle utilizadas, qual a cultura e também o produto gerado a partir dela (AGRIOS, 2005)

O controle de uma doença é considerado bem sucedido quando a quantidade de sintomas for insuficiente para causar redução da produção ou danos. No contexto da produtividade, o controle da doença não pode ser abordado separadamente, mas integrado com vários outros fatores que compõem a equação da produção. Adubação, tratamentos culturais, plantas daninhas e pragas, devem ser também levados em consideração quando se discute controle (KIMATI; FILHO; AMORIM, 2011).

São vários os métodos de controle de uma doença, classificados em regulatório (exclusão do patógeno do hospedeiro ou de determinada área), cultural (evita o contato da planta com o patógeno), biológico (aplicação de microrganismo antagonista ao patógeno), físico e químico. Estes dois últimos com intenção de evitar

o contato da planta com o patógeno, já presente, ou curar a planta infectada (AGRIOS, 2005).

Há, ainda, uma outra classificação (visão) de controle de doenças, aquelas que envolvem os princípios de Whetzel. Desta forma, métodos de controle são divididos de acordo com quatro princípios biológicos gerais: exclusão (impedir entrada do patógeno em área não infectada); erradicação (eliminar patógeno da área); proteção (colocar barreira protetora entre patógeno e hospedeiro, em suas partes suscetíveis); imunização (desenvolvimento de plantas imunes ou resistentes); o termo terapia (mais recente) visa restabelecer a sanidade de uma planta já infectada. Os princípios acima estão associados com as fases do CRPH, sendo que “exclusão” infere na fase de disseminação, “erradicação” na sobrevivência do patógeno, “proteção” na deposição do inóculo e pré-penetração (antes de infecção), “imunização” na infecção e colonização e “terapia” na pós-infecção (colonização) (KIMATI; FILHO; AMORIM, 2011).

Além dos princípios de Whetzel, o de “regulação” é geralmente associado a medidas de controle baseadas em modificações do ambiente (temperatura, umidade, luminosidade, propriedades do solo e composição do ar, etc.), já que estas condições não se encaixam nos princípios acima (KIMATI; FILHO; AMORIM, 2011).

Outro princípio de controle, também não ajustável aos de Whetzel, é “evasão”, que considera escolha da área geográfica, local e época de plantio, profundidade de semeadura, precocidade das variedades, etc. (KIMATI; FILHO; AMORIM, 2011). A Engenharia Genética (modificação genética de plantas) será discutida no capítulo de Biotecnologia, mas alguns autores consideram a transgenia (modificação genética na planta para conferir resistência ao patógeno) como um novo método de controle biológico (AGRIOS, 2005).

O diagnóstico de doenças de plantas consiste na detecção e identificação do patógeno rapidamente. A quantificação do patógeno no campo, a determinação da eficiência dos métodos de controle aplicados, o correto manejo de sementes, mudas, toletes (cana), etc., quantificação de perdas e incidência da doença em questão, determinação da extensão de infecção pelo patógeno no campo, são alguns dos requisitos para a obtenção de um diagnóstico correto e completo de determinada doença. São vários os métodos de detecção citados na literatura.

Alguns autores dividem em técnicas moleculares e não-moleculares, de diagnóstico (NARAYANASAMY, 2002). Neste trabalho, os métodos imunológicos serão considerados como não moleculares, visto que o capítulo de Biotecnologia considera as técnicas de Biologia Molecular após desenvolvimento da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

2 CARVÃO

2.1 Registros da doença no mundo (Histórico)

Em geral, carvão implica em mais danos em regiões tropicais que em subtropicais (AGNIHOTRI, 1996). No entanto, é registrada ocorrência da doença também em condições de clima subtropical, como em Louisiana (HOY et al., 1993).

A ocorrência de carvão é relativamente recente para a história do cultivo de cana-de-açúcar, mas já foi registrada em quase todas as regiões em que ela é cultivada. O carvão foi primeiramente registrado na África Sul, em 1877 (THOKOANE; RUTHERFORD, 2001), espalhando-se pelo Oriente, onde foi registrado na China em 1932 (SHEN et al., 2012). Antes dos anos 1940, já havia sido detectada também no leste africano, em Zimbábue, Moçambique e Mascarenas (Madagascar, Mauritius e Reunión), sendo reportado no Quênia somente em 1956 (NZIOKI et al., 2010). Foi primeiramente reportada nas Américas em Tucumán, na Argentina, em 1940, no Paraguai em 1944 (RABOIN et al., 2007) e no Brasil em 1946 (RAGO; CASAGRANDE; JUNIOR, 2009). A Bolívia foi também “atingida” nesta época (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983). Na Venezuela, porém, o carvão foi somente reportado em 1978, no Estado de Carabobo (ORDOSGOITTI; GONZÁLEZ; APONTE, 1984).

No oeste africano, a doença foi reportada tardiamente, somente em 1969 (Tchad), de lá plantas contaminadas foram provavelmente enviadas a Burkina Faso, causando nova epidemia; em 1972 e 1973, outros países africanos (Mali, Ivory Coast e Nigéria) foram atingidos (RABOIN et al., 2007). O Havaí teve ocorrência da doença registrada em 1971 (SCHENCK, 2003), a Guiana em 1974 (RABOIN et al., 2007). A partir deste país, nas ilhas caribenhas, na América Central e nas regiões continentais dos Estados Unidos, como o Texas, houve registros da doença, em 1981 (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

Na Indonésia, a doença foi detectada somente em 1979, após 50 anos de produção de cana-de-açúcar (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004). Na Oceania, a Austrália apresentou a doença recentemente, em 1998. Papua Nova Guiné,

provavelmente a origem de *S. officinarum*, e Ilhas Fiji, estão livres da doença (SHEN et al., 2012).

2.2 Danos e perdas

No Brasil, em 1946, carvão causou epidemias nas variedades POJ36 e POJ213, em Assis, São Paulo. Os principais danos posteriores causados pela doença foram sobre a variedade NA56-79, cultivada no Estado de São Paulo nos anos 1980, cujo agravante foi que o cultivo de cana utilizava quase unicamente esta variedade (cerca de 80% nas áreas comerciais) (RAGO, 2009), assim, mais de 60% da área de cultivo no Estado foi comprometida (MARQUES et al., 2008). Recentemente, o carvão tem acometido também áreas endêmicas no Estado do Alagoas, no nordeste brasileiro (SILVA et al., 2005). Variedades consideradas resistentes vêm sendo infectadas por *S. scitamineum*, no Estado de São Paulo, logo após lançamento, sugerindo falha no processo de seleção destas variedades, ou então alta variabilidade do patógeno nestas regiões (RAGO; CASAGRANDE; JUNIOR, 2009).

Na Índia, regiões de Maharashtra e Karnataka já foram bastante afetadas pela doença e mesmo após implementação de variedades resistentes o país continua apresentando dificuldades para lidar com o carvão (VISWANATHAN; RAO, 2011). Tamil Nadu é outro estado indiano citado na literatura como de ocorrência da doença. Na China, a doença acarreta problemas em todas as regiões de cultivo (HUANG, 2004).

No Estado do Havaí, embora houvesse cultivares resistentes de cana-de-açúcar, a variedade mais resistente ao carvão (H50-7209) foi largamente afetada em 1976, devido ao surgimento de nova raça. Em 2001, houve novo surto da doença; a variedade H78-7750, até o momento resistente à doença (raça Oahu do patógeno), tornou-se suscetível devido ao surgimento de outra raça (Maui) (SCHENCK, 2003).

No Leste africano, o Quênia apresenta problemas com a doença. Em 2006, na região de Kibos, entre 21-38% das variedades comerciais em condições de campo tiveram a produção afetada (NZIOKI et al., 2010). No oeste do continente, áreas

endêmicas de ocorrência da doença foram registradas na Nigéria (WADA et al., 1999).

Na Indonésia, proporções epidêmicas na maior parte do país foram alcançadas em 1997 (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004).

Na Austrália, o carvão foi inicialmente detectado somente em pequena área de produção, na região Oeste do país, provavelmente a partir de esporos pelo vento, a partir da Indonésia (SUNDAR et al., 2012). Posteriormente, distritos de Queensland e New South Wales foram atingidos, até 2011 (CROFT; THOMPSON; MAGAREY, 2011).

Países como Guiana, Irã e Japão são outros nos quais a cultura de cana-de-açúcar é acometida pela doença (SINHA; SINGH; MISRA, 1982). No Japão, por exemplo, tem sido uma grande preocupação o desenvolvimento de variedades resistentes à doença (MATSUOKA, 2006).

2.3 Detecção

O diagnóstico convencional de carvão é restrito ao aparecimento de soros, em forma de chicotes. Pode-se também verificar pequenos chicotes ao dissecar folhas de cana-de-açúcar infectada, os quais identificam a doença (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983). O surgimento tardio de sintomas na planta dificulta a detecção precoce da doença.

Métodos convencionais envolvendo microscopia e técnicas de coloração histológica são utilizados na identificação de fitopatógenos, e estas técnicas para carvão em cana-de-açúcar foram revisadas recentemente (SUNDAR et al., 2012). Sinha, Singh e Misra (1982) utilizaram um método de detecção de hifas de *S. scitamineum* em brotos de cana-de-açúcar utilizando coloração histológica com azul tripan, podendo ser observado em microscopia óptica. Devido à velocidade de análise (quatro horas), há sugestões que o método possa ser especialmente útil durante quarentena (melhor explicado em controle) e também por agências de certificação de mudas.

A serologia contribui há muito tempo para a detecção e identificação de patógenos de plantas, sendo o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) uma

técnica amplamente estudada e revisada (CLARK, 1981). O método imunológico ELISA já foi avaliado para detectar carvão (*S. scitamineum*) em cana-de-açúcar (variedades suscetíveis na Índia: Co1287 e Co740). Standard Direct ELISA (DAS ELISA) (enzima penicilase conjugada, com penilina G como substrato), utilizando extrato da cana-de-açúcar infectada como antígeno, e Indirect ELISA (DAC ELISA) com uso da enzima fosfatase alcalina, “anti-goat anti-rabbit globulin”, para detectar a colonização de *S. scitamineum* na planta foram também métodos utilizados. Os testes mostraram que também é possível quantificar a colonização do patógeno utilizando ELISA. Embora tanto teliósporos como micélios dicarióticos do fungo apresentem o mesmo antígeno, testes mostraram não ser tão sensíveis na detecção do patógeno. Há sugestões ainda de que, como a hifa dicariótica está mais relacionada com a infecção e os teliósporos não são capazes de invadir a planta, a primeira pode apresentar maior especificidade e sensibilidade em testes imunológicos (PADMANABAN; MOHANRAJ, 1999). Outros testes de ELISA indireto já foram realizados para detecção de carvão em cana (NALLATHAMBI; PADMANABAN; MOHANRAJ, 2001, apud SUNDAR et al., 2012).

Técnicas de imunofluorescência indireta foram otimizadas, também para diagnóstico eficiente da doença (ACEVEDO; PINON, 1996, apud SUNDAR et al., 2012).

2.4 Sintomas e Sinais

Tecidos infectados desenvolvem um soro apical em forma de chicote (figura 2), que substitui a inflorescência e é caracterizado por um tecido fino e com menor conteúdo de açúcar (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002); ele pode ser longo, curto, fechado, torcido, podendo a planta até mesmo apresentar múltiplos destes chicotes (SUNDAR et al., 2012). Em alguns casos, dez dias antes da emergência destas estruturas, as folhas tornam-se rígidas e eretas, com internós superiores da planta tornando-se mais compridos (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983). Após cerca de dois meses de desenvolvimento dos micélios do patógeno, estas estruturas (chicotes) podem chegar até cerca de 70 centímetros (WADA et al., 1999), em alguns casos 1,5 metros (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983),

podendo tornar as folhas da planta pequenas e estreitadas, as quais adquirem aspecto herbáceo (LEGAZ et al., 1998, WADA et al., 1999). Após três a quatro semanas de infecção, pode haver retardo no desenvolvimento das folhas e amarelamento, em variedades altamente suscetíveis (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983). A haste torna-se tênue, apresentando dificuldades para atingir um tamanho normal (WADA et al., 1999). Estames e inflorescências modificadas também podem caracterizar a doença (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

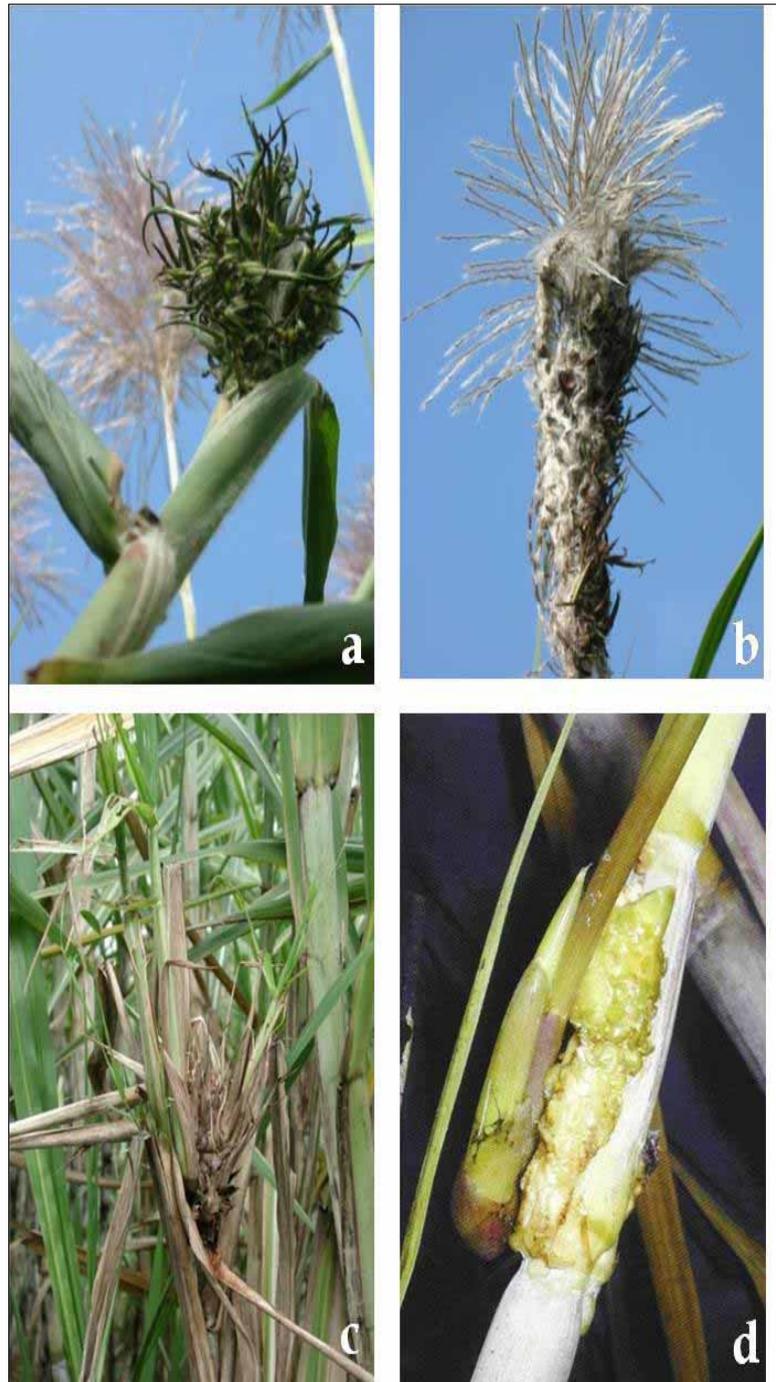
Figura 2 – Chicote (internamente ao retângulo vermelho) que surge em cana-de-açúcar infectada por *Sporisorium scitamineum*, causador do carvão.



Fonte: (elaborado pelo autor).

Sintomas não usuais podem, ainda, ser detectados na planta (figura 3).

Figura 3 – Sintomas não usuais da infecção por carvão. a) Deformidade apical; b) Infecção floral; c) má formação de fuso mitótico; d) Proliferação de brotos (ou brotamento anormal).



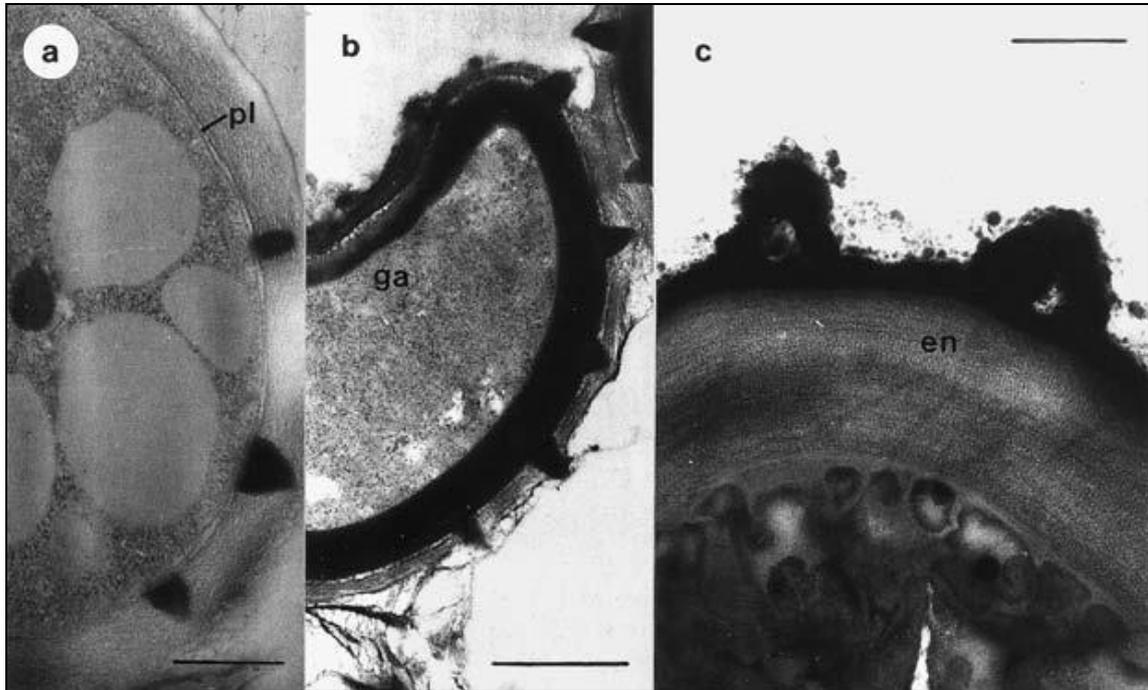
Fonte: (SUNDAR et al., 2012).

2.5 Caracterização do patógeno (etiologia)

Inicialmente, o patógeno de carvão de cana-de-açúcar foi classificado como *Ustilago sacchari*, posteriormente como *Ustilago scitaminea* (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983) e atualmente classificado como *Sporisorium scitamineum* (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002). Embora a abordagem de técnicas de Biologia Molecular deveria ser feita no capítulo de Biotecnologia, não é possível trabalhar atualmente com taxonomia de microorganismos sem a utilização das mesmas. Fatores como a plasticidade fenotípica e genética, e também devido à presença de táxons crípticos (como ocorre em *C. paradoxa*, agente causal de podridão abacaxi), exigem o uso da microgenômica (uso de pequenos segmentos do genoma para diagnosticar diversidade de vida) utilizando “barcodes” (“códigos de barras”) (HEBERT et al., 2003).

Piepenbring, Stoll e Oberwinkler (2002) realizaram observações macromorfológica e anatômicas para *Ustilago esculenta* (patógeno de arroz selvagem), *U. maydis* (patógeno de milho) e *S. scitamineum* (até então *U. scitaminea*), além de analisar ultraestrutura de seus teliosporos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), complementado por análises filogenéticas entre estas e outras espécies de *Sporisorium* e *Ustilago*, utilizando a região 5' da LSU do gene de rRNA (iniciadores LR0R e LR6). A partir de então, a classificação do patógeno de carvão em cana-de-açúcar passou de *U. scitaminea* para o gênero *Sporisorium*, tornando-se *S. scitamineum*. Detalhes dos teliosporos de *S. scitamineum* apresentados pelo autor, comparando-os com esporos e estrutura dos soros de carvão em milho (*U. maydis*), *U. esculenta* (arroz selvagem) e *S. scitamineum* em cana-de-açúcar estão nas figura 4 e figura 5 (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002).

Figura 4 – Paredes dos teliósporos de fungos de carvão por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). a e b) *S. scitamineum*; c) Teliósporos maduros de *Ustilago maydis*.



Fonte: (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002).

Figura 5 – Soros de fungos de carvão economicamente importantes. a-c) *Ustilago maydis* em *Zea mays*; d) *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar; e-f) *Ustilago esculenta* em *Yenia esculenta*.



Fonte: (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002).

Após determinação de *S. scitamineum* (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002), outra análise filogenética foi utilizada utilizando espécies de Ustilaginales (*Ustilago* e *Sporisorium*) (STOLL et al., 2003). A região ITS foi utilizada no estudo, por apresentar maior resolução em nível de espécie e subespécie, em relação à anteriormente (PIEPENBRING; STOLL; OBERWINKLER, 2002). O estudo confirmou a posição taxonômica atual do patógeno. Recentemente, esta região ITS (“Internal Transcribed Spacer”) foi sugerida como “barcode” para fungos (SCHOCH et al., 2012)

S. scitamineum é um parasita biotrófico obrigatório (tecidos do hospedeiro são mantidos vivos e nutrientes são retirados) (RUTHERFORD et al., 2002). As características “in vitro” apresentadas por *S. scitamineum* são teliósporos que germinam em temperatura de 30°C ou acima disso, em meio rico (Czapek-Dox), condições típicas do gênero *Ustilago*. Geralmente um prómicélio se desenvolve, o qual se divide dando origem a células (três ou quatro), que por brotamento dão origem a esporídios ovais (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983), com cerca de 2x6 µm. À medida que o meio de cultivo se torna mais pobre e com temperaturas menores, a germinação dos teliósporos tende a produzir hifas longas e septadas. A fusão entre hifas e esporídios (n) ocorre e a hifa dicariótica (2n) é produzida (esta fase é capaz de infectar a planta). Eventualmente, um esporídio gigante é produzido em baixas temperatura e alta concentração de sacarose. Colônias miceliais são evidentes entre 48 e 72 horas, em nutriente ou água com ágar (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

Dois tipos de colônias são observados quando se isola *S. scitamineum* a partir de chicotes de cana-de-açúcar. Colônias que crescem devagar inicialmente “marrom-pretas”, e ocasionalmente colônias com micélio branco. Estas colônias “marrom-escuras” são instáveis, são patogênicas em cana quando reinfetadas e dão origem a três tipos distintos de crescimento: cor de creme, micélio branco e áreas em forma de leveduras (“yeast-like”). O mecanismo de transição de um tipo de colônia para outra não é muito claro, mas está provavelmente relacionado com tipo de ploidia (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983). Um trabalho recente sobre detecção de colônias de micélios (dicariótico) e da forma yeast-like (haploides + e -)

apresenta detalhes do cultivo em laboratório, do cruzamento de mating-types e do micélio (figura 6) (MOOSAWI-JORF; IZADI, 2007).

Figura 6 – Colônias “in vitro” de *S. scitamineum*. A) Formas micelial e “yeast-like”; B) Colônias “yeast-like”; e C) Micélios do patógeno onde mating-types + e – se cruzam, no meio de cultura.



Fonte: (modificado de MOOSAWI-JORF; IZADI, 2007).

2.6 Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro

2.6.1 Sobrevivência do patógeno

Estruturas de sobrevivência em *S. scitamineum* correspondem aos teliósporos, que permitem a sua sobrevivência, até quando não há cana-de-açúcar plantada (GIGLIOTI, 2007).

Em relação às condições ambientais de sobrevivência, sabe-se que as condições subtropicais em Louisiana, por exemplo, favorecem a ocorrência da doença; no entanto, a produção de soros (chicotes) diminui quando há quedas na temperatura (mudança de estação). Além disso, a plantação de cana é geralmente interrompida durante o inverno, o que diminui a ocorrência da doença, sendo que o frio afeta a fisiologia da planta e do fungo, influenciando também o número de plantas infectadas na estação seguinte. Devido à influência destes fatores climáticos, pesquisadores conduziram experimentos para avaliar a longevidade de esporos em solos de Louisiana, visto que não se sabia se os esporos produzidos durante uma estação persistiam e causavam infecção na subsequente (HOY et al., 1993). Este e outros estudos mostram que teliósporos de *S. scitamineum* são sensíveis à umidade; em solos úmidos na Índia, por exemplo, teliósporos resistiam

cerca de três semanas, enquanto estas estruturas podiam ser detectadas até 31 semanas, sob condições de seca (HOY et al., 1993).

Em laboratório, teliósporos de *S. scitamineum* podem sobreviver durante muitos meses, se mantidos secos. No entanto, com umidade este tempo é de somente duas a três semanas (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983), reforçando a sensibilidade da estrutura à umidade. Pesquisadores verificaram que teliósporos suspensos em água a 56°C eram mortos em dois minutos. Calor seco, no entanto, tratamento térmico a seco em 60° C, durante 48 horas, manteve 15% dos teliósporos vivos, embora tenha ocasionado germinação tardia (entre 24 e 30 horas, ao contrário das 6 horas comumente observadas). Ou seja, a sensibilidade ao calor pode aumentar com o aumento da umidade, para este patógeno (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

2.6.2 Disseminação do patógeno

Os teliósporos de *S. scitamineum* amadurecem no interior dos soros (chicotes) e, em seguida, são dispersos principalmente através do ar, podendo também ser localmente transportado pela água de irrigação ou estar naturalmente presentes no solo da área de cultivo, entrando em nova planta através da muda (WADA et al., 1999). O número de teliósporos produzidos em cada chicote de cana-de-açúcar é enorme: estima-se que cerca de 10^{11} teliósporos são produzidos durante a vida de um chicote. Estudos sugerem que a infecção de 20% de um campo com cerca de 75.000 hastes de cana, são cerca de 1.5×10^{15} teliósporos, que podem ser dispersos pelo ar a longas distâncias. Esta facilidade de produzir grandes quantidades e fácil dispersão dificultam o controle local e regionalmente. Uma evidência deste transporte aéreo eficiente é a contaminação de cana-de-açúcar por *S. scitamineum* entre as ilhas do Haváí (Maui contaminando Kohala) (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

2.6.3 Infecção

Para a infecção ocorrer, teliósporos de *S. scitamineum* entram em contato com o internó da cana-de-açúcar (LEGAZ et al., 1998). Em seguida, ocorre a germinação de uma hifa que dá origem a esporídios haploides por meiose, seguido da formação de esporídios – e + por brotamento. Estes esporídios, quando fundidos (- com +), originam uma hifa dicariótica (2n) (SANTIAGO et al., 2012), única capaz de infectar a planta (estes processos ocorrem geralmente na epiderme, em brotos ou estômatos abertos da planta). O broto e as células meristemáticas são invadidos (SCHENCK, 1999) em alguns casos logo após seis a 36 horas. Após isso, há a formação de apressório (estrutura achatada, formada pela dilatação da hifa, que se adere firmemente ao hospedeiro para facilitar a penetração) no interior do embrião e na base das folhas emergentes (LEGAZ et al., 1998). Detalhes de teliósporos de *S. scitamineum* obtidos a partir de chicotes em cana-de-açúcar infectada, assim como da germinação “in vitro” dos mesmos, estão representados na figura 7.

Como teliósporos do patógeno não resistem muito tempo à alta umidade, a infecção de mudas no solo úmido é de baixa incidência (COMSTOCK; FERREIRA; TEW, 1983).

Figura 7 – Teliósporos de *S. scitamineum* e germinação. a) teliósporos a partir do chicote; b) e c) germinação dos teliósporos.



Fonte: (SUNDAR et al., 2012).

2.6.4 Colonização

Após infecção, as hifas se estendem por todo o hospedeiro, especialmente nas células parenquimáticas da região inferior, e se direcionam à região superior para formar o soro, em forma de chicote (LEGAZ et al., 1998). As hifas podem, ainda, permanecer dormentes na planta, em um estado denominado “infecção

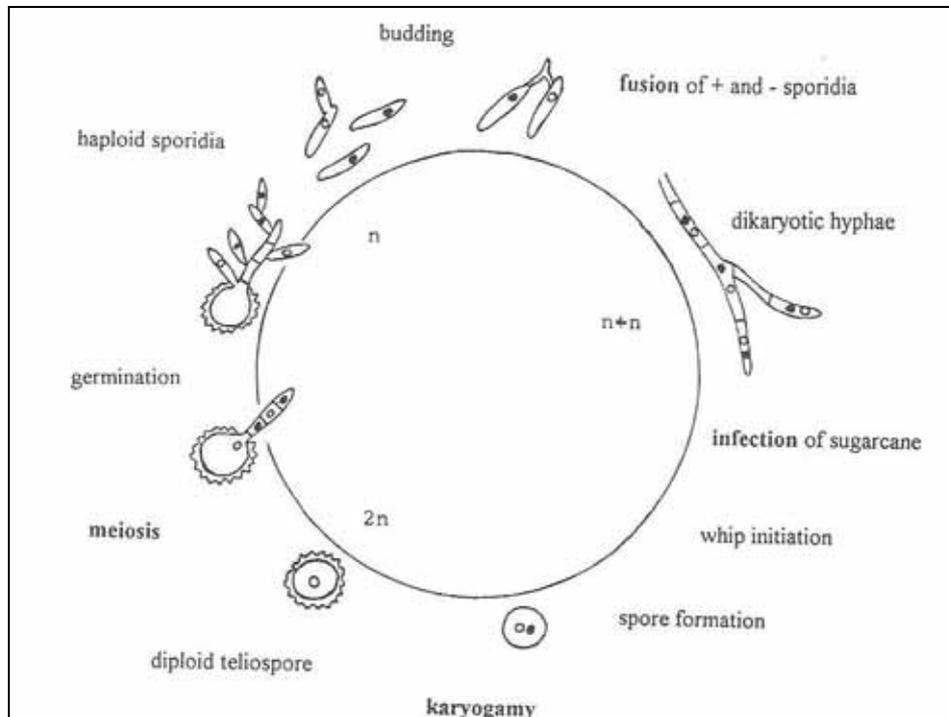
latente” (COMSTOCK; FERREIRA ; TEW, 1983, SANTIAGO et al., 2012). Durante o desenvolvimento do fungo na planta e anteriormente à formação dos soros (chicotes), o micélio fúngico se acumula no meristema apical, os internós da planta se alongam, o meristema apical se torna intercalado e a formação do soro é iniciada (em forma de chicote). A fusão de dois núcleos fúngicos ocorre em cada célula micelial, aparentemente durante esta fase. Células mononucleadas podem ser observadas na periferia dos chicotes em uma matriz gelatinosa. Paredes celulares que se formam ao redor de cada núcleo se espessam e tornam-se pigmentadas, para formar teliósporos diplóides maduros. A germinação dos teliósporos, o brotamento continuado dos esporídios, a determinação do sexo dos esporídios e formação de hifa dicariótica podem ser conduzidos “in vitro”, mas o resto do ciclo de vida e a fusão dos núcleos (hifas dicarióticas) ainda não foram observados (SCHENCK, 1999).

2.6.5 Reprodução e mecanismos genéticos de *Mating-types* e patogenicidade

Revisão sobre a estrutura, função e evolução de “mating-types” em fungos de carvão foi realizada, mostrando serem bastante complexas. Estes fungos são dependentes do sistema sexual (necessidade de formar a hifa dicariótica) para a infecção e também para a reprodução (no hospedeiro, ocorre a proliferação e formação de esporos) (BAKKEREN; KAMPER; SCHIRAWSKI, 2008).

Quando teliósporos de *S. scitamineum* entram em contato com a superfície úmida da planta, formam um pró-micélio, que por sua vez gera esporídios haplóides, pelo processo de meiose (ALBERT; SCHENCK, 1996); este processo pode aumentar a variabilidade genética do fungo, e pode estar fortemente envolvido com o processo de variação de virulência do patógeno e, portanto, estar relacionado com o surgimento de novas raças. A figura 8 mostra o ciclo reprodutivo do patógeno.

Figura 8 – Ciclo reprodutivo de *S. scitamineum*.



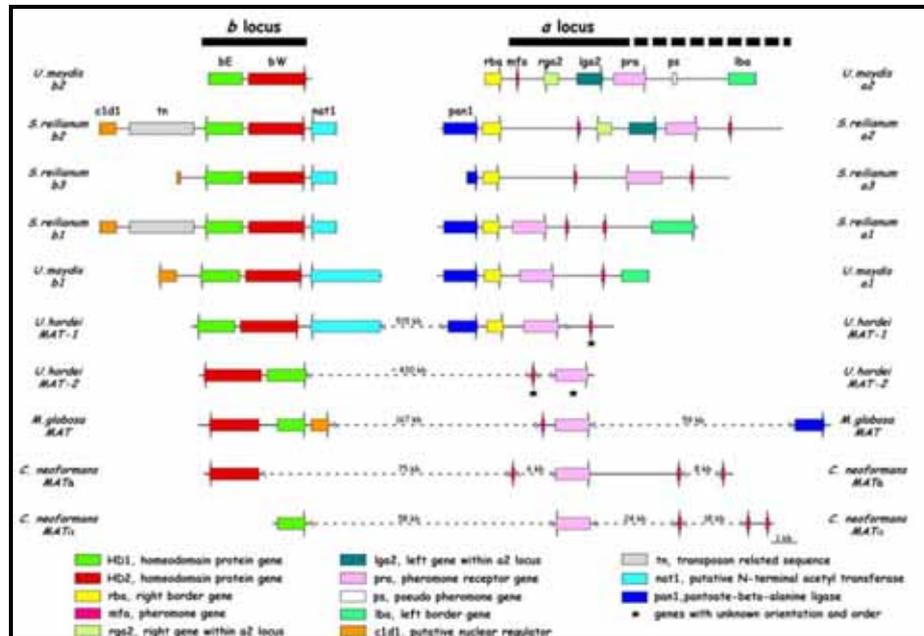
Fonte: (SCHENCK, 1999).

Resumidamente, o locus *a* é composto de dois alelos que se reconhecem por meio de um sistema de um ferormônio e uma proteína ferormônio-receptor (BAKKEREN; KAMPER; SCHIRAWSKI, 2008). A figura 9 mostra a organização genética dos loci de mating-types em fungos de carvão.

S. scitamineum, assim como várias espécies de *Ustilago* causadores de carvão, apresentam sistema de “mating” bipolar, no qual dois alelos em um mesmo locus controlam a fusão de esporídios e formação da hifa dicariótica (ALBERT; SCHENCK, 1996). Para que os “mating-types” (+ e -) sejam compatíveis, um locus *b* que possui dois alelos em um “mating-type” sempre deve segregar com o mesmo alelo correspondente (compatível) no locus *a* (SCHENCK, 1999). Estudos de Albert e Schenck (1996) mostraram que amplificação do gene *bE* de *S. Scitamineum* (-) com iniciadores utilizados para *U. maydis* gera um produto de PCR com identidade de 71% gene do patógeno de milho (alelo 5); para o “mating-type” de *S. Scitamineum*, esta identidade foi de 68% com *U. Maydis*. Ele é responsável pelo

desenvolvimento e crescimento da hifa dicariótica e infecciosa em *U.maydis*, e os autores sugerem que pode apresentar as mesmas funções em ambos os fungos.

Figura 9 – Organização genética de loci de mating-types de alguns Basidiomicetos.



Fonte: (BAKKEREN; KAMPER; SCHIRAWSKI, 2008).

Tendo em vista a pequena quantidade de informações disponíveis sobre o complexo de “mating-types” em *S. scitamineum*, será descrito o sistema sexual de *U. maydis*, para o qual estudos têm sido aprofundados e tendo em vista que muitos estudos sobre *S. scitamineum* tomam como referência este causador de carvão em milho.

O modelo bem estudado de “mating-type” para fungos causadores de carvão: *Ustilago maydis*, patógeno de milho (*Zea mays*), cujo “mating system” é tetrapolar. Neste fungo, a fase sexuada apresenta células em forma de leveduras de um “mating-type” (como os esporídios em *S. scitamineum*), as quais liberam hormônios que atraem o “mating type” compatível. A ligação com o hormônio induz a fusão dos filamentos e, então, forma o estágio assexuado em forma de hifa denominada dicariótica (também como em *S. scitamineum*). Dois loci são responsáveis pelos diferentes “mating-types”: locus b, que contém genes codificantes de fatores de transcrição de homeodomínio; estes genes são diferenciados em HD1 ($\alpha 2$

homólogo) e HD2 (a1 homólogo), dependendo da sequência do homeodomínio e o locus a, que contém genes codificantes de feromônios e receptores que são recrutados para agir diretamente como determinantes do “mating-type”. Há duas versões alélicas do locus a, mas cerca de 25 versões alélicas do locus b, gerando então 50 diferentes “mating-types”. Ainda, nenhum destes receptores são ativados por feromônios codificados por genes dentro do mesmo locus, somente diferentes versões alélicas de feromônios e receptores são capazes de aproximar os “mating-types” e então, de um ativar o complementar (ou seja a1b2 pode juntar-se com a2b1) (CASSELTON, 2002). Há sugestões ainda que os alelos b de *U. maydis* codifiquem polipetídeos que, em combinação, ativam uma série de genes responsáveis pela patogenicidade (SCHENCK, 1999).

Pesquisas deram evidência da presença de genes a em *S. scitamineum*, como há em *U. maydis*, codificando receptores e ferormônios, sugerindo comportamento como em genes a de outras espécies de *Ustilago*. A evidência do locus b em *S. scitamineum* possibilitou desenvolvimento de técnicas moleculares utilizando iniciadores de *U. maydis* (SCHENCK, 1999). Apresentaremos estudos em Biotecnologia, utilizando estas informações, visando o diagnóstico de carvão em cana-de-açúcar.

2.7 Controle

Experiência de estratégias de controle na Nigéria (NISUCO – Nigerian Sugar Company) mostrou que o controle mais eficiente de carvão seria utilizando o tratamento térmico (52°C, por 30 min), seguido do uso dos fungicidas Pyroquilon, Benomyl e Metalaxyl (WADA et al., 1999), discutido mais a frente. Outros trabalhos apontam maior eficiência no controle através da utilização de cultivares resistentes (CO et al., 2008), devido a fatores como custo, por isso diversas variedades resistentes ao carvão vêm sendo desenvolvidas (NZIOKI et al., 2010). São inúmeros os testes para avaliação da resistência de cultivares de cana-de-açúcar: desde o mergulho do broto da planta em solução com teliósporos, aplicação de pasta com os teliósporos no tecido da planta, com ou sem fermentos, ou inóculo com injeção. Após determinado tempo, ou após determinado número de replantios da cana-de-

açúcar infectada, é avaliada a suscetibilidade do cultivar de acordo com o número de soros (chicotes) surgidos, testes que podem ser realizados tanto em casa-de-vegetação, como no campo. (CO et al., 2008).

Outra opção de controle para carvão em cana-de-açúcar consiste na aplicação de fungicidas. Eles podem ser utilizados em mergulho dos toletes em água fria ou adicionados a tanques de tratamento com água quente (52°C). Está reportado o uso de compostos de Mercúrio ou Cloro, além de triazois, como triadimefon e propiconazol, os quais são atualmente usados na Austrália, por exemplo (BHUIYAN et al., 2012).

A aplicação de fungicidas em campo já foi avaliada na Nigéria, para comparar a eficiência de diversos fungicidas. Mancozeb (Dithane M45), Delsene M (Carbendazim + Maneb) e Chlorotalonil (Tetracloroisofaltonitrila) foram avaliados em comparação com Benomyl, como fungicida padrão. Todos mostraram eficiência, quando comparados com controle não tratado (WADA et al., 1999).

Recentemente, diversos fungicidas foram testados (azoxystrobin, cyproconazol, acibenzolar-s-methyl, propiconazole, difenoconazole, triadimefon, metalaxyl, dodecyl dimethyl ammonium chloride e quintozene) no controle de carvão em cana-de-açúcar. Os experimentos foram realizados na primavera e no outono australianos, ou seja, a aplicação de fungicidas e plantação foram realizados em novembro (experimento 1) e março (exp. 2), respectivamente. Azoxystrobin, didecyl dimethyl ammonium chloride, quintozene e triadimefon foram os mais eficazes “in vitro”, e somente para o último foi necessária uma concentração maior do fungicida para a obtenção do mesmo resultado, quando o experimento foi montado no outono. No entanto, para aplicação em campo, triadimefon, azoxystrobin, propiconazol e cyproconazol mostram maior eficiência, após três a seis meses de cultivo. É importante também ressaltar que deve-se testar os mesmos fungicidas em aplicação com “spray”, geralmente praticado em campo; neste experimento, eles utilizam o mergulho da muda (BHUIYAN et al., 2012).

Como métodos de controle, a manipulação do ambiente, rotação de culturas, plantio ou irrigação tardios, ou preparação específica das terras de cultivo (princípios de controle de regulação e evasão) são outras opções (WADA et al., 1999), que se enquadram no princípio de “regulação”.

Zimbábue, plantador de cana-de-açúcar, tem aplicado também altos níveis de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio) no solo. Louisiana reduziu o tempo de replantios a partir de cultivo anterior; a cada ano, eles replantam o campo com mudas limpas de cana-de-açúcar. Outra estratégia que pode ser adotada é a verificação rotineira de brotos de cana-de-açúcar contaminados, e retirá-los do campo (“roguing”) (WADA et al., 1999).

O Brasil tem utilizado mudas comerciais limpas de cana-de-açúcar, estratégia que tem diminuído a incidência de carvão. No entanto, a principal prática é a resistência genética (uso de variedades resistentes), além da recomendação de prática do “roguing” (DOS SANTOS, 2008).

Quando comparado ao uso de fungicidas, a utilização de bioagentes de controle ou extratos de plantas são mais ecologicamente viáveis no controle de determinada doença. Filtrados de *Fusarium* foram reportados inibindo a germinação de teliósporos (“in vitro”) de *S. scitamineum*, embora não esteja relacionado à penetração dos micélios de *Fusarium* nestas estruturas. Os extratos de folha de *Calendula officinalis*, *Eclipta Alba* e *Solanum nigrum* inibiram mais que 90% da germinação “in vitro”, e os de outras plantas foram promissores ao menos no adiamento da germinação. Em campo, o tratamento da muda de cana-de-açúcar com extrato de *S. nigrum* diminuiu a incidência da doença de 11%, no controle infectado, para cerca de 2%. Quando a planta estava no segundo replantio, a incidência da doença com o mesmo tratamento foi de 5,38%, contra 15,3% do controle positivo. O melhor tratamento, no entanto, para aumentar a germinação da planta, a produtividade e cana para moer, na plantada e na replantada, foi com extrato de *Trichoderma viride*. No entanto, nenhuma informação está disponível para o controle sob as condições do campo, com utilização destes métodos e agentes ou extratos de plantas (LAL et al., 2009).

A quarentena é outro método de controle que visa restringir a dispersão de doenças, através do controle do movimento de plantas, solo, maquinaria e outros itens contaminados. Visto a ocorrência recente de carvão na Austrália (1998) (CROFT; THOMPSON; MAGAREY, 2011), regulamentações de quarentena foram realizadas no país, a qual mostrou redução de risco da dispersão do patógeno (SUNDAR et al., 2012).

2.8 Diversidade de virulência do patógeno (variabilidade)

Vários são os métodos para verificarmos a diversidade de raças de *S. scitamineum*. Uma das maneiras é inocular teliósporos do patógeno em diversos cultivares (suscetíveis ou resistentes), e então fazer a distinção, nomeando as raças pela região de surgimento ou ocorrência, ou por qual cultivar é infectado, por exemplo. No Havaí, em 1976 a variedade de cana-de-açúcar mais resistente ao carvão (H50-7209) tornou-se suscetível ao patógeno; a raça surgida foi denominada Oahu. Em 2001, a variedade resistente às presentes no país tornou-se suscetível, e esta nova raça, então, foi denominada Maui (SCHENCK, 2003).

A variabilidade patogênica foi avaliada para populações de *S. scitamineum* de diversas cidades no Estado de São Paulo, como Ribeirão Preto, Piracicaba e Jaú, levando em conta as variáveis incidência (%), área sob curva de progresso da doença e período latente. Os resultados mostraram que há variabilidade na patogenicidade, mas não há diversidade de virulência, e sim na agressividade das populações do patógeno (RAGO; CASAGRANDE; JUNIOR, 2009).

3 PODRIDÃO-ABACAXI

3.1 Danos e perdas

Podridão abacaxi, causada por *Ceratocystis paradoxa* (cuja anamorfa é *Thielaviopsis paradoxa*) resulta em falhas nas áreas de plantação de cana-de-açúcar. Quando há infecção, a germinação de brotos é dificultada, tornando-se pobre e desigual, seguido de morte rápida da planta (JAMES, 2004), esta inibição ultrapassando 47%, seguido de uma diminuição na produção da cana-de-açúcar entre 31-35% (BEGUM; TALUKDER; HOQUE, 2008). Quando severa, a doença reduz seriamente a germinação. Há inibição da formação de raízes quando pedaços de toletes estão infectados (SINGH et al., 1999).

Infecção por *C. paradoxa* foi primeiramente registrada por De Seynes, em 1886, causando podridão em frutas de abacaxi (DE SEYNES, 1886, apud YADAHALLI, 2007c), posteriormente detectado em Java, onde a doença recebeu o nome “podridão abacaxi”, devido ao odor nas plantas de cana-de-açúcar infectadas (WENT, 1893, apud YADAHALLI, 2007c).

Danos severos com a doença em cana-de-açúcar foram registrados em vários países produtores, como Austrália, Mauritius, África do Sul e Taiwan (SINGH et al., 1999), sendo também de importância em Bangladesh (BEGUM; TALUKDER; HOQUE, 2008), onde está distribuído em todas as regiões de cultivo. A doença vem sendo registrada em todos os estados em que há cultivo na Índia (SURYAWANSHI; DEY, 2012).

Além da cana-de-açúcar, outras culturas de regiões tropicais e temperadas, como palma, banana, abacaxi e cacau são também infectadas pelo fungo (SINGH et al., 1999). O coco é também afetado por *C. paradoxa*, ocorrendo na Índia e outros países próximos onde há o cultivo, como Sri Lanka e Indonésia, tendo sido registrado no Brasil, atacando coco no estado do Amazonas (1985) e Sergipe (1986) (WARWICK; PASSOS, 2009).

Em 2009, a incidência de *C. paradoxa* também foi verificada em solos de plantação de tamareira na Espanha (costa mediterrânea, temperaturas entre 11 e 26°C, 300 mm anuais de chuva). O fungo também constitui um patógeno da planta,

juntamente com outra espécie, *Thielaviopsis punctulata*. Em 52% dos campos com cultivo havia incidência do patógeno (isolamento de *T. paradoxa* do solo) (ABDULLAH et al., 2009).

3.2 Detecção

Como *C. paradoxa* constitui um fungo do solo, geralmente ocupando os primeiros 25 cm do solo onde a cana-de-açúcar está plantada, é necessário métodos de detecção do patógeno no solo. No Havaí, por exemplo, foi verificada a densidade de 3875 esporos/g de solo. Pesquisadores avaliaram dois métodos de detecção de *C. paradoxa*, um denominado “V8-semi selective medium” e outro “tissue bait”. Para análise de eficiência do método utilizando um meio seletivo, foi verificada inicialmente a viabilidade de esporos de *C. paradoxa*, através da germinação de clamidiósporos, seguido de teste de recuperação utilizando o meio (poder de recuperação de esporos do solo determina a eficiência do método). O desenvolvimento de meios seletivos é, em especial, um desafio para a detecção de determinado organismo em amostras ambientais, visto a presença de bactérias, actinomicetos, fungos e algas, por exemplo; neste caso, o meio permitiu não somente o desenvolvimento rápido de *C. paradoxa*, mas também o surgimento de clamidiósporos, cujas características permitiram a identificação de *C. paradoxa*, para a contagem. O teste de “tissue bait” foi realizado preparando lâminas a partir de tecido de cana-de-açúcar (variedade suscetível à podridão-abacaxi), coletadas dos mesmos locais em que a densidade de esporos no solos foi verificada.

Os resultados mostraram que a maior eficiência ocorre em diluições da amostra de solo cujo resultado em placa de Petri apresente menos que 50 colônias a serem contadas; baixas diluições comprometeram a sensibilidade do teste. A desvantagem do teste é a presença de contaminantes; o autor sugere o desenvolvimento de fungicidas que, a serem testados, para otimizar a detecção. A presença destes contaminantes pode subestimar a presença de *C. paradoxa*. Os pesquisadores verificaram também que em um dos campos analisados, a densidade de esporos no solo foi bastante acima que para os demais; verificaram também que a colheita mecânica era realizada nestes campos. Eles sugeriram então que há

necessidade de verificar a influência da mecanização, fazendo a coleta de amostra do solo antes e após a colheita mecanizada; eles sugerem que a presença de pedaços de cana-de-açúcar que permanecem no solo podem atuar como meio para desenvolvimento do fungo, mesmo no solo.

Comparando o meio seletivo com a análise microscópica da cana-de-açúcar, o último método mostrou ser mais eficiente; entre 61 campos analisados, 30 foram detectados com a infecção por “tissue bait” e 25 através do uso de meio seletivo. No entanto, o fato do patógeno necessitar de um tempo para se desenvolver na cana-de-açúcar explica o fato que para alguns campos tenha sido detectado o patógeno por meio seletivo, mas não por “tissue bait” (MOUTIA; SAUMTALLY, 1999).

Abdullah et al. (2009) cita diversos outros métodos de detecção de fungos no solo. Diluição e plaqueamento (padrão), plaqueamento direto, tratamento do solo com 5% de ácido acético, tratamento com etanol 70% e tratamento com fenol 2%. PCA (“Potato Carrot Agar”), MEA (“Malt Extract Agar”) e PDA (“Potato Dextrose Agar”) foram utilizados e cloranfenicol aplicado para impedir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos ocorreu a 25°C no escuro. Foi detectado o patógeno com alta frequência (52%), juntamente com *T. punctulata*, outro patógeno de planta, nos solos espanhóis.

3.3 Sintomas e Sinais

Geralmente, os sintomas da podridão abacaxi aparecem após duas a três semanas do plantio (AGNIHOTRI, 1996). Toletes de cana-de-açúcar afetados pela doença apodrecem antes que novos brotos germinem e, quando ocorre brotamento, há morte do broto rapidamente após emergência. Se havia brotamento antes de uma extensiva podridão na planta infectada por *C. paradoxa*, o desenvolvimento dos brotos passa a ser retardado (SINGH et al., 1999).

Há também vermelhidão (figura 10), causada pelo espalhamento do patógeno, além do aroma de abacaxi maduro (acetato de etila), seguido do escurecimento resultante da presença de clamidiósporos maduros. Plantações infectadas por *C. paradoxa* são irregulares e as plantas com aparência torta (SINGH

et al., 1999). A infecção de mudas inibe a formação de raízes pelas mesmas, provavelmente pelo fato da produção de etileno.

Figura 10 – Cana-de-açúcar com podridão abacaxi.



Fonte: (elaborado pelo autor).

3.4 Caracterização do patógeno (etiologia)

O patógeno de podridão abacaxi é *Ceratocystis paradoxa*, fungo de solo transmitido à cana-de-açúcar por conídios ou clamidiósporos nele presentes (SINGH et al., 1999). *C. paradoxa* é uma espécie teleomórfica (reprodução sexuada) para a qual *Thielaviopsis paradoxa* constitui sua anamorfia (reprodução assexuada) (PAULIN-MAHADY; HARRINGTON; MCNEW, 2002).

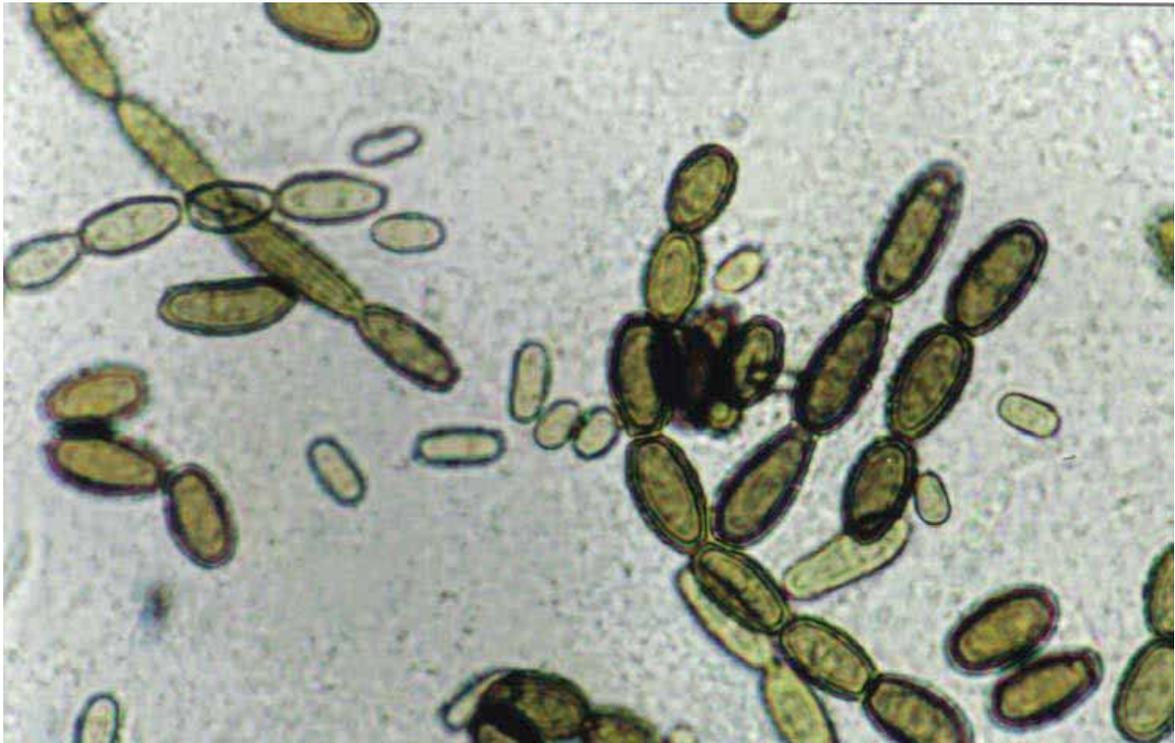
O “status” atual é baseado em filogenética suportada por análises de LSU (DNA ribossomal nuclear) e região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de espécies do gênero *Chalara* (anteriormente considerada anamórfico de *C. paradoxa*), *Chalaropsis* e *Thielaviopsis* com espécies de *Ceratocystis* (PAULIN-MAHADY; HARRINGTON; MCNEW, 2002).

Em *T. paradoxa*, os conidiósporos são geralmente retos, de hialino a marrom pálido, com cerca de 200µm de comprimento, com células terminais carregando

conídios, os quais geralmente estão inicialmente arranjados em cadeias (aleurioconídios) (SOYTONG; PONGNAK; KASOLARN, 2005). Dois tipos de conídios caracterizam *T. paradoxa*: um deles é denominado endoconídio, com filídios, outro é denominado aleurioconídio (figura 12), maior, pigmentado e arranjado em forma de cadeias, na extremidade de hifas especializadas (células esporógenas basais). As cadeias são posteriormente fragmentadas, gerando esporos individuais em forma de barril (PAULIN-MAHADY; HARRINGTON; MCNEW, 2002). *C. paradoxa* é um patógeno necrotrófico (RUTHERFORD et al., 2002).

Clamidiósporos de *T. paradoxa* (figura 11) são originados em cadeias a partir de pequenos braços de hifas, são entre marrom pálido e preto-amarronzado, lisos, ovais e entre 10-20 x 5-10 μm (SOYTONG; PONGNAK; KASOLARN, 2005).

Figura 11 – Conídios e clamidiósporos de *T. paradoxa* (anamorfia de *C. paradoxa*) causando podridões em palma (400X).

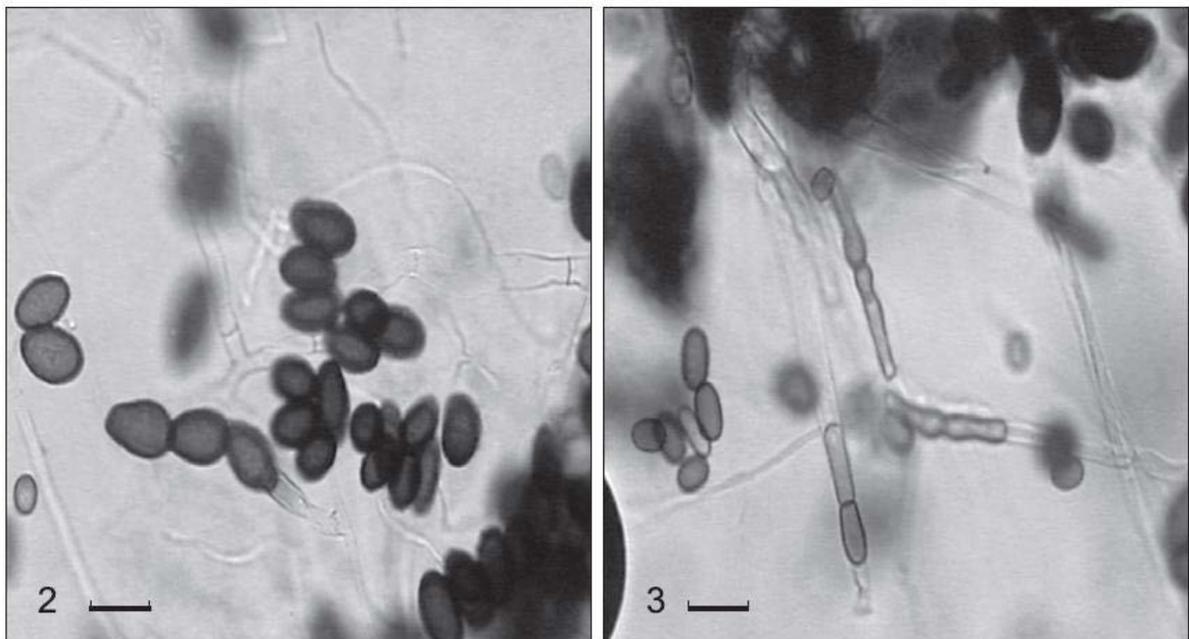


Fonte: (SOYTONG; PONGNAK; KASOLARN, 2005).

As condições ótimas de crescimento e esporulação “in vitro” para *C. paradoxa* são de 28°C, esporulando a partir de 15°C, e pH ótimo de crescimento e esporulação em 6,5 e 7,0, respectivamente. A umidade relativa também foi verificada para a ocorrência da doença. Verificou-se que entre as condições

testadas, as menores porcentagens (20%) e as maiores (100%) tiveram maior incidência de podridão (YADAHALLI, 2007). Pesquisadores avaliaram, ainda, a influência da temperatura sobre o crescimento micelial do patógeno isolado de coqueiros infectados, e confirmaram uma temperatura ótima de crescimento em 28°C. A produção de esporos foi maior em 29°C. Tanto o crescimento micelial como a produção de esporos diminuem à medida que a temperatura aumenta, não ocorrendo em 40°C (COSTA E CARVALHO et al., 2011)

Figura 12 – Aleurioconídios com paredes espessas formados em cadeias (2) e filokonídios (3) de *T. paradoxa* (escala = 10 µm).



Fonte: (ABDULLAH et al., 2009).

3.5 Ciclo de Relações Patógeno-Hospedeiro

3.5.1 Sobrevivência do patógeno

Clamidiósporos de *C. paradoxa* são importantes para a sobrevivência em longo prazo do fungo no solo (SINGH et al., 1999). Macroconídios são esporos assexuados de *T. paradoxa* responsáveis pela sobrevivência em condições ambientais adversas (CHAPOLA, 2010).

O pH do solo é um dos fatores que determina a sobrevivência do patógeno nele. Pesquisadores mostraram que acima de pH 7.9 não foi encontrado *C. paradoxa*; entre 4.2 e 7.9 ele foi detectado, sendo que a maior incidência ocorreu entre os valores de pH 5 e 6. Alguns tipos de solo, descritos em Arlidge e Wong You Cheong (1975, apud MOUTIA; SAUMTALLY, 1999) também favorecem a presença do fungo (MOUTIA; SAUMTALLY, 1999). As condições de esporulação e crescimento melhores para desenvolvimento de *C. paradoxa*, no entanto, mostram estar entre 6,5 e 7,0 (YADAHALLI, 2007); neste caso deve ser analisada não somente a densidade de esporos; como uma estrutura de sobrevivência, é importante também sua viabilidade.

Quando foi avaliada a influência da temperatura sobre o crescimento de *C. paradoxa* (isolado de coqueiro), foi mostrado que temperaturas acima de 40°C o inibe completamente tanto o crescimento, como a esporulação do fungo. Testes nas condições de campo são ainda necessários para avaliar a sobrevivência do patógeno (COSTA E CARVALHO et al., 2011).

3.5.2 Disseminação do patógeno

Como *C. paradoxa* é um fungo de solo, a transmissão ocorre essencialmente às gemas de cana-de-açúcar por conídios e clamidiósporos presentes no solo (SINGH et al., 1999). O movimento do inóculo pode ocorrer também pelo ar ou pela água de irrigação e de escoamento (AGNIHOTRI, 1996).

Após morte da planta, na qual se produziu esporos aos milhões, estes são liberados no solo, servindo como fonte para o próximo plantio (RAID, 2010, apud CHAPOLA, 2010).

A dispersão de *C. paradoxa* pode eventualmente ser realizada por vetores, em especial insetos, sendo reconhecido o transporte direto de *C. paradoxa* e *C. fagacearum* por besouros. *C. paradoxa* foi também reportado como presente no trato intestinal de *Rhynchophorus palmarum*, um Coleoptera (Insecta) que se hospeda naturalmente em plantas Aracaceae (como o coqueiro). Coqueiros podem ser suscetíveis à infecção por *C. paradoxa*. Isto indica um possível papel de *R. palmarum* como vetor (disseminação) de *C. paradoxa* (PARRA et al., 2003). *Diatraea*

saccharalis (broca da cana-de-açúcar), *Mahanarva fimbriolata* (cigarrinha-das-raízes), os besouros *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), *Migdolus* (*Migdolus fryanus*, Coleoptera: Cerambycidae), *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae) e pão-de-galinha (Coleoptera: Scarabaeidae) ou cupins *Heterotermes tenuis* (Isoptera: Rhinotermitidae) são exemplos de pragas comumente associadas à cana-de-açúcar (MARQUES et al., 2008). A presença do patógeno no trato intestinal destes insetos pode levar à infecção, caso o inseto auxilie a invasão do patógeno através de sua alimentação.

3.5.3 Infecção

A infecção da cana-de-açúcar por *C. paradoxa* ocorre logo após o plantio, através de cortes presentes na planta, os quais podem decorrer de ataque por brocas ou então pelas máquinas presentes no campo (AGNIHOTRI, 1996). A entrada de microconídios ocorre neste momento, os quais germinam e dão início à invasão (CHAPOLA, 2010).

Estudos sobre a interação entre *C. paradoxa* e cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), como evidenciado pela presente revisão, são ainda escassos, por isso detalhes da infecção não são aqui apresentados.

Recentemente, Yadahalli (2007c) testou diferentes técnicas de inóculo de culturas puras de *C. paradoxa* em cana-de-açúcar. Somente com estas técnicas bem definidas, é possível normalizar os estudos e melhor compreender a doença.

Co-7804, variedade suscetível à doença, foi utilizada para fazer os testes. As gemas foram inoculadas através de (i) mergulho em solução de conídios por 30 minutos, (ii) inóculo no solo e utilização do mesmo para plantar as gemas e (iii) mergulho das gemas em conídios germinados (potato dextrose broth) por um dia a 28°C; as gemas foram mergulhadas nesta solução de conídios germinados e também foram plantadas em solo estéril (como em i). Foram utilizados 10^6 esporos/mL para os testes acima, aumentando a porcentagem de esporos utilizados em cada ensaio, em solo estéril e não estéril; foram avaliadas também gemas com um, dois, três brotos, e também com brotos feridos.

À medida que a concentração de inóculo de *C. paradoxa* aumentou, o número de brotos germinados da planta diminuiu, assim como houve o aumento da incidência da doença (podridão abacaxi). Em solo não estéril, estes efeitos diminuíram. Quando foram comparadas as gemas que possuíam um, dois ou três brotos, e também os feridos, verificou-se menor germinação nas plantas com menos broto, com menor porcentagem ainda nas que possuíam broto ferido. À medida que foi verificada a diminuição da germinação, houve o aumento de incidência de podridão abacaxi nos ensaios com inóculo de *C. paradoxa* (YADAHALLI, 2007c). A menor germinação em plantas feridas exalta a importância de insetos ou maquinaria em campo que causem danos na planta, favorecendo a infecção.

3.5.4 Colonização

Nas mudas recém-invasidas por *C. paradoxa*, pode ser observado um encharcamento de suas extremidades, que se inicia na região de entrada do patógeno e aprofunda rapidamente. Em seguida, o patógeno se espalha pelo tecido parenquimático, tecido que fica inicialmente avermelhado, passa para cinza, pardo-escuro e negro; neste momento, o patossistema libera o aroma de abacaxi que dá nome à doença (mais acentuados nas fases iniciais do “ataque”) (CHAPOLA, 2010).

No momento em que o tecido está negro, só resta a casca intacta das mudas. Os feixes fibrovasculares internos estão soltos e recobertos por uma massa de esporos (CHAPOLA, 2010).

Experimentos realizados identificaram o acetato de etila (confere o odor de abacaxi à planta infectada) como composto volátil tóxico envolvido na colonização, já que foi detectado após inoculo de *C. paradoxa* em cana-de-açúcar. Após verificar a presença do composto nas gemas inoculadas, concentrações crescentes foram avaliadas “in vitro” e mostraram que em soluções de 0.10, 0.15 e 0.25 mL/L de acetato de etila não há sequer brotamento, sendo que a formação de raiz foi menor que o controle. Concentrações abaixo disso, embora não tivessem inibido completamente o brotamento, reduziu bastante seu tamanho com relação ao controle (YADAHALLI, 2007a).

Há trabalhos que mostram também que a maior produção de acetato de etila por *C. paradoxa* ocorre em 20°C e não em 28°C (temperatura ótima de crescimento e esporulação do patógeno) (KUO; CHIEN; LI, 1969 apud CHAPOLA, 2010). Portanto, isto pode explicar a maior importância de podridão abacaxi no plantio de inverno (CHAPOLA, 2010). Outros trabalhos mostram também a inibição do enraizamento, em decorrência da produção de etileno nas plantas submetidas a acetato de etila exógeno. Isto sugere que a planta infectada por *C. paradoxa* também pode ter estimulada a produção de etileno (CHAPOLA, 2010).

3.5.5 Reprodução

No Brasil, o patógeno é encontrado infectando cana-de-açúcar principalmente em sua forma assexuada, *T. paradoxa*, produzindo micro e macroconídios. Os microconídios possuem paredes finas e são inicialmente hialinos, posteriormente pardo-escuros. Cadeias de conidióforos são liberadas ao ambiente, após produção endógena na planta. Macroconídios são formados em conidióforos curtos, perpendiculares às hifas principais. São produzidos em cadeias, de três a dez conídios por conidióforo. A coloração destes varia de hialina a verde-oliva e, posteriormente, parda-escura. Os microconídios são os responsáveis pela germinação e rápida colonização da planta (CHAPOLA, 2010).

Embora não haja clareza com relação à reprodução de *C. paradoxa* e *T. paradoxa* na literatura, há descrição para Ascomicetos em geral, inclusive com relação aos “mating-types”. *Neurospora crassa* e *Podospora anserina* são modelos de reprodução em ascomicetos filamentosos, cujo acasalamento ocorre entre diferentes células + e -, representadas por microconídios e ascogônios, respectivamente (CASSELTON, 2002). Estes podem ser possíveis modelos para o estudo da reprodução em *C. paradoxa*.

3.6 Controle

A prevenção ideal da podridão abacaxi seria em providenciar melhores condições para desenvolvimento da planta (BAILEY, 2004) ou escolhendo a melhor

época para o plantio (CHAPOLA, 2010). A seca, por exemplo, é um fator que contribui para aumentar a severidade da doença (AGNIHOTRI, 1996).

A aplicação de fungicidas é o melhor método de controle de podridão abacaxi, principalmente compostos de Mercúrio Orgânico. Em alguns países como o Brasil, no entanto, o uso destes produtos foi proibido devido à contaminação ambiental de agrossistemas, sendo substituídos por outros fungicidas (BAILEY, 2004).

No Brasil, Piori Xtra (Azoxistrobina e Ciproconazol) e Dynasty (Azoxistrobina, Fludioxonil, Metalaxil-M) são exemplos de fungicidas aplicados no controle da doença. Outros fungicidas também foram avaliados no Brasil, em condições que propiciaram maior e menor incidência da doença (temperaturas baixas e altas, respectivamente). Em casa de vegetação, fungicidas foram aplicados utilizando pulverizador costal pressurizado, de maneira a simular aplicação em campo (CHAPOLA, 2010).

Eficiência foi verificada utilizando Azoxistrobina, em adição a Ciproconazol ou Fluodioxil e Metalaxil-M. Propiconazol e Piraclostrobina, sozinha ou com Epoxiconazol, também mostraram ser eficientes. A combinação de Azoxistrobina com Ciproconazol, por exemplo, mostrou especial importância, já que a eficiência deste fungicida foi muito boa em condições que favoreciam altamente a ocorrência de podridão abacaxi (CHAPOLA, 2010).

Benomyl também foi recomendado para tratar doença pelo mesmo patógeno de dendezeiro, na Nigéria (EZIASHI et al., 2010), embora já tenha sido banido no Brasil. Além deste, Guazatine, Carbendazim+Difeconazol são alguns exemplos de fungicidas que se destacam nas regiões de cultivo (BAILEY, 2004).

Foram realizados testes “in vitro” para avaliar a eficiência de outros fungicidas sobre a cultura de *T. paradoxa*, como Carboxina+Tiran, Quintozeno e Codificado BRF103, na inibição micelial do patógeno; resultados mostraram que o primeiro é eficiente, mas em alta concentração; BRF103 foi eficiente na inibição de todos os isolados e o último apenas para alguns deles (ESMERINI et al., 2008).

As eficácias de propiconazol e cytozen (regulador de crescimento da planta) foram avaliadas e comparadas no controle de podridão abacaxi, assim como duas diferentes maneiras de aplicar o fungicida (mergulho por cinco minutos ou “spray”). Cytozen tem especial aplicação no controle de podridão abacaxi, pois estimula a

rápida germinação (RAID, 1990). Verificou-se que o mergulho com o fungicida foi mais eficiente no controle de podridão abacaxi sobre o uso de cytofen, proporcionando também maior produtividade de cana por unidade de área (hectare). Quando comparado com outros fungicidas (Benomyl, Tiofanato metil, Flusilazol e Etiltriazol) em casa-de-vegetação e em campo, propiconazol foi também mais eficiente (mais porcentagem de desenvolvimento de brotos), sendo sempre mais eficiente a aplicação por mergulho que em “spray” (RAID, 1990). Alguns autores sugerem que o propiconazol não somente atua controlando a doença, mas também atua sobre a fisiologia da cana-de-açúcar, melhorando variáveis produtivas da planta (CHAPOLA, 2010).

Além do uso de fungicidas, o uso de variedades resistentes no controle de podridão abacaxi e também a aplicação de água quente nas mudas de cana-de-açúcar têm sido utilizados. O tratamento com água quente (52° C) tem uso especial para evitar raquitismo-da-soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) de cana-de-açúcar, pois estimula a germinação da planta (RAID, 1990), podendo ser boa forma para evitar também a infecção por *C. paradoxa*.

A desvantagem no uso de fungicidas para o controle de podridão abacaxi consiste no alto custo dos produtos em relação ao preço das mudas da “commodity” (EZIASHI et al., 2010), além da poluição ambiental e o uso contínuo que, possivelmente, pode levar ao desenvolvimento de resistência em muitos patógenos (SOYTONG; PONGNAK; KASOLARN, 2005). O controle biológico pode constituir uma opção promissora. *Trichoderma harzianum* tem se mostrado eficiente contra patógenos do solo em várias culturas, havendo evidências ainda que o mesmo também auxilia a promover melhor desenvolvimento da planta. Pesquisadores mostraram que há antagonismo entre *C. paradoxa* e *T. harzianum* em testes “in vitro”, através da formação de zona de lise e inibição micelial de *C. paradoxa*, em placas de Petri. As prováveis maneiras de inibição por *T. harzianum* são (i) parasitismo, predação e liberação de substâncias químicas, tais como trichodermina, quitinase, B-13-glucanase ou 6-pentil-a-pirona (TALUKDER; BEGUM; AZAD, 2007), ou ainda competição por nutrientes com o patógeno. Outra possibilidade pode ser a indução da resistência sistêmica da planta, quando em campo (EZIASHI et al., 2010). A comparação da eficiência em campo do bioagente (*T. harzianum*) e

Bavistin (fungicida) na germinação das gemas de plantio e na produtividade da cana-de-açúcar mostraram que, com ou sem fungicida, o bio-agente é opção eficiente (TALUKDER; BEGUM; AZAD, 2007).

Visto a eficiência de espécies de *Trichoderma* como controle biológico, foram avaliadas, ainda, na inibição micelial “in vitro” de *C. paradoxa*, toxinas liofilizadas e não liofilizadas de *T. viride*, *T. polysporum*, *T. hamatum* e *T. aureoviride*. Toxinas liofilizadas de *T. viride* e *T. polysporum* (70-100% concentração) mostraram-se mais eficientes que das demais espécies (EZIASHI et al., 2010).

Chaetomium spp. (*C. cupreum* e *C. globosum*) foram testados no antagonismo “in vitro” contra *T. paradoxa*, para possível uso como controle biológico da doença acarretada pelo patógeno em palma. Diâmetro da colônia de *T. paradoxa*, número de clamidiósporos e conídios foram os dados analisados. A formulação de peletes de *Chaetomium* (20g/planta) também foi utilizada para verificar a eficiência contra *T. paradoxa* em plantas infectadas, cujo uso de fungicidas não era possível, pois o patógeno havia se tornado resistente. “In vitro”, *Chaetomium spp.* foram eficientes no controle biológico, por competição (colônias de *Chaetomium* cresceram sobre as de *T. paradoxa*); em campo, plantas infectadas com *T. paradoxa* foram 75% menos infectadas, quando comparadas com grupo controle, após 30 dias (SOYTONG; PONGNAK; KASIOLARN, 2005). O uso de *Chaetomium spp.* no eficiente controle de *T. paradoxa* infectando palma sugere que o fungo pode ser eficiente também no controle de podridão abacaxi de cana-de-açúcar, dependendo do mecanismo de controle biológico realizado pelo agente.

Substâncias voláteis de plantas superiores têm provado serem tóxicas a fungos. Além disso, são biodegradáveis e inofensivas às culturas, podendo ser promissoras no controle de doenças. Óleos essenciais de diversas plantas foram avaliados e mostraram alta eficiência contra *C. paradoxa*, “in vitro”, todas causando 100% de inibição micelial em 1000 ppm. Como o óleo essencial de uma das plantas testadas, *Lippia alba*, se destacou na inibição micelial, suas propriedades físico-químicas foram determinadas, e testes mais aprofundados sobre a atividade fungitóxica foram realizados, com o objetivo de aplicar o óleo como fumigante. O óleo mostrou ser fungistático (não fungicida) e termolábil (termoestável). Os testes de estocagem e duração do óleo mostraram estabilidade ao longo do tempo.

“Piperitone” e “limonene” são os principais constituintes do óleo e foram individualmente testados contra *C. paradoxa*. Os resultados confirmaram “piperitone” como a fração fungitóxica ativa de *L. alba*, com ação fungicida em 200 ppm de concentração contra *C. paradoxa*. O óleo de *L. alba* e mais ainda “piperitone”, foram mais eficazes que vários fungicidas sintéticos, visto que a concentração mínima inibitória é muito maior para o óleo e o composto ativo. Além disso, concluiu-se que as propriedades fitotóxicas não causam danos à variedade CoSe 93232 utilizada nos testes (SINGH et al., 1999).

Outro trabalho realizado testou a atividade antimicrobiana de uma planta medicinal chinesa tradicional, *Stephania dielsiana*, contra diversos patógenos animais e vegetais incluindo o patógeno de cana *C. paradoxa* (crescimento e esporulação). Os resultados mostram que embora a atividade antifúngica dos compostos isolados da planta, stefanina e crebanina, não seja muito eficiente quando comparada com a de fungicidas atualmente usados, modificações ou reconstruções destas substâncias podem apresentar valor potencial (DENG et al., 2011).

4 BIOTECNOLOGIA

4.1 Biotecnologia e carvão

4.1.1 *Entendendo as respostas da planta e mecanismos de resistência*

Revisão sobre aspectos moleculares do causador de carvão em cana-de-açúcar, *S. scitamineum*, já foi realizada, embora muitos aspectos deveriam ser ainda esclarecidos à época, como da fisiologia da resistência ou suscetibilidade da planta ao carvão (SCHENCK, 1999). Recentemente, outra revisão foi realizada, focando proteínas de resistência como resposta de defesa da planta, lignificação da parede celular e agregação e inibição do movimento de esporos (LEGAZ et al., 2011).

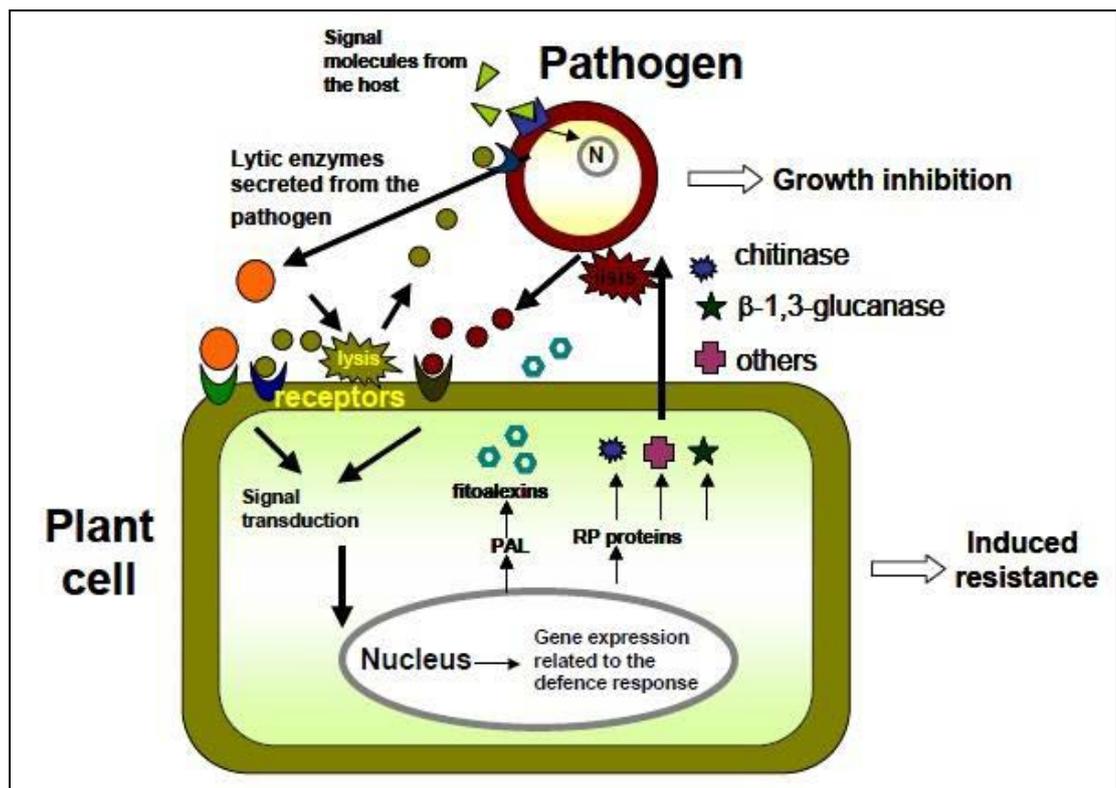
Os mecanismos ativos de resistência e a defesa durante uma relação parasitária são dependentes da capacidade de infecção do patógeno e da habilidade da planta para limitar este processo. A resistência é geralmente manifestada por meio de respostas de hipersensibilidade do hospedeiro, podendo resultar em morte celular no sítio de infecção, alterações estruturais, produção de moléculas antimicrobianas, ativação de vias de sinalização de resistência, regulação gênica, etc. Vias de sinalização envolvendo ácido salicílico, vias de tradução de sinais envolvendo etileno e jasmonatos como reguladores de diversos genes relacionados com a defesa do hospedeiro vêm sendo elucidados, o que tem esclarecido os mecanismos de sinalização e interações na planta. Métodos globais e para análise simultânea de vários genes (microarranjos) já foram realizados durante infecção (SCHENCK et al., 2000).

Pesquisadores fizeram uma correlação linear entre a concentração de substâncias glicosídicas e a resistência ao carvão, sugerindo um “screening” rápido de variedades de cana-de-açúcar resistentes. Elas foram identificadas durante o processo de infecção da cana-de-açúcar por *S. scitamineum*, e estão provavelmente envolvidas na inibição da germinação dos teliosporos na planta, o que ocorre em cultivares resistentes (LLOYD; NAIDOO, 1983).

Glicoproteínas também foram estudadas, devido à produção na parede celular de plantas resistentes à doença. Mostrou-se a inibição de teliosporos de *S.*

scitamineum por moléculas de média e alta massa molecular, além da aglutinação, o que geralmente impede a germinação. Neste mesmo estudo foi mostrado que o ácido salicílico pode agir como elicitador de respostas de defesa (FONTANIELLA et al., 2002). Outro trabalho mostrou ainda que estas glicoproteínas possuem atividade de quitinase, que degradam a parede celular do patógeno (teliósporos de *S. scitamineum*), em variedade resistente ao carvão (DE ARMAS, 2007 apud BLANCH, 2007).

Figura 13 – Comunicação química entre a célula da planta e o patógeno. Enzimas líticas são secretadas pelo patógeno para degradar a parede celular da planta, enquanto os produtos da lise são responsáveis por se ligar à parede celular (receptores) do patógeno. Metabólitos do patógeno ainda induzem a produção de proteínas de resistência e fitoalexinas, pela planta.



Fonte: (BLANCH, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) induzem a síntese de proteínas e a expressão gênica, liberando radicais livres de oxigênio que atuam na resistência à doença. Recentemente, a superóxido desmutase – Mn, uma das enzimas

responsáveis pela limpeza de ROS na planta, foi clonada e expressada; a alta expressão na planta infectada por *S. scitamineum* suporta mais a importância de ROS nos mecanismos de defesa (QUE et al., 2012). Outras substâncias, como fitoalexinas, de baixo peso molecular, podem também atuar como antimicrobianos no sítio de infecção e compostos fenólicos, embora já tenha sido detectado que, quando associados a poliaminas, esta atividade fungicida é anulada (LEGAZ et al., 1998).

Inicialmente, acreditava-se que a resistência da cana-de-açúcar ao carvão era determinada unicamente por características morfológicas da planta, já que embriões estruturalmente distintos, ou em fases diferentes de desenvolvimento, apresentavam diferentes níveis de resistência à doença (WALLER, 1970). Testes de resistência à doença por variedades de cana-de-açúcar mostraram que as plantas mais desenvolvidas apresentavam maior resistência a infecção por teliosporos de *S. scitamineum* que as mais novas, sugerindo a expressão da resistência somente em plantas bem desenvolvidas (CO et al., 2008), reforçando a ligação entre a morfologia e a resistência ao carvão. Talvez estes questionamentos tenham levado a estudos que determinavam ultraestrutura da germinação dos teliosporos de *S. scitamineum*, em 1984, embora os motivos não tenham sido esclarecidos na publicação (PAINE; HESS, 1984).

Em nível celular, a resposta da cana-de-açúcar à infecção por *S. scitamineum* inclui o aumento da lignificação da parede celular da planta, como uma forma de barrar estruturalmente a invasão, defesa contra precursores tóxicos e radicais livres; estudos que avaliaram a concentração de precursores da lignina no metabolismo da planta (p-coumaril, coniferil e sinapil) e a atividade de enzimas responsáveis pela síntese do polímero fenólico (Cinnamyl Álcool Desidrogenase e Sinapyl Álcool Desidrogenase) foram realizados, confirmando a importância do mecanismo na resistência (SANTIAGO et al., 2012).

A expressão diferencial analisada por cDNA-AFLP foi realizada na interação de *S. scitamineum* e cana-de-açúcar (tabela 2) (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005, LAO et al., 2008, QUE et al., 2011b, THOKOANE; RUTHERFORD, 2001). A expressão diferencial de mRNA é permitida com a incorporação de AFLP, em cDNA-AFLP; consiste em uma combinação das vantagens de RT-PCR e AFLP, conferindo

segurança e eficiência. É permitido analisar a expressão gênica durante processos bioquímicos e fisiológicos, através da análise e comparação de TDFs (fragmentos derivados da transcrição) (QUE et al., 2011b).

Em um dos estudos de cDNA-AFLP com cana-de-açúcar para verificar a expressão diferencial de genes após sete dias de infecção por *S. scitamineum*, foram identificadas proteínas quinases, especialmente importantes na transdução de sinais em tomate; uma das identificadas em cana-de-açúcar está envolvida na resistência à *Xanthomonas campestris pv. oryzae*. Um elicitor de quitina também foi identificado, e este já foi identificado com importância para os mecanismos de defesa em arroz, tabaco e tomate (THOKOANE; RUTHERFORD, 2001), tendo provavelmente importante papel na defesa em cana-de-açúcar.

cDNA-AFLP foi também utilizada para análises de expressão diferencial em variedades de cana-de-açúcar resistente e suscetível ao patógeno (*S. scitamineum*), analisada após cultivo e infecção (artificial) sob condições de campo. Foram verificados 62 “spots” diferencialmente expressos, sendo dez *down-* e 32 *upregulated*, quando analisada a variedade resistente. As homologias significativas para 11 TDFs foram obtidas: a maioria está relacionada à transdução de processos e defesa (como a quinase verificada no experimento realizado por Thokoane e Rutherford (2001)). Um gene codificante de proteína “NBS-LRR-like” também foi identificado, cujo produto possui estrutura típica de proteínas de resistência. Além disso, genes codificantes de enzimas da Via Fenilpropanoide também foram identificadas (envolvida na produção de fitoalexinas e ácido salicílico), além de ACC oxidase (catalisa a última etapa na síntese de etileno), fosfolipase “patatin-like”, cuja alta expressão foi identificada em tabaco infectado por patógenos necrotróficos, e uma proteína de ligação à auxina (GBEC32). Tendo em vista que o hormônio atua no crescimento e desenvolvimento da planta, genes relacionados ao metabolismo de auxinas são importante na defesa da planta. Para o experimento com plantas suscetíveis, expressão diferencial não foi significativa (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005).

Os autores sugerem que a superexpressão destes genes identificados em plantas suscetíveis pode auxiliar em sua resistência à doença. No entanto, dizem também que a transformação de cana-de-açúcar não é simples. A falha na

transformação neste sentido ocorre em muitas plantas, devido à complexidade das sinalizações de resistência a doenças, também pela diversidade de mecanismos de infecção pelo patógeno. Estes marcadores podem ser utilizados, no entanto, para identificação de plantas resistentes, quando a alta expressão for identificada (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005).

Outro experimento utilizando cDNA-AFLP teve objetivo de verificar os genes diferencialmente expressos logo após a infecção por *S. scitamineum* (0, 24 e 72 horas). Entre os “spots” obtidos, 92 TDFs foram diferencialmente expressos neste experimento, 64 sequenciados, sendo 29 “upregulated” após 24 e 14 após 72 horas (variedade resistente). Inibidores de quinases C, um fator de transcrição, um fator de transporte nuclear, uma H⁺ATPase, uma nucleotídeo-difosfato quinase e uma proteína desconhecida foram identificadas. Uma suposta RNA helicase reponsiva a etileno também foi identificada, e uma PR-5 (“pathogenesis-related”), além de genes de peroxidase e celulose sintase (LAO et al., 2008). Quinases, enzimas relacionadas com metabolismo de etileno, foram novamente verificadas (assim como em BORRÁS-HIDALGO et al., 2005).

Uma categorização funcional dos TDFs diferencialmente foi realizada e está apresentada em LaO et al. (2008). As principais ligações com os genes identificados são com o “oxidative burst”, vias de etileno e auxina, genes de defesa e de proteínas relacionadas com a patogênese, traduções de sinal e desenvolvimento celular, entre outros.

A expressão diferencial foi realizada também utilizando RT-PCR semiquantitativo e DDRT-PCR fluorescente, avaliando a infecção por *S. scitamineum* em cana-de-açúcar, imediatamente e após 6, 12, 24, 48 e 72 horas de infecção. Somente sete fragmentos foram considerados diferencialmente expressos. CCO (citocromo oxidase) foi identificada, por homologia com a enzima de *Oryzae sativa*. Além desta, uma proteína ribossomal, uma enzima málica NAD-dependente, uma aminotransferase, uma proteína de ligação a um elemento etileno-responsivo, um fator de iniciação transcricional específico da RNA polimerase e uma proteína de retrotransposon foram verificadas neste trabalho. Os fragmentos diferencialmente expressos na variedade resistente foram a enzima málica NAD-dependente, a

proteína ribossomal e também citocromo oxidase, esta última envolvida na síntese de fitoalexinas, importante para a defesa da planta (QUE et al., 2009).

Utilizando cDNA-AFLP e também “Silver Staining”, técnica que utiliza marcação com isótopo, a expressão diferencial foi verificada para NCo376 (altamente resistente a carvão), variedade chinesa, após infecção por *S. scitamineum*. 136 TDFs foram diferencialmente expressos (10,8% do total), sendo 91 polimórficos e 45 regulados positivamente. Reamplificação e RT-PCR foram realizadas para 40 TDFs, para os quais a expressão diferencial foi confirmada em 37 deles. Novamente, neste trabalho uma categorização funcional foi realizada. TDFs encontrados estão relacionados com os seguintes grupos funcionais: resgate e defesa celular, metabolismo energético, transporte intracelular, transdução de sinais, metabolismo de ácidos nucleicos, transcrição, modulação e síntese proteica, além de TDFs com função desconhecida (QUE et al., 2011b).

Tabela 2 – Modulação gênica após infecção por *S. scitamineum*, em variedades resistentes de cana-de-açúcar.

Técnica de expressão diferencial	Amostragem (tempo)	Variedade resistente	Genes “up”	Genes “down”	Referência
cDNA-AFLP	Após 7 dias	N52/219	-	-	THOKOANE; RUTHERFORD, 2001
cDNA-AFLP	Dois meses	Ja S-44	52	10	BORRÁS-HIDALGO, 2005
cDNA-AFLP	0h, 24 e 72 horas	M31/45	29	6	LAO et al., 2008
RT-PCR semiquantativo	0h, 6, 12, 24, 48 e 72 horas	NCo376	-	-	QUE et al., 2009
cDNA-AFLP	0h, 6, 12, 24, 48 e 72 horas	NCo376	36	-	QUE et al., 2011b
2-DE e Maldi-Tof-Tof/MS		NCo376	11	9	QUE et al., 2011a

A genética reversa é uma ferramenta-chave no estudo de patogênese, visto que o conhecimento das sequências de DNA, somente, não esclarece muito sobre a função gênica, redes de regulação e vias metabólicas. As técnicas de proteômica e de manipulação genética, como o nocaute e silenciamento gênicos, indução a mutações, têm auxiliado bastante neste entendimento (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ;

PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010). A Proteômica (análise das proteínas) na interação entre *S. scitamineum* e cana-de-açúcar já foi realizada (QUE et al., 2011a).

A análise de expressão diferencial utilizando proteômica foi realizada utilizando 2-DE (eletroforese bidimensional) e espectrometria de massas (Maldi-tof-tof/MS), para uma variedade suscetível e uma resistente a *S. scitamineum*. Tanto na variedade suscetível, como na resistente, não só houve o aumento da expressão de diversas proteínas, como também o aumento do número de “spots”, ou seja, passaram ou deixaram de expressar. Foram 23 proteínas diferencialmente expressas, 11 “up” e nove “downregulated”, sendo as demais induzidas somente após infecção. Após categorização funcional, as proteínas foram divididas nos seguintes grupos: proteínas relacionadas à síntese proteica, proteínas da transdução de sinal, proteínas relacionadas à fotossíntese, proteínas com outras funções e aquelas com funções desconhecidas (QUE et al., 2011a).

4.1.2 *Aplicando os conhecimentos para entender a epidemiologia da doença e verificar a diversidade do patógeno*

Fungos podem ter seus esporos dispersos por centenas de quilômetros de distância. Assim, patógenos de plantas podem se estabelecer em novas regiões onde o clima é favorável e contaminar variedades suscetíveis. A dispersão intercontinental de microrganismos pode acarretar infecção de plantas em uma escala global. Um exemplo de dispersão estudada para cana-de-açúcar é de *P. melanocephala* (ferrugem) (BROWN; HOVMOLLER, 2002). Carvão constitui importante doença neste sentido, visto que os teliosporos de *S. scitamineum* são expostos ao ar e podem se dispersar em longas distâncias a partir dos soros aéreos formados na planta infectada.

Métodos de biologia molecular permitem verificar a diversidade populacional do patógeno (raças); isto é importante para promover estratégias de manejo da doença e também desenvolver variedades resistentes (ABD EL FATTAH et al., 2010). Análise da estrutura populacional pode auxiliar na identificação de fontes de resistência, esperado em áreas onde as diversidades do patógeno e hospedeiro são máximas. Estas análises poder ser usadas para avaliar a importância relativa de

fatores como recombinação genética e fluxo de genes na evolução dos patógenos. Relacionando com sistemas sexuais e modelos de dispersão, é possível uma contribuição ao desenvolvimento de resistentes (cana) e estratégias de manejo (RABOIN et al., 2007).

Pesquisadores diferenciaram as raças de *S. scitamineum* que infectam cana-de-açúcar em diversas regiões do Egito, utilizando a técnica de RNA fingerprint utilizando iniciadores arbitrários (RAP). O RNA foi preparado e foi sintetizado cDNA, a partir do qual a PCR foi realizada com iniciadores de amplificação do gene de quitinase. Dentre doze isolados de *S. scitamineum*, foram identificadas dez diferentes raças do patógeno no país (ABD EL FATTAH et al., 2010). Os pesquisadores sugerem a técnica para distinção de indivíduos geneticamente muito próximos.

A técnica de AFLP foi também realizada, com digestão utilizando enzimas BamHI e MseI, seguido da ligação de seus adaptadores e da PCR com um dos 16 iniciadores Bam.Pxx e um dos quatro Mse.Pxx marcados com fluorescência. A variação genética de *S. scitamineum* foi determinada entre 38 isolados de diferentes regiões do planeta, em especial da região asiática, devido à proximidade da região onde o trabalho foi desenvolvido (Austrália). Isolados das regiões da Flórida, Louisiana, Mauritius, Sul da África, foram ainda analisados com fungos isolados em um período de 16 anos de diferença. A análise filogenética resultante do trabalho determinou quatro grupos, baseados em suas origens geográficas: (i) Noroeste Australiano e Indonésia, (ii) Américas, (iii) Africano e (iv) Asiático. Entre os três primeiros grupos, a divergência entre os isolados foi de um a sete fragmentos polimórficos; para o quarto grupo, 12 a 40 perfis polimórficos foram identificados (BRAITHWAITE et al., 2004).

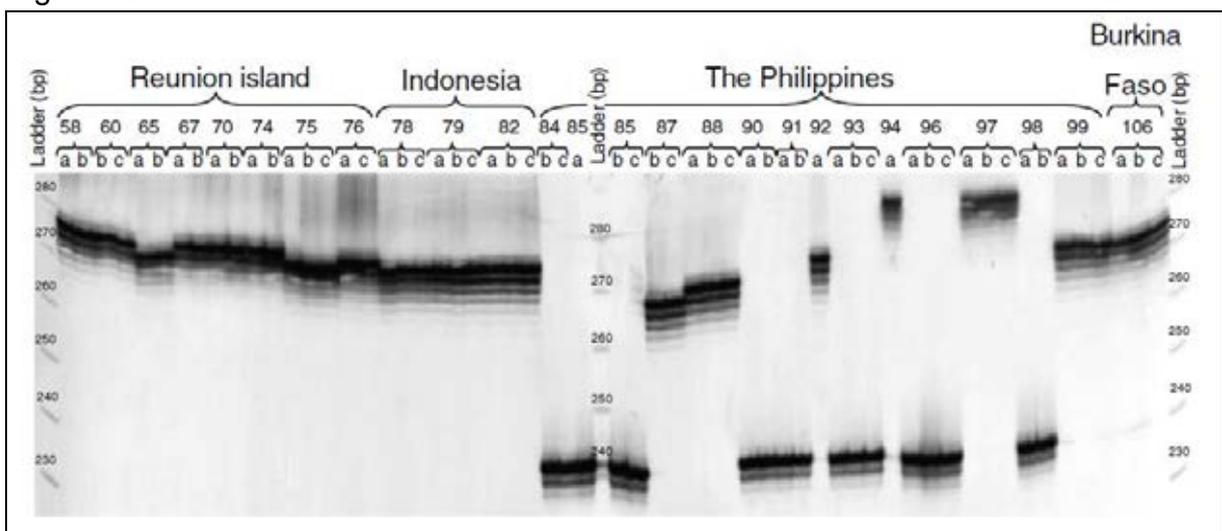
Pequena variação genética foi verificada entre 31 isolados. Sete isolados de Taiwan, Filipinas e Tailândia foram os mais divergentes. Variações genéticas não foram detectadas para isolados da mesma indústria, entre 1984 e 16 anos depois (2000-2001), sugerindo que para o fungo a mudança genética é “lenta”. Nenhuma variação genética foi detectada também entre isolados da Indonésia e Austrália (BRAITHWAITE et al., 2004).

Os resultados sugerem que a origem de *S. scitamineum* na Ásia pode explicar maior diversidade genética nesta região. Além disso, Taiwan parece ser uma região com uma diversidade de raças do patógeno não usual, maior que em outras regiões do planeta, como verificado também no Havaí, em trabalho anterior (BRAITHWAITE et al., 2004), também citado neste trabalho (SCHENCK, 2003).

Microsatélites (ou SSR – “Simple Sequence Repeats”) foram também utilizados objetivando descrever a diversidade genética entre várias populações de *S. scitamineum*, estabelecer relações genéticas entre populações com diferentes origens geográficas e inferir modo de reprodução para as mesmas (RABOIN et al., 2007).

Para tanto, 77 chicotes de cana-de-açúcar foram obtidos de regiões de cultivo em 15 diferentes países, na (i) América: entre eles Brasil, Colômbia, Guadalupe e Estados Unidos; (ii) Ásia: Índia, Indonésia, Japão, Filipinas e Tailândia; (iii) África: Burkina Faso, Mauritius, Réunion, Senegal e África do Sul. 22 loci de SSR de *S. scitamineum* foram analisados, de 142 isolados a partir dos chicotes obtidos. Cinco SSR não eram polimórficos; os 17 outros amplificaram 53 alelos distintos, sendo cerca de 3,1 alelos por locus. Os alelos distribuem-se em 22 genótipos diferentes (RABOIN et al., 2007).

Figura 14 – Perfil de microsatélites para isolados de *U. scitamineum* de diversas regiões diferentes.



Fonte: (RABOIN et al., 2007).

Os resultados sugerem que o fungo se reproduz principalmente por autofecundação e que populações do fungo são principalmente compostas de linhagens genéticas. A maior diversidade genética foi encontrada em populações do patógeno na Ásia, principalmente nas Filipinas; em contraste, populações da América e África esta diversidade é extremamente baixa (figura 14).

Em Braithwaite et al. (2004) e Raboin et al. (2007) verificou-se que na Ásia (inclusive Filipinas), a diversidade genética é grande, quando comparado com outras regiões do planeta. Nas Filipinas, a variabilidade do patógeno foi então verificada utilizando ferramentas de Biologia Molecular, patogenicidade e também abordagens morfológicas. A grande variedade sugere que esta região é o centro de origem de carvão em cana-de-açúcar no mundo (LUZARAN et al., 2012).

4.1.3 Aplicando os conhecimentos na detecção precoce da doença

Um método de Biologia Molecular para detecção de *S. scitamineum* em cana-de-açúcar pode ser utilizando iniciadores para amplificar genes/regiões específicas (PCR) de espécies de *Ustilago*. *U. maydis*, causador de carvão em milho e bastante estudado, possui um gene homólogo ao de *S. sporisorium* em seu sistema sexual, denominado bE (ver “Reprodução de *S. scitamineum*”). Utilizando iniciadores bE4 e bE8, que amplificam esta região, pesquisadores testaram a PCR na detecção, que mostrou ser específica e sensível (pouca quantidade de DNA) para *S. scitamineum*, sozinho ou com tecido de cana-de-açúcar. No entanto, neste experimento não foi possível saber se nas plantas em que o patógeno foi identificado, seriam posteriormente formados os chicotes de carvão. Interessante foi verificar a especificidade dos iniciadores (*Bipolaris sacchari*, *C. paradoxa* e *Xanthomonas albilineans*, por exemplo, não são amplificados) (ALBERT; SCHENCK, 1996).

A técnica de “Southern blot” consiste na hibridização de amostras de DNA. Os “amplicons” da PCR para o gene bE de *S. scitamineum* hibridizaram com uma única banda em “Southern blot” para amplificação de suas fases haploides (“mating-types”). Além disso, foram hibridizados fragmentos em cana-de-açúcar infectada com carvão e também do fungo na fase de hifa dicariótica (infecciosa). Assim, estes iniciadores (originalmente utilizados para amplificar bE em *U. maydis*) indicaram a

possibilidade de utilização no diagnóstico de carvão sistematicamente infectada e sem sintomas visíveis (SCHENCK, 1999).

“Nested-PCR” (pares de iniciadores) também foi utilizado. O estudo mostrou que a técnica, utilizando amplificação de ITS, seguido de regiões variáveis dentro da mesma (iniciadores SL1 e SR2), possui alta especificidade para a raça de *S. scitamineum* (não amplificando outros organismos) e, ainda, alta sensibilidade, visto que as bandas de DNA foram amplificadas mesmo com uma concentração muito baixa de DNA. A técnica pode ser aplicada em períodos de quarentena, no desenvolvimento de cultivares resistentes e produção de toletes livres do patógeno (SHEN et al., 2012). É importante ressaltar que a partir do momento que região ITS foi determinada como “barcode” universal para fungos (SCHOCH et al., 2012), ela será muito importante para os próximos trabalhos em Biotecnologia, na área de detecção e diagnóstico de doenças fúngicas de cana-de-açúcar.

4.1.4 Engenharia Genética: aplicando os conhecimentos para a defesa da planta

Revisão recente mostra o papel de genes antifúngicos na conferência de resistência para plantas cultivadas, principalmente genes que degradam a parede celular de fungos, tais como quitinases e glucanases. Gene “trochosantin”, uma proteína antifúngica de *Aspergillus giganteus* e genes antifúngicos sintéticos, além de outros, são também mencionados. Alguns exemplos de plantas geneticamente modificadas para resistir a doenças fúngicas são tabaco, arroz, uva, amendoim, entre outros (CEASAR; IGNACIMUTHU, 2012).

Plantas transgênicas de cana-de-açúcar já foram desenvolvidas para conferir resistência à doença (carvão), principalmente com expressão de genes codificadores de quitinases (glicosil hidrolase que cliva ligações β -1,4) e B-1,3-glucanase (JIAO et al., 2009). Via bombardeamento de partículas, uma variedade comercialmente importante na Tailândia (Phil 66-07), mas suscetível a doenças fúngicas, também foi transformada com gene de quitinase (KHAMRIT; JAISIL; BUNNAG, 2012).

Técnicas “in vitro” de indução de mutações são maneiras de provocar variabilidade genética em cana-de-açúcar, a fim de obter variedades resistentes, o

que com técnicas convencionais seria dispendioso, demandaria muito tempo. Na Índia, a variedade CoC 671, bastante cultivada, apresenta maturação precoce e alto conteúdo de açúcar. No entanto, a desvantagem apresentada é que a mesma não é resistente ao carvão. A exploração de seus soma clones foi realizada para “screening” por resistentes a carvão. No final do experimento, TC 906 e TC 922 foram os soma clones obtidos que apresentaram resistência total ou moderada a doença. Os autores anotaram as diferenças morfológicas verificadas nestes soma clones, quando comparado à variedade original utilizada nos experimentos (CoC 671), sugeriram, em seguida, que estas plantas sejam utilizadas em programas de hibridização e incentivam a exploração de variações em soma clones para a busca por plantas resistentes a doenças, como obtido nestes experimentos (DALVI et al., 2012).

4.2 Biotecnologia e podridão-abacaxi

4.2.1 Revisão de literatura

Embora muitos estudos em Biotecnologia tenham sido realizados para estudar carvão (*S. scitamineum*) em cana-de-açúcar, até o momento, tais como análises de expressão diferencial de genes (antes e após infecção), estudos populacionais do patógeno (polimorfismos, por exemplo) ou visando a detecção precoce da doença (utilizando PCR, por exemplo), pouquíssimos trabalhos foram realizados para estudar podridão-abacaxi (*C. paradoxa*). Trabalhos recentes, no entanto, já foram realizados para estudo de outros patógenos (e interações com hospedeiro) do mesmo gênero com outras culturas de importância global, os quais podem abrir possibilidades de aplicação de biotecnologia também em estudos que envolvem cana-de-açúcar e *C. paradoxa*.

Tendo em vista a importância do gênero *Ceratocystis* como fitopatógenos, um método para rápida identificação de suas espécies foi desenvolvido utilizando PCR, através da amplificação de toda a região ribossomal seguida de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”). Pode-se distinguir, desta forma, diversas espécies do gênero, mas não foi possível separar *C. paradoxa* de *C. adiposa*, por exemplo.

Após seqüenciamento, a seleção da LSU (“large subunit”) para filogenias foi feita (árvore mais parcimoniosa) e apresentaram *C. paradoxa* como muito proximamente relacionado com *C. radícicola*, patógeno de palma (WITTHUHN et al., 1999). Em geral, utilizando as técnicas em conjunto, pode-se esclarecer algumas questões taxonômicas do gênero. No entanto, embora o estudo tenha incluído *C. paradoxa* nas análises, estudos mais específicos para a espécie devem ser realizados para análises populacionais.

Em seguida, alguns estudos já realizados para patógenos de importância econômica no gênero *Ceratocystis*, serão reportados, com a ideia de apresentar possibilidades de estudo para podridão-abacaxi em cana-de-açúcar que envolvem Biotecnologia. Os estudos podem ter como objetivo o estudo de populações, a expressão gênica, a detecção da doença, cuja importância tem amplitude desde a decisão de o manejo da doença até a aplicabilidade prática de técnicas para detecção em laboratórios de Fitopatologia.

Estudos populacionais já foram realizados, por exemplo, para *C. fimbriata*. O patógeno, causador de murchas, cancrios e podridões (BAKER et al., 2003), também acomete eucalipto, por exemplo, causando sua murcha em diversas regiões da Austrália, América do Sul e África (BARNES et al., 2003; ROUX et al., 2000). Amplificação utilizando PCR da região ITS (incluindo 5.8S) já foi utilizada já para estudar populações do fungo infectando hospedeiros na América do Sul (BAKER et al., 2003), e também para estudos populacionais de isolados na América do Sul e Índia (WYK, 2005). Outro estudo populacional de populações de *C. fimbriata* (*C. fimbriata* f.sp. *platani*) na Itália utilizou técnicas de RAPD e marcadores minissatélites (SANTINI; CAPRETTI, 2000).

No Brasil, a diversidade genética de populações de *C. fimbriata* infectando diversos hospedeiros (tais como manga e eucalipto) foi estudada também, utilizando microsatélites (FERREIRA et al., 2010). Já que não há estudos de populações de *C. paradoxa*, uma possibilidade é utilização de técnicas como as reportadas para *C. fimbriata*, para análises populacionais do patógeno de cana. Tendo em vista que *C. paradoxa* não infecta somente cana de açúcar, mas também palma, por exemplo, estudos como estes podem contribuir ainda para o manejo e entendimento de doenças causadas pelo mesmo patógeno em outras culturas de importância.

Além de estudos populacionais, estudos em Biotecnologia que possibilitam a análise de expressão diferencial também são importantes para a Fitopatologia (como foi verificado para carvão). Um exemplo de análise de diferença de expressão foi realizado por Fossdal et al. (2012), que analisou a diferença de expressão em genes de resistência, de marcadores de resistência e também de miRNAs, em beto infectado por *C. polonica*, patógeno da planta na Europa.

Estudos envolvendo biotecnologia já permitiram também aplicação em detecção de doenças causadas por *Ceratocystis spp. C. platani*, patógeno de *Platanus*, foi inicialmente reportado causando doença em árvores nos EUA e, posteriormente, na Europa. Estudos avançados em biotecnologia utilizando PCR em tempo real já foram utilizados para detecção sensível do patógeno (PILOTTI et al., 2012). PCR em tempo real e nested-PCR (como já verificado para carvão) também já foram utilizados para detecção rápida e acurada de *C. fagacearum*, patógeno de carvalho nos EUA (WU et al., 2009). Estudos como estes poderiam ser realizados para análise da interação entre cana-de-açúcar e *C. paradoxa*, assim como possível aplicação na detecção da doença, aplicando em campo. Deve-se atentar, no entanto, ao custo da implementação de técnica como esta na aplicação na Agronomia.

Estes e outros trabalhos presentes na literatura nos abrem um leque de possibilidades para investimento em estudos de Biotecnologia da interação de cana-de-açúcar e *C. paradoxa*.

4.2.2 Possíveis aplicações biotecnológicas do patógeno

A produção de aroma é característica marcante da espécie, sendo o odor de abacaxi maduro uma das características marcantes da planta, quando infectada pelo patógeno. *Ceratocystis moniliformis*, outra espécie do gênero, também já foi estudada quanto a produção de aromas; verificou-se que, de acordo com a fonte de Carbono e Nitrogênio ao qual se submete a cultura, diferentes aromas são produzidos, como de banana, limão, pêsego, etc. Quando Leucina, Isoleucina e Nor-leucina, por exemplo, foram utilizadas como fontes de Nitrogênio para o cultivo do fungo, verificou-se um aroma intenso de banana madura. O autor do trabalho

sugere que o mesmo pode ser um bom sujeito experimental para o estudo da biossíntese de monoterpenos e outras substâncias de importância na indústria de produtos alimentícios, responsáveis pelo “flavour” e essência. Ele pode ser ainda importante fonte de enzimas para catalisar a síntese de substâncias a partir de substratos baratos e abundantes (aproveitamento de resíduos) (LANZA; KO; PALMER, 1976).

Visto a proximidade das espécies, é possível que *C. paradoxa* seja promissor na conversão de bagaço de cana-de-açúcar, resíduo agro-industrial abundante, nestes produtos de importância econômica.

Por constituir um fungo patógeno, há necessidade de mecanismos de hidrólise da parede celular da planta, para posterior infecção da mesma. Hemicelulase-1 extracelular de *C. paradoxa* já foi purificada e caracterizada, assim como foi descrito o seu modo de ação sobre diversas fontes de hemicelulose. A enzima degrada hemicelulose B (arabino-4-O-metilglicuranoxilano) e arabinoxilano em arabinose, xilose e xilobiose, além de uma mistura de arabinoxilose e oligossacarídeos de xilose (DEKKER; RICHARDS, 1975). Tendo em vista que o fungo é patógeno de cana-de-açúcar e produz as referidas enzimas, pode constituir um possível bom produtor de hidrolases dos sacarídeos presentes em cana-de-açúcar, na produção de etanol de segunda geração.

5 MUDANÇAS CLIMÁTICAS GLOBAIS

5.1 Aspectos gerais das Mudanças Climáticas Globais

Mudanças climáticas globais (MCG) se referem ao clima, terra, oceanos, composição atmosférica e química, e sistemas ecológicos que influenciam o ambiente global, mudanças no planeta e mudanças climáticas. A interação entre as “-feras” (atmosfera, hidrosfera, criosfera e biosfera) à medida que são guiadas pela radiação solar tem construído nosso clima terrestre (CHAKRABORTY et al., 2008). Mudança climática corresponde ao processo de mudança no clima devido a atividades antrópicas; ela se difere de variabilidade climática pelo fato que a última decorre de processos naturais do planeta e das interações entre eles (SANGUINO, 2008). A previsão do IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) para o final do século XXI é de aumento em 1,4 a 5,8°C. A frequência e intensidade de eventos climáticos extremos têm sido registradas, além da alteração no regime de chuvas, perturbação nas correntes marítimas, derretimento das geleiras e aumento do nível dos oceanos (SANGUINO, 2008).

5.2 Fatores alterados pelas Mudanças Climáticas Globais

Nuvens, aerossóis, poeira e outras partículas são agentes que refletem a radiação. Vapor d'água e diversos componentes da atmosfera como CO₂, CH₄, N₂O e O₃ são responsáveis por tapar a radiação que é refletida, amenizando então a temperatura do planeta (chamado Efeito Estufa). Atividades do homem têm contribuído para aumentar a concentração destes componentes, como o aumento de CFCs (clorofluorcarbonetos) e, juntamente com mudanças na cobertura do planeta, contribuem para o efeito estufa (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

Há estudos que mostram que do século XVIII até 1994, a concentração de CO₂ aumentou de 280 para 358 ppm (cerca de 30%). Para N₂O este aumento foi de 145% e CH₄, 15% (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

Embora o aumento ou diminuição de precipitações é especificidade de cada região, em geral vapor d'água, evaporação e precipitação são fatores que têm, em

média, aumentado. É predito que a precipitação aumentará tanto no verão como no inverno para regiões de alta latitude. Na África tropical, por exemplo, ela tende a aumentar no inverno. No sul e leste da Ásia as precipitações tendem a aumentar. Na África, América Central e Austrália as chuvas no inverno tendem a diminuir (GARRETT et al., 2006).

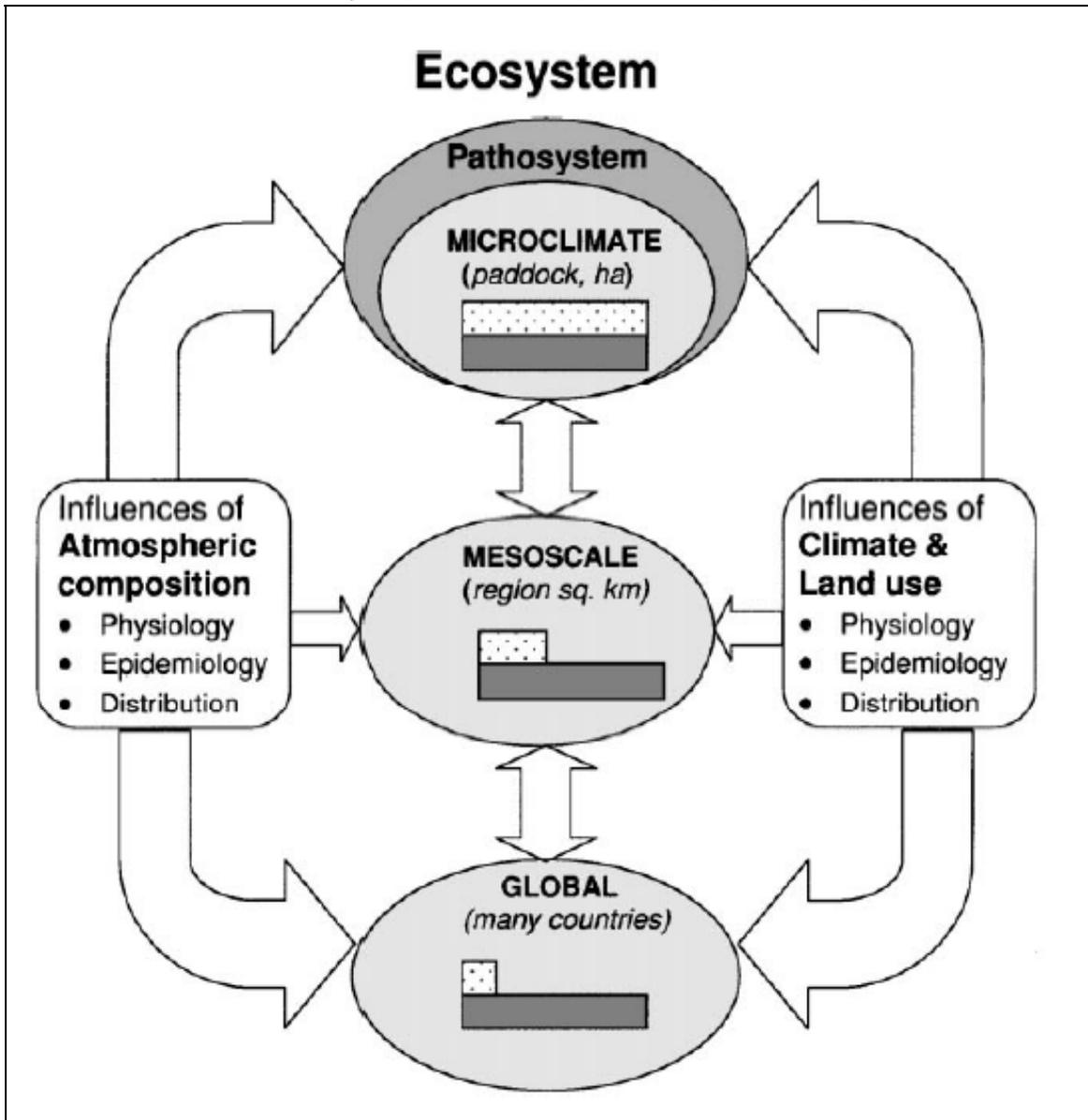
5.3 Mudanças Climáticas Globais e a ocorrência de doenças

Para avaliar o impacto das MCG sobre a ocorrência de doenças, deve-se levar em consideração o impacto sobre a estrutura e dinâmica de populações de plantas, entendimento dos processos microevolutivos e da estrutura das comunidades de plantas (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000). Um resumo das principais influências e níveis de entendimento (até 2000) sobre influências das MCG sobre ocorrência de doenças é apresentado na figura 15. Para monoculturas de cultivo intensivo, como a cana-de-açúcar, é relativamente mais simples de determinar estes impactos. Há estudos sobre os impactos de temperatura e concentração aumentada de CO₂ sobre fisiologia de plantas em culturas de milho, trigo, soja e arroz, mas em nenhum deles são avaliadas doenças (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

Entre efeitos diretos, a morfologia e fisiologia alteradas da planta alteram a interceptação de luz, há modificação da estrutura e microclima, o que influencia epidemiologia de doenças. Algumas doenças reduzem o crescimento da planta sob condições normais ou sob alterações na concentração de CO₂. Em geral, quando as alterações induzem o aumento da densidade de plantas em nível individual, por exemplo, há tendência de aumento na umidade foliar e também de sua duração, o que favorece a infecção por patógenos foliares (não é nosso caso) (GARRETT et al., 2006).

O aumento da concentração de CO₂ resulta em mudanças na estrutura da planta. O aumento no número de folhas e de suas espessuras, aumento no diâmetro de ramos e tecidos são exemplos registrados. Fisiologicamente, o aumento da taxa fotossintética, alteração na eficiência de uso da água e danos reduzidos por exposição ao ozônio (GARRETT et al., 2006).

Figura 15 – Resumo das principais influências decorrentes de mudanças na composição atmosférica, uso da terra e clima, sobre doenças de plantas. O nível de entendimento sobre doenças (caixa branca) e clima (caixa cinza) até 2000.



Fonte: (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

A ocorrência de doenças devido a fatores ambientais resulta no conceito de predisposição, que atua durante o período de infecção e colonização do patógeno na planta (AMORIM, 2011). Revisões sugerem que impactos das MCG serão verificados em três áreas: mudanças nas perdas devido a doenças, na efetivação de estratégias de manejo e distribuição geográficas das doenças (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

O manejo de doenças é bastante influenciado pelas MCG, já que a eficiência de produtos químicos depende das condições climáticas que prevalecem (duração, intensidade e frequência de precipitação, por exemplo). Alguns experimentos mostram também que a duração de chuvas pós-aplicação é crítica. Chuvas podem aumentar a distribuição de fungicidas, mas por outro lado podem diminuir a concentração quando a aplicação é foliar (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

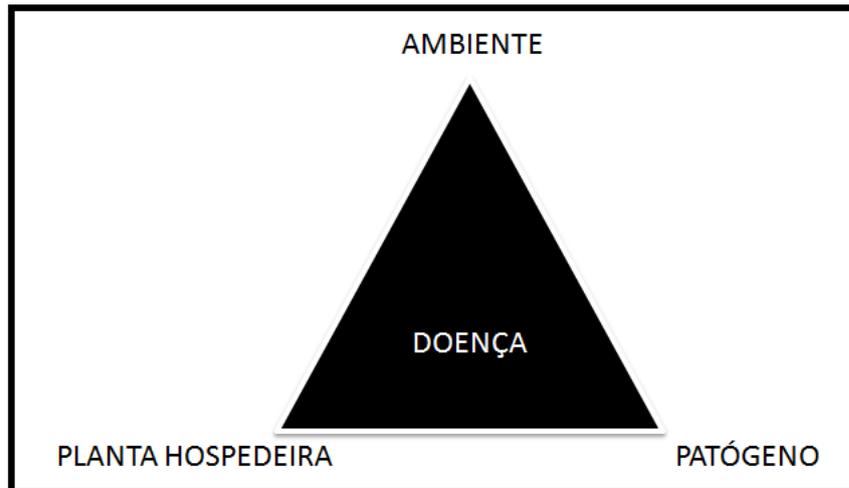
Alterações climáticas podem alterar também a estrutura de comunidades na filosesfera e rizosfera de agentes de controle biológico (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000).

Aumento da concentração do ozônio parecem aumentar a ocorrência de doenças de plantas por fungos necrotróficos, causadores de podridões de raiz e “bark beetle” (GARRETT et al., 2006).

Alguns autores consideram ainda a influência do clima sobre todos os estágios do ciclo de vida do patógeno e do hospedeiro (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000). O ciclo primário da doença e até mesmo uma epidemia podem ser por eles determinados, assim como podem ter efeitos favoráveis e desfavoráveis ao patógeno (sobrevivência e desenvolvimento). Os fatores climáticos que atuam na predisposição a doenças são: umidade, temperatura, luz e vento (AMORIM, 2011). A importância do ambiente é conhecida há séculos; gregos antigos (370-286 a.C.), por exemplo, reconheceram que em altitudes mais altas a incidência de doenças em cereais era menor que em altitudes menores. Um triângulo clássico que estabelece condições para ocorrência de doenças (SANGUINO, 2008) está representado na figura 16.

Os impactos das MCG sobre a ocorrência de doenças podem ser positivos, negativos ou neutros, pois elas podem diminuir, aumentar ou não ter efeito sobre diferentes problemas fitossanitários, em cada região (SANGUINO, 2008).

Figura 16 – Triângulo de doença: interação entre os elementos fundamentais que determinam a ocorrência de uma doença de planta.



Fonte: (SANGUINO, 2008).

As mudanças climáticas globais podem influenciar a ocorrência dessas doenças, atuam nos seguintes aspectos: (i) alteração na distribuição geográfica dos patógenos; (ii) perda de resistência genética de determinados cultivares resistentes às doenças, devido à aceleração na multiplicação e disseminação de determinados patógenos (aumento do CO₂ e incidência de luz U.V.) (SANGUINO, 2008). Outro fato é que as plantas podem apresentar modificações estruturais e fisiológicas, em resposta a estas mudanças climáticas, tais como o espessamento da parede celular e a produção de ceras na epiderme das folhas em decorrência do aumento da concentração de CO₂ na atmosfera (FUHRER, 2003). Pode haver mudanças em decorrência de alterações climáticas que não são necessariamente negativas; este aumento da deposição de parede celular pode constituir uma barreira física a mais, contra a invasão do patógeno. Por outro lado, o aumento de CO₂ pode acarretar o aumento de umidade acumulada no “canopy”, levando a condições mais favoráveis para a sobrevivência dos patógenos. Quanto ao crescimento da planta: o aumento de CO₂ pode levar, por um lado ao aumento da taxa fotossintética e conseqüente maior crescimento da planta, gerando maior biomassa e reservatório para o patógeno colonizar e se multiplicar (FUHRER, 2003). Por outro lado, observamos que em alguns casos, o desenvolvimento acelerado da planta pode evitar a ocorrência da doença.

Doenças infecciosas emergentes (EIDs) são causadas por patógenos que têm aumentado sua incidência, tanto no âmbito de infecção de uma variedade maior que hospedeiros, como geograficamente. A mudança da maneira como se dá a patogênese e também a evolução do patógeno, ou a descoberta de novos patógenos também caracteriza doenças infecciosas emergentes. A evolução do patógeno (como *Puccinia kuehnii*, na Austrália) para alguns casos de cana-de-açúcar leva a suscetibilidade de variedades anteriormente resistentes e acarreta perdas econômicas (ANDERSON et al., 2004).

Entre os principais patógenos acarretando EIDs, os fungos representam 30%. Alguns fatores citados como mais importantes para a ocorrência de EIDs em plantas são introdução do patógeno. Condições do tempo são também importantes e têm relação com a sensibilidade da planta à umidade, mistura do solo, e também às respostas do patógeno. A influência do fator “introdução de patógenos” é maior para vírus, enquanto condições climáticas são fatores muito importantes e mais relevantes para o desenvolvimento de EIDs fúngicas e bacterianas. A população de vetores é mais importante, obviamente, para doenças virais (ANDERSON et al., 2004).

Tanto o fato dos fungos representarem grande porcentagem dos responsáveis por EIDs em plantas, como o fato de mudanças ambientais serem fatores significativos para ocorrência de doenças fúngicas justificam a existência de um capítulo dedicado às influências de MDG na ocorrência de doenças fúngicas.

Muitas mudanças relacionadas às EIDs são relacionadas eventos climáticos, cuja frequência e severidade são geralmente atribuídos às ações antropogênicas. As complexidades das MCG e das respostas bióticas às mesmas fazem com que previsões para o futuro sejam dificultadas. Alguns exemplos de mudanças climáticas que podem levar à ocorrência de EIDs (fúngicas) são o aumento nas precipitações e o estresse de temperatura em plantas. Há sugestões de que temperaturas mais altas durante a noite, invernos mais amenos e médias mais altas gerais de temperatura levarão à aceleração do ciclo de vida dos patógenos, aumento da esporulação e infecção de fungos foliares (estômatos) (ANDERSON et al., 2004).

5.4 Mudanças Climáticas Globais e métodos de avaliação

Algumas revisões têm sido feitas sobre as técnicas para avaliação de acréscimo de CO₂ no ar atmosférico sobre a fisiologia de plantas, como FACE (Free-Air CO₂ Enrichment) (NOWAK; ELLSWORTH; SMITH, 2004, LEAKEY et al., 2009). No entanto, em geral os experimentos costumam avaliar somente alguns fatores (um ou dois) e em um curto período de tempo, além de não apresentarem as condições de campo onde o patossistema normalmente ocorre (GARRETT et al., 2006).

Temperatura, precipitação e concentração de gases (gás carbônico e oxigênio) são alguns dos aspectos considerados quando estudamos a influência das mudanças climáticas globais sobre a ocorrência de doenças, visto a influência de tais fatores tanto na fisiologia da planta, como sobre a do patógeno. A análise multifatorial (envolvendo dois ou mais destes fatores) e mimetizando condições como seca, inundações e aquecimento são mais eficientes na avaliação e há alguns métodos existentes (GHINI; BETTIOL; HAMADA, 2011).

A alta concentração de gás carbônico, por exemplo, ocasiona maior produtividade para a maioria das plantas, visto o fenômeno de fotossíntese (GHINI; BETTIOL; HAMADA, 2011), o que ocorre com a cana-de-açúcar, por exemplo (DE SOUZA et al., 2008). No entanto, em alguns casos (batata), o aumento do CO₂ acarreta em sensibilidade dos estômatos e a produtividade é, então, diminuída. Para plantas tropicais, como a cana-de-açúcar, ainda não foram avaliados os efeitos da alta concentração de gás carbônico, quando a planta é submetida às doenças, para verificar qual a influência sobre a infecção, colonização do patógeno, etc. (GHINI; BETTIOL; HAMADA, 2011).

Muitos trabalhos apresentam modelos sobre a influencia de mudanças climáticas em curto prazo sobre a ocorrência de doenças; no entanto, poucos ligam a prevalência ou severidade de doenças ligadas aos dados de mudanças climáticas em longo prazo. Alguns exemplos são trabalhos recentes utilizando métodos de PCR, que mostraram a influência de fatores climáticos como as chuvas no inverno, temperaturas do verão e a emissão de SO₂ no período de cultivo sobre a ocorrência de dois patógenos de trigo: *Phaeosphaeria nodorum* e *Mycosphaerella graminicola* (160 anos). Outro mostrou que efeitos de mudanças climáticas, juntamente com a

ausência de rotação de culturas, tem sido ligados à ocorrência e aumento recentes de doenças da batata (69 anos). Um outro estudo (avaliando variações entre 40-50 anos), ainda, relacionou o aumento das chuvas no verão a ocorrência de *Dothistroma septosporum* em *Pinus contorta* var. *latifolia* (CHAKRABORTY et al., 2008).

5.5 Mudanças Climáticas Globais e as doenças de cana-de-açúcar

As mudanças climáticas globais têm influencia na ocorrência de doenças de plantas tropicais e subtropicais. Inicialmente, acreditava-se que plantas C₄, como a cana-de-açúcar, não eram afetadas pelo aumento de CO₂ atmosférico (ou menos que as C₃), já que a atmosfera era saturada para estas plantas. No entanto, tem sido verificado que o aumento na concentração de CO₂ acarreta em aumento significativo das taxas fotossintéticas em C₄ e biomassa (DE SOUZA et al., 2008). Para cana-de-açúcar, experimentos mostraram que há um aumento na fotossíntese sob condições de alto CO₂, analisando as folhas individualmente e em plantas com boa irrigação. Algumas alterações foram verificadas nas trocas gasosas, atividades de enzimas fotossintéticas, no metabolismo de sacarose, além dos conteúdos de proteínas e clorofilas (DE SOUZA et al., 2008).

Levando em conta a importância do entendimento das respostas da cana-de-açúcar ao aumento de CO₂ atmosférico, pesquisadores avaliaram a fotossíntese e desenvolvimento da planta sob condições de alta concentração de CO₂, em ambiente (370 ppm) e em elevada umidade (760 ppm), durante 50 semanas. A expressão gênica foi analisada com microarranjos (note a Biotecnologia presente) e os resultados foram validados com genes selecionados, dentre os diferencialmente expressos, utilizando RT-PCR (DE SOUZA et al., 2008).

Garrett et al. (2006) organiza os fatores que determinam como e quando as mudanças climáticas globais podem ter efeito sobre a doença de planta. A tabela 3 detalha os efeitos das mudanças climáticas globais e a pesquisa necessária em cada escala biológica.

Os efeitos diretos das Mudanças Climáticas em comunidades de plantas ou mesmo a nível individual podem ocorrer na ausência do patógeno, mas podem

causar mudanças na planta que afetem suas interações com o patógeno (GARRETT et al., 2006); embora a ocorrência de doenças fúngicas causem estresse biótico em cana-de-açúcar, é essencial o entendimento de como estresses abióticos interagem e têm efeito sobre a planta, como calor e secas, para entender os efeitos das mudanças climáticas globais sobre a ocorrência das doenças (GARRETT et al., 2006).

Tabela 3 – Efeitos potenciais das mudanças climáticas sobre patossistemas, nas diferentes escalas biológicas.

Ambiente	Microclima	Microclima Clima Local	Clima Local e Regional	Clima Regional e Subcontinen- tal	Clima Global
Patógeno	Genoma Processos Celulares Fisiologia	Dinâmica Intrapopula- cional			
	Interações Patógeno-Hospedeiro	Interações Patógeno- Hospedeiro	Dinâmica da Comu- nidade e Ecossiste- -ma	Dinâmica do Ecossistema Regional	Biosfera
Hospedeiro	Genoma Processos Celulares Fisiologia	Dinâmica Intrapopula- cional			

Fonte: (GARRETT et al., 2006).

Na Austrália, país que cultiva cana-de-açúcar, a temperatura média tem aumentado em 0,7°C no último século, levando ao aumento de dias quentes e diminuição de dias frios. Entre 0,4 e 2°C é a expectativa de aumento médio anual projetado para 2030, enquanto um aumento médio anual entre 1 e 6°C está previsto para 2070. A Austrália, devido a sua amplitude territorial, cobre uma grande variedade de climas e ecossistemas (FUHRER, 2003). Em média e alta latitudes, neste país, aumentos da temperatura de 1-3, associados com o aumento de CO₂ e mudanças nos regimes pluviométricos, podem ter pequenos impactos benéficos na

produção das culturas. Em baixas latitudes, no entanto, até mesmo pequenos aumentos de temperatura (1-2°C) podem ter impactos negativos sobre a produção de cereais.

5.6 Mudanças Climáticas Globais: carvão e podridão abacaxi

Tabela 4 – Causas e consequências das MCG para as principais doenças fúngicas de cana-de-açúcar no Brasil.

Doença	Causa	Consequência	Referência	Nível de influência das MCG
Carvão (<i>Sporisorium scitamineum</i>)	Alteração de ventos, tempestades, ciclones	Disseminação para áreas sem variedades resistentes	(SANGUINO, 2008)	Baixa
Ferrugem (<i>Puccinia melanocephala</i>)	Alteração de ventos, tempestades, ciclones	Disseminação para áreas sem variedades resistentes	(SANGUINO, 2008)	Baixa
Podridão-abacaxi (<i>C. paradoxa</i>)	Aumento da umidade	Maior ocorrência da doença		Baixa
Podridão-vermelha (<i>Colletotrichum falcatum</i>)	Aumento da umidade relativa	Penetração direta do patógeno (normalmente não ocorre)	(SANGUINO, 2008)	Baixa

As doenças fúngicas apresentadas na tabela 4 apresentam algumas das principais de cana-de-açúcar no Brasil e as principais influências das MCG. Algumas doenças provavelmente terão maior influência das mudanças climáticas globais, tendo em vista que são de menor importância, ocorrendo em alguns casos muito especiais; assim, os programas de melhoramento não estão preparados para uma possível epidemia por conta das mudanças climáticas. Para as doenças com baixo nível de influência das MCG, há um programa de melhoramento altamente desenvolvido e também um acompanhamento constante, para variações, surgimento de novas raças, etc. (SANGUINO, 2008).

Há sugestões também de que as MCG alteram a dinâmica populacional de vetores, podendo influenciar a ocorrência de doenças transmitidas por insetos, por

exemplo, como é o caso de mosaico-da-cana-de-açúcar, doença causada por um vírus, mas que é principalmente disseminadas por pulgões (SANGUINO, 2008).

Embora o material fotossintetizado, em cana-de-açúcar, mostrou aumentar com a alta concentração de gás carbônico (SANGUINO, 2008, DE SOUZA et al., 2008), a relação patógeno-hospedeiro pode ser afetada, positiva ou negativamente. Neste caso, estudos são necessários para podridão-abacaxi e carvão, em estruturas que permitem manter alta a concentração de gás carbônico.

Embora o carvão seja citado como a doença mais importante para a cana-de-açúcar no Brasil, entre as doenças fúngicas, com relação às MCG, severas tempestades e ciclones poderiam levar à dispersão de teliosporos do *Sporisorium scitamineum* (auxilia disseminação). Caso contrário, por ser doença sistêmica, somente o transporte de material contaminado (propagação vegetativa) ou então através do corte das plantas por mecanização, podem aumentar a ocorrência da doença (intervenção direta do homem) (SANGUINO, 2008).

Outro fato que pode ocorrer é a mudança na dinâmica populacional de insetos que parasitam a cana-de-açúcar como *Diatraea saccharalis*: este inseto perfura a cana-de-açúcar (broca da cana-de-açúcar) e permite o acesso de fungos como *Colletotrichum falcatum*, agente causador de podridão-vermelha no colmo de cana-de-açúcar. Por outro lado, países em que as condições de umidade relativa são altas, o fungo é capaz de invadir o tecido da cana, mesmo sem a perfuração pelo inseto (SANGUINO, 2008). Portanto, o aumento ou diminuição da umidade relativa, devido às MCG, podem ter papel essencial na infecção pelos fungos, sobrevivência, disseminação, etc.

As mudanças climáticas podem ainda alterar as condições ambientais de determinada região, de maneira que patógenos que anteriormente não causavam doenças em cana-de-açúcar, mas sim em outras culturas, passem a causar problemas. Isto ocorre, por exemplo, devido à expansão da cultura da cana para regiões onde ela não era anteriormente cultivada (SANGUINO, 2008).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram revisados os principais aspectos práticos de duas doenças fúngicas importantes para a cultura de cana-de-açúcar, carvão (*Sporisorium scitamineum*) e podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*), tais como detecção, sintomas (ou sinais) e controle. Os Ciclos de Relações Patógeno-Hospedeiro das doenças foram também estudados, já que a compreensão dos mesmos é essencial para o manejo bem sucedido das doenças. As diferenças taxonômicas dos patógenos, assim como das suas relações ecológicas com a planta, permitiram explorar características específicas e, assim, perceber qual manejo é mais adequado para cada doença. A revisão da literatura detectou quais aspectos devem ser melhor compreendidos no futuro (a reprodução, por exemplo, é pouco conhecida e deverá ser melhor estudada para ambos os patossistemas).

A Biotecnologia foi também explorada e pode-se concluir que ela trouxe importantes avanços no conhecimento sobre carvão, estudos mostram aplicações na detecção precoce da doença, o conhecimento sobre as diversidades populacionais do patógeno e contribuíram para o desenvolvimento de variedades resistentes de cana-de-açúcar. Por outro lado, embora o gênero *Ceratocystis* apresente algumas espécies biotecnologicamente bem exploradas, para o causador de podridão abacaxi, *Ceratocystis paradoxa*, a Biotecnologia ainda foi pouquíssimo estudada, havendo somente alguns poucos trabalhos relatando possíveis aplicações biotecnológicas de suas enzimas (hidrolases) e substâncias aromáticas.

Por fim, foram expostas e discutidas as possíveis influências das MCG sobre doenças de planta, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, embora experimentos não tenham sido realizados com doenças de cana-de-açúcar. Com o conhecimento atual, nota-se que os programas de melhoramento de variedades e estudos de engenharia genética para carvão são bem consistentes, reduzindo as possíveis influências negativas dos efeitos das MCG. Por outro lado, além de haver menos estudos para podridão abacaxi, sabe-se que atualmente o ambiente e época de cultivo são fatores de destaque para favorecer sua ocorrência, por isso as MCG podem ser consideradas mais importantes para esta doença.

REFERÊNCIAS

- ABD EL FATTAH, A.I.; ALAMRI, S.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; HAFEZ, E.E. Fingerprinting of *Ustilago scitaminea* (Sydow) in Egypt Using Differential Display Technique: Chitinase Gene the Main Marker, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, Jordan, v.6, n.1, p.8-13, 2010.
- ABDULLAH, S.K.; ASENSIO, L.; MONFORT, E.; GOMEZ-VIDAL, S.; SALINAS, J.; LORCA, L.V.L.; JANSSON, H.B. Incidence of the two date palm pathogens, *Thielaviopsis paradoxa* e *T. punctulata* in soil from date palm plantations in ELX, South-East Spain, Journal of Plant Protection Research, Poland, v.49, n.3, p.276-279, 2009.
- AGNIHOTRI, V.P. Current sugarcane disease scenario and management strategies, Indian Phytopathology, India, v.49, n.2, p. 109-126, 1996.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology, 5th edition, London, Elsevier Academic Press, 2005.
- ALBERT, H.H.; SCHENCK, S. PCR amplification from a Homolog of the *bE* Mating-Type Gene as a Sensitive Assay for the Presence of *Ustilago scitaminea* DNA, Plant Disease, United States, v.80, n.10, 1996.
- AMORIM, L.; FILHO, A.B. Fenologia, Patometria e Quantificação de Danos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B. Manual de Fitopatologia: Volume I Princípios e Conceitos. 4a Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 517-542.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do Parasitismo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B. Manual de Fitopatologia: Volume I Princípios e Conceitos. 4a Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 593-635.
- ANDERSON, P.K.; CUNNINGHAM, A.A.; PATEL, N.G.; MORALES, F.J.; EPSTEIN, P.R.; DASZAK, P. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers, TRENDS in Ecology and Evolution, United Kingdom, v.19, n.10, 2004.
- ARLIDGE, E.; WONG YOU CHEONG, Y. Notes on the land resources and agricultural suitability map of Mauritius, 1: 50 000, Mauritius Sugar Industry Research Institute, Mauritius, v.138, n.4, p.29, 1975.
- BAILEY, R.; BECHET, G.R.; TUCKER, A.B. Progress towards disease control in the South African sugar industry, Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association, South Africa, v.1, n.1, p.3-7, 1994.
- BAILEY, R.A. Diseases. In: James, G. Sugarcane, Second Edition, Oxford: Blackwell Science, 2004. 54-77.

BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A.C. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*, Phytopathology, United States, v.93, n.1, p.1274-1278, 2003.

BAKKEREN, G.; KÄMPER, J.; SCHIRAWSKI, J. Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. Fungal Genetics and Biology, United States, v.45, n. 1, p.S15-S21, 2008.

BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J. First Report of *Puccinia kuehnii*, Causal Agent of Orange Rust of Sugarcane, in Brazil, Plant Disease, United States, v.94, n.9, p. 1170, 2010.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B.D.; O'NEILL, M.O.; WINGFIELD, M.J. *Ceratocystis fimbriata* infecting *Eucalyptus grandis* in Uruguay, Australasian Plant Pathology, Netherlands, v.32, n.1, p.361-366, 2003.

BEDENDO, I.P., Podridões de Órgãos de Reserva. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B. Manual de Fitopatologia: Volume I Princípios e Conceitos. 4a Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011, 427-433.

BEGUM, F.; TALUKDER, M.I.; HOQUE, M.Z. Effect of pineapple disease on germination and yield contributing parameters of some promising varieties of sugarcane (*short communication*), Sugar Tech, India, v.10, n.2, p.171-173, 2008.

BHUIYAN, S.A.; CROFT, B.J.; JAMES, R.S.; COX, M.C. Laboratory and field evaluation of fungicides for the management of sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum* in seedcane, Australasian Plant Pathology, Netherlands, v.41, n.1, p.591-599, 2012.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B.P.H.J.; CARMONA, E.; BORROTO, C.J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*, Plant Physiology and Biochemistry, France, v.43, n.3, p.1115-1121, 2005.

BRAITHWAITE, K.S.; BAKKEREN, G.; CROFT, B.J.; BRUMBLEY, S.M. Genetic Variation in a Worldwide Collection of the Sugarcane Smut Fungus *Ustilago scitaminea*. Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Technol, Australia, v.26, 2004.

BROWN, J.K.M.; HOVMOLLER, M.S. Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and its Impact on Plant Disease (review: epidemiology), Science, United States, v.297, p.537-541, 2002.

CASSELTON, L.A. Mate recognition in fungi. Heredity, London, v.88, p.142-147, 2002.

CEASAR, S.A.; Ignacimuthu, S. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes, Biotechnol Lett, Netherlands, v.34, n.1, p.995-1002, 2012.

CHAKRABORTY, S.; LUCK, J.; HOLLAWAY, G.; FREEMAN, A.; NORTON, R.; GARRETT, K.A.; PERCY, K.; HOPKINS, A.; DAVIS, C.; KARNOSKY, D.F. Impacts of Global Change on Diseases of Agricultural Crops and Forest Trees, CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, United Kingdom, v.3, n.54, p.1-15, 2008.

CHAKRABORTY, S.; TIEDEMANN, A.V.; TENG, P.S. Climate change: potential impact on plant diseases, Environmental Pollution, v.108, p.317-326, 2000.

CHAPOLA, R.G. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas só sulco de plantio, 77pp. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

CLARK, M.F. Immunosorbent assays in Plant Pathology, Annual Review Phytopathology, United States, v.19, p.83-106, 1981.

CO, O.; NGUGI, K.; NZIOKI, H.; GITHIRI, S.M. Evaluation of smut inoculation techniques in sugarcane seedlings, Sugar Tech, India, v.10, n.4, p.341-345, 2008.

COMSTOCK, J.C.; FERREIRA, S.A.; TEW, T.L. Hawaii's Approach to Control of Sugarcane Smut, Plant Disease, United States, v.67, n.4, p.452-457, 1983.

COMSTOCK, J.C.; FERREIRA, S.A. Control of Pineapple Disease of Sugarcane with Propiconazole, Plant Disease, United States, v.68, n.12, p.1072-1075, 1984.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro, 2012. Brasília.

COSTA E CARVALHO, R.R.; WARWICK, D.R.N.; SOUZA, P.E.; CARVALHO FILHO, J.L.S. Efeito da temperatura produção e germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de coqueiros em Sergipe, Scientia Plena, Brasil, v.7, n.9, p.1-5, 2011.

CROFT, B.J.; THOMPSON, N.; MAGAREY, R.C. Introduction to Sugarcane Quarantine and Disease Control. BSES Limited Publication, Australia, p.1-35, Oct., 2011.

DALVI, S.G.; VASEKAR, V.C.; YADAV, A.; TAWAR, P.N.; DIXIT, G.B.; PRASAD, D.T.; DESHMUKH, R.B. Screening of Promising Sugarcane Somaclones for Agronomic Traits, and Smut Resistance Using PCR Amplification of Inter Transcribed Region (ITS) of *Sporisorium scitaminea*, Sugar Tech, India, v.14, n.1, p.68-75, 2012.

DE SOUZA, A.P.; GASPAR, M.; SILVA, E.A.; ULIAN, E.C.; WACLAWOVSKY, A.J.; NISHIYAMA JR., M.Y.; SANTOS, R.V.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, G.M.; BUCKERIDGE, M.S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and

productivity, and modifies gene expression in sugarcane. Plant, Cell and Environment, United Kingdom, v.31, p.1116-1127, 2008.

DEKKER, R.F.H.; RICHARDS, G.N. Purification, properties, and mode of action of hemicellulase I produced by *Ceratocystis paradoxa*, Carbohydrate Research, United Kingdom, v.39, n.1, p.97-114, 1975.

DENG, Y.; YU, Y.; LUO, H.; ZHANG, M.; QIN, X.; LI, L. Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*, Food Chemistry, v.124, p.1556-1560, 2011.

DOS SANTOS, A.S., Doenças de cana-de-açúcar In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar, 1ª Edição, Campinas, Instituto Agrônômico, 2008.

DOS SANTOS, A.S.; DE ALMEIDA, I.M.G.; GONÇALVES, M.C. Doenças de cana-de-açúcar In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar, 1ª Edição, Campinas, Instituto Agrônômico, 2008.

ESMERINI, G.; MARTINS, T.D.; NAVAÍ, M.C.; GOMES, D.N. Eficiência in vitro de fungicida a *Thielaviopsis paradoxa*, Tropical Plant Pathology (suplemento), Brasil, v.33, p. S171, 2008.

EZIASHI, E.I.; UMA, N.U.; ADEKUNLE, A.A.; AIREDE, C.E.; ODIGIE, E.E. Evaluation of lyophilized and non lyophilized toxins from *Trichoderma* species for the control of *Ceratocystis paradoxa*, African Journal of Agricultural Research, Nigeria, v.5, n.13, p.1733-1738, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES, FAOSTAT, disponível em <faostat.fao.org>. Acesso em: 02 out., 2013.

FERREIRA, E.M.; HARRINGTON, T.C.; THORPE, D.J.; ALFENAS, A.C. Genetic diversity and interfertility among highly differentiated populations of *Ceratocystis fimbriata* in Brazil, Plant Pathology, United Kingdom, v.59, p.721-735, 2010.

FONTANIELLA, B.; MÁRQUEZ, A.; RODRÍGUEZ, C.W.; PIÑON, D.; SOLAS, M.T.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*, Plant Physiology Biochemistry, France, v.40, p.881-889, 2002.

FOSSDAL, C.G.; YAQOUB, N.; KROKENE, P.; KVAALLEN, H.; SOLHEIM, H.; YAKOVLEV, I.A. Local and systemic changes in expression of resistance genes, nb-lrr genes and their putative microRNAs in Norway spruce after wounding and inoculation with the pathogen *Ceratocystis polonica*, BMC Plant Biology, v.12, n.105, 1-11, 2012.

FUHRER, J. Agroecosystem responses to combinations of elevated CO₂, ozone, and global climate change, Agriculture Ecosystems & Environment, Netherlands, v.97, n.3, p.1-20, 2003.

GARRETT, K.A.; DENDY, S.P.; FRANK, E.E.; ROUSE, M.N.; TRAVERS, S.E. Climate Change Effects on Plant Disease: Genomes to Ecosystems, Annual Review of Phytopathology, United States, v.44, p.489-509, 2006.

GATES, BILL. Good Reads, disponível em: <http://www.goodreads.com/quotes/336336-dna-is-like-a-computer-program-but-far-far-more>>. Acesso em: 02 out., 2013.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; HAMADA, E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives, Plant Pathology, United Kingdom, v.60, p.122-132. 2011.

GIGLIOTI, E.A. Obtenção de cultivares resistentes ao carvão da cana-de-açúcar (*Ustilago scitaminea*), Fitopatologia brasileira (suplemento), Brasil, v.32, p.S49, 2007.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R.; PRATS, E.; JORRÍN-NOVO, J.V. Proteomics of Plant Pathogenic Fungi (*Review article*), Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010.

GOULD, A.B., IN TRIGIANO, et al. Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises, Second Edition, CRC Press, 2008.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes, Proceedings of the Royal Society B, United Kingdom, v.270, p.313-321, 2003.

HOY, J.W.; JIAXIE, Z.; GRELEN, L.B.; GEAGHAN, J.P. Longevity of Teliospores of *Ustilago scitaminea* in Soil, Plant Disease, United States, v.77, p.393-397, 1993.

HUANG, S. Progress of Sugarcane Disease Research in China: Recent Developments, Sugar Tech, India, v.6, n.4, p.261-265, 2004.

INDIAN MINISTRY OF AGRICULTURE. Annual Report 2010-2011, Department of Agriculture and Cooperation, Government of India, Mar., 2011.

IRVINE, J.E. *Saccharum* species as horticultural classes. Theor. Appl. Genet., Germany, v.98, p.186-194, 1999.

JAMES, G. Sugarcane: World Agriculture Series, Second Edition, Oxford, Blackwell Science, 2004.

JIAO, LI; ZHEN, WANG; BEN-PENG, YANG; SHU-ZHEN, ZHANG; WEN-WEI, CAI; LI-HONG, GU; ZHI-CAI, YANG; WEN-ZHI, WANG. Identification of smut resistance in transgenic sugarcane, 2009.

- KHAMRIT, R.; JAISIL, P.; BUNNAG, S. Callus induction, regeneration and transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with chitinase gene using particle bombardment, African Journal of Biotechnology, Nigeria, v.11, n.24, p.6612-6618, 2012.
- KIMATI, H.; FILHO, A.B.; AMORIM, L. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B. Manual de Fitopatologia: Volume I Princípios e Conceitos. 4a Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.
- LAL, R.J.; SINHA, O.K.; BHATNAGAR, S.; LAL, S.; AWASTHI, S.K. Biological control of sugarcane smut (*Sporisorium scitamineum*) through botanicals and *Trichoderma viride*, Sugar Tech, India, v.11, n.4, p.381-386, 2009.
- LANCENI, D.; URASHIMA, A.S. Efeito da umidade do solo e concentração do patógeno na expressão da podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*) da cana-de-açúcar, Tropical Plant Pathology (suplemento), Brasil, v.34, p.488. 2009.
- LANZA, E.; KO, K.H.; PALMER, J.K. Aroma Production by Cultures of *Ceratocystis moniliformis*, J. Agric. Food. Chem., United States, v.24, n.6, p.1247-1250, 1976.
- LAO, M.; ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; ACEVEDO, R.; RODRÍGUEZ, E.; LEÓN, O.; SANTANA, I. Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. After inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*, Plant Cell Rep, Germany, 27, 1103-1111, 2008.
- LEAKEY, A.D.B.; AINSWORTH, E.A.; BERNACCHI, C.J.; ROGERS, A.; LONG, S.P.; ORT, D.R. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE, Journal of Experimental Botany, United Kingdom, v.60, n.10, p.2859-2876, 2009.
- LEGAZ, M.E.; ARMAS, R.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C. Relationships between phenolics-conjugated polyamines and sensitivity of sugarcane to smut (*Ustilago scitaminea*), Journal of Experimental Botany, United Kingdom, v.49, n.327, p.1723-1728, 1998.
- LEGAZ, M.E.; SANTIAGO, R.; DE ARMAS, R.; ALARCÓN, B.; DÍAZ, E.M.; SÁNCHEZ-ELORDI, E.; SACRISTÁN, M.; FONTANIELLA, B.; MILLANES, A.M.; BLANCH, M.; VICENTE, C. Molecular defence responses of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) to smut (*Sporisorium scitamineum* (Syd.) Piepenbr & Oberw. 2002., Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, p.1244-1250, 2011.
- LLOYD, H.L.; NAIDOO, G. Chemical assay potentially suitable for determination of smut resistance of sugarcane cultivars, Plant Disease, v.67, n.10, p.1103-1105, 1983.

LODHA, T.D.; BASAK, J. Plant-Pathogen Interactions: What Microarrays Tells About it? Mol. Biotechnol., United States, v.50, p.87-97, 2012.

LUZARAN, R.T.; CUEVA, F.M.D.; CUMAGUM, C.J.R.; VELASCO, L.R.I.; DALISAY, T.U. Variability of Sugarcane Smut Pathogen, *Ustilago scitaminea* Sydow in the Philippines, Philippine Journal of Crop Science, v.37, p.38-51, 2012.

MARQUES, M.O.; MUTTON, M.A.; NOGUEIRA, T.A.R.; JÚNIOR, L.C.T.; NOGUEIRA, G.A.; BERNARDI, J.H. Tecnologias na agroindústria canaveira, Jaboticabal, FCAV, 2008.

MASSOLA JR., N.S.; KRUGNER, T.L. In AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A.B. Manual de Fitopatologia: Volume I Princípios e Conceitos. 4a Edição. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

MATSUOKA, M. Sugarcane Cultivation and Sugar Industry in Japan, Sugar Tech, India, v.8, n.1, p.3-9. 2006.

MEHNAZ, S. Microbes – friends and foes of sugarcane, Journal of Basic Microbiology, Germany, v.53, p.1-18, 2013.

MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. International Journal of Plant Genomics, United States, p.1-11, 2008.

MOOSAWI-JORF, S.A.; IZADI, M.B. In vitro Detection of Yeast-Like and Mycelial Colonies of *Ustilago scitaminea* in Tissue-Cultured Plantlets of Sugarcane Using Polymerase Chain Reaction, Journal of Applied Sciences, Pakistan, v.7, n.23, p.3768-3773, 2007.

MOUTIA, Y.; SAUMTALLY, S. Detection from soil and distribution of *Ceratocystis paradoxa* Moreau, causal agent of the pineapple disease of sugarcane, Food and Agriculture Research Council, Mauritius, p.75-82, 1999.

MUELLER, G.; FOSTER, M.; BILLS, G. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Burlington, Elsevier Academic Press, 2004.

NARAYANASAMY, P. Microbial Pathogens and Crop Disease Management, United States, Science Publishers, Inc., 2002.

NZIOKI, H.S.; JAMOZA, J.E.; OLWENY, C.O.; RONO, J.K. Characterization of physiologic races of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya, African Journal of Microbiology Research, Nigeria, v.4, n.16, p.1694-1697, 2010.

NOWAK, R.S.; ELLSWORTH, D.S.; SMITH, S.D. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂ – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? New Phytologist, United Kingdom, v.162, p.253-280, 2004.

ORDOSGOITTI, A.; GONZÁLEZ, V.; APONTE, A. Reacción de variedades de caña de azúcar al carbón en la región central de Venezuela, Caña de azúcar, v.2, n.1, p.5-29, 1984.

PADMANABAN, P.; MOHANRAJ, D. Early and Rapid Detection of Sugarcane Smut by Immunological Methods. In: Sugarcane Pathology, Volume 1: Fungal diseases, p.47-52, 1999.

PAINE, W.A. E HESS, W.M. Ultrastructure of germinating sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) teliospores, Trans. Br. Mycol. Soc., Great Britain, v.82, p.385-395, 1984.

PARRA, D.; MORILLO, F.; SÁNCHEZ, P.; PINEDA, J.; GUERRA, J. Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Hohn en el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* Linneo (Coleoptera: Curculionidae), Entomotropica, Venezuela, v.18, n.1, p.49-55, 2003.

PAULIN-MAHADY, A.E.; HARRINGTON, T.C.; MCNEW, D. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*, Mycologia, United States, v.94, n.1, p.62-72, 2002.

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea*, and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales), Mycological Progress, Germany, v.1, n.1, p.71-80, 2002.

PILOTTI, M.; LUMIA, V.; DI LERNIA, G.; BRUNETTI, A. Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus spp.*, Eur J Plant Pathol, Netherlands, 134:61-79, 2012.

QUE, Y.; YANG, Z.; XU, L.; CHENG, R. Isolation and Identification of Differentially Expressed Genes in Sugarcane Infected by *Ustilago scitaminea*. Acta Agronomica Sinica, United Kingdom, v.35 , n.3, p.452-458, 2009.

QUE, Y.; XU, L.; LIN, J.; RUAN, M.; ZHANG, M.; CHEN, R. Differential Protein Expression in Sugarcane during Sugarcane-*Sporisorium scitamineum* Interaction Revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS, Comparative and Functional Genomics, United States, p.1-10, 2011a.

QUE, Y.; LIN, J.; SONG, X.; XU, L.; CHEN, R. Differential Gene Expression in Sugarcane in Response to Challenge by Fungal Pathogen *Ustilago scitaminea* Revealed by cDNA-AFLP, Journal of Biomedicine and Biotechnology, United States, p.1-10, 2011b.

QUE, Y.; LIU, J.; XU, L.; GUO, J.; CHEN, R. Molecular cloning and expression analysis of an Mn superoxide dismutase gene in sugarcane, African Journal of Biotechnology, Nigeria, v.11, n.3, p.552-560, 2012.

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

RAGO, A.M.; CASAGRANDE, M.V.; JÚNIOR, N.S.M. Variabilidade de *Ustilago scitaminea* no Estado de São Paulo, Summa Phytopathologica, Botucatu, v.35, n.2, p.93-97, 2009.

RAID, R.N. Fungicidal control of pineapple disease of sugarcane, American Society of Sugar Cane Technologists, United States, v.10, p.45-50, 1990.

ROUX, J.; WINGFIELD, M.J.; BOUILLET, J-P; WINGFIELD, B.D.; ALFENAS, A.C. A serious new wilt disease of *Eucalyptus* caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa, For. Path., Berlim, v.30, p.175–184, 2000.

RUTHERFORD, R.S.; ANTWERPEN, T.V.; CONLONG, D.E.; KEEPING, M.G.; MCFARLANE, S.A.; VOGEL, J.L. Promoting Plant Health: Potential for the use of plant-associated micro-organisms in the biological control of pathogens and pests in sugarcane, Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., South Africa, v.76, 2002.

SANGUINO, A. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da cana-de-açúcar no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. Mudanças climáticas: impactos sobre doenças de plantas no Brasil, Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 209-213.

SANTIAGO, R.; ALARCÓN, B.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.E. Changes in cinnamyl alcohol dehydrogenase activities from sugarcane cultivars inoculated with *Sporisorium scitamineum* sporidia, Physiologia plantarum, United States, 2012.

SANTINI, A.; CAPRETTI, P. Analysis of the Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f.sp platani using RAPD and minisatellite markers, Plant Pathology, United Kingdom, v.49, p.461-367, 2000.

SCHENCK, S. Molecular aspects of the Sugarcane Smut Disease Pathogen, *Ustilago scitaminea*, Sugarcane Pathology. Volume 1: Fungal diseases, p.131-139, 1999.

SCHENCK, S. New race of sugarcane smut on Maui. Pathology Report, Hawaii Agriculture Research Center, v.69, 2003.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis, PNAS, United States, v.97, n. 21, p.11655-11660, 2000.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, PNAS, United States, v.109, n.16, p.6241-6246, 2012.

SHARMA, P.D. Plant Pathology, United Kingdom, Alpha Science, 2006.

SHEN, W.; XI, P.; LI, M.; SUN, L.; ZHANG, L.; JIANG, Z. Development of a sensitive nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Ustilago scitaminea*, African Journal of Biotechnology, Nigeria, v.11, n.46, p.10541-10547, 2012.

SILVA, P. P.; SOUZA BARBOSA, G. V.; SANTOS, J. M.; CRUZ, M. M. Avaliação da resistência de genótipos da cana-de-açúcar ao carvão, Fitopatologia brasileira, Brasil, v.30, n.150, 2005.

SINGH, S.P.; SINGH, M.; RAO, G.P.; UPADHYAYA, P.P. Fungitoxic Efficacy of Some Volatile Plant Products Against *Ceratocystis paradoxa* Causing Pineapple Disease of Sugarcane, Sugarcane Pathology, Volume 1: Fungal diseases, p.263-277, 1999.

SINGH, N.; SOMAI, B.M.; PILLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars, Plant Science, v.167, p.987-994, 2004.

SINHA, O.K.; SINGH, K. MISRA, S.R. Stain Technique for Detection of Smut Hyphae in Nodal Buds of Sugarcane, Plant Disease, United States, v.66, n.10, p.932-933. 1982.

SOUZA, S.R.; RUARO, L.; DAROS, E.; BESPALHOK FILHO, J.C.; BONFANTI, J. C. ZAMBON, J. L. C. Teste de viabilidade de teliósporos do carvão da cana-de-açúcar. Fitopatologia brasileira, Brasil, v.32, p.S293, 2007.

SOYTONG, K.; PONGNAK, W.; KASOLARN, H. Biological control of *Thielaviopsis* Bud Rot of *Hyophorbe lagenicaulis* in the field, Journal of Agricultural Technology, India, p.235-245, 2005.

STOLL, M.; PIEPENBRING, M.; BEGEROW, D.; OBERWINKLER, F. Molecular phylogeny of *Ustilago* and *Sporisorium* species (Basidiomycota, Ustilaginales) based on internal transcribed spacer (ITS) sequences, Can. J. Bot., Canada, v.81, p.976-984, 2003.

SUNDAR, A.R.; BARNABAS, E.L.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by *Sporisorium scitamineum*, Botany, InTech, 2012.

SURYAWANSHI, A.P.; DEY, U. Managing pineapple disease in sugarcane, The Hindu online, India. disponível em < <http://www.thehindu.com/sci->

tech/agriculture/managing-pineapple-disease-in-sugarcane/article2851151.ece>. Acesso em: 02 out., 2013.

TALUKDER, M.I.; BEGUM, F.; AZAD, M.M.K. Management of Pineapple Disease of Sugarcane through Biological Means. Journal of Agriculture & Rural Development, Nigeria, v.5, n.1&2, p.79-83. 2007.

THOKOANE, L.N.; RUTHERFORD, R.S. cDNA-AFLP Differential display of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen *Ustilago scitaminae* (sugarcane smut), Proc. S. Afr. Technol. Ass., South Africa, v.75, p.104-107. 2001.

UHLENBROCK, S. Sugar market's return to surplus may exert pressure on prices, FO Licht's World Sugar Outlook, p.5-8, 2012.

VAN WYK, M.; AL-ADAWI, A.O.; WINGFIELD, B.D.; AL-SUBHI, A.M.; DEADMAN, M.L.; WINGFIELD, M.J. DNA based characterization of *Ceratocystis fimbriata* isolates associated with mango decline in Omam, Australasian Plant Pathology, Netherlands, v.34, p.587-590. 2005.

VISWANATHAN, R.; RAO, G.P. Disease Scenario and Management of Major Sugarcane Diseases in India, Sugar Tech, India, v.13, n.4, p.336-353. 2011.

WADA, A.C.; MIAN, M.A.W.; ANASO, A.B.; BUSARI, L.D.; KWON-NDUNG, E.H. Control of Sugarcane Smut (*Ustilago scitaminea* Syd) Disease in Nigeria and Suggestions for an Integrated Pest Management Approach, Sugar Tech, India, v.1, n.3, p.48-53, 1999.

WALLER, J.M. Sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya: II Infection and Resistance. Trans. Br. Mycol. Soc., Great Britain, v.54, n.3, p.405-414, 1970.

WARWICK, D.R.N.; PASSOS, E.E.M. Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Tropical Plant Pathology, Brasil, v.34, n.3, p.175-177, 2009.

WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J.; HARRINGTON, T.C. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis* sensu stricto. Mycol. Res., United Kingdom, v.103, n.6, p.743-749, 1999.

WU, C.P.; CHEN, G.Y.; LI, B.; SU, H.; AN, Y.L.; ZHEN, S.Z.; YE, J.R. Rapid and accurate detection of *Ceratocystis fagacearum* from stained wood and soil by nested and real-time PCR, Forest Pathology, Germany, v.41, p.15-21, 2009.

YADAHALLI, K.B.; ADIVER, S.S.; KULKARNI, S. *Ceratocystis paradoxa* associated mycotoxin – deterring bud germination in sugarcane, Indian Phytopathology, India, v.60, n.2, p.194-197, 2007a.

YADAHALLI, K.B.; ADIVER, S.S.; KULKARNI, S. Effect of pH, Temperature and Relative Humidity on Growth and Development of *Ceratocystis paradoxa* – A Causal Organism of Pineapple Disease of Sugarcane, Karnataka J. Agric. Sci., India, v.20. n.1, p.159-161, 2007b.

YADAHALLI, K.B.; ADIVER, S.S.; KULKARNI, S. Standardization of inoculation techniques for *Ceratocystis paradoxa* – an incitant of sugarcane sett rot. Indian Phytopathology, India, v.60, n.3, p.377-379, 2007c.