UFG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS EM LESÕES DE FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

LAÍS GABRIELA RAMOS FERREIRA

Orientadora:
Prof.ª Bruna Mendes de Oliveira
Coorientador:
Dr. Márcio Lisboa Guedes

Julho – 2024

Goiânia - GO
Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese [ ] Outro*:_____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Laís Gabriela Ramos Ferreira

3. Título do trabalho

DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS EM LESÕES DE FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Laís Gabriela Ramos Ferreira**, **Usuário Externo**, em 14/08/2024, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **Bruna Mendes De Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 24/09/2024, às 19:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4740811** e o código CRC **8F7E204D**.

Referência: Processo nº 23070.040566/2024-21 SEI nº 4740811

LAÍS GABRIELA RAMOS FERREIRA

DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS EM LESÕES DE FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.
Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.
Linha de pesquisa: Melhoramento de Espécies Cultivadas.

Orientadora: Professora Doutora Bruna Mendes de Oliveira

Coorientador: Doutor Márcio Lisboa Guedes

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ferreira, Laís Gabriela Ramos
Diversidade molecular de fungos em lesões de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar [manuscrito] / Laís Gabriela Ramos Ferreira. - 2024.
45 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Bruna Mendes de Oliveira; co-orientadora Dra. Márcio Lisboa Guedes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA), Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Goiânia, 2024.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui fotografias, gráfico, tabelas.

1. Puccinia kuehnii. 2. Saccharum spp.. 3. Variação genética. I. Oliveira, Bruna Mendes de, orient. II. Título.

CDU 631/635

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE AGRONOMIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 125 da sessão de Defesa de Dissertação de Laís Gabriela Ramos Ferreira, que confere o título de Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas, na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos dezenove dias do mês de agosto de dois mil e vinte e quatro, a partir das oito horas, em formato híbrido, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "DIVERSIDADE MOLECULAR DE FUNGOS EM LESÕES DE FERRUGEM ALARANJADA DA CANA-DE-AÇÚCAR ". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Professora Doutora Bruna Mendes de Oliveira (PPGGMP/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Lázaro José Chaves (PPGGMP/UFG), membro titular interno e Professor Doutor Rodrigo de Souza Silva (Uniaraguaia), membro titular externo e o coorientador Professor Doutor Márcio Lisboa Guedes (UVA - CE). Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **Aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Documento assinado eletronicamente por **Lazaro Jose Chaves**, **Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2024, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **Bruna Mendes De Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2024, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **MARCIO LISBOA GUEDES**, **Usuário Externo**, em 20/08/2024, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 .

Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo De Souza Silva** , **Usuário Externo**, em 03/09/2024, às 09:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4740812** e o código CRC **7BE77988**.

Referência: Processo nº 23070.040566/2024-21 SEI nº 4740812

SUMÁRIO

RESUMO..... 7
ABSTRACT 8

1 INTRODUÇÃO 9

2 REFERENCIAL TEÓRICO 10
2.1 A CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR 10
2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL 12
2.3 DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL 13
2.4 FERRUGEM ALARANJADA-*Puccinia kuehnii* 15
2.5 FUNGOS DO GÊNERO *Sphaerellopsis* PRESENTES EM LESÕES DE FERRUGENS 19
2.6 DIVERSIDADE MOLECULAR EM FUNGOS 20
2.7 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR EM FUNGOS 21

3 MATERIAL E MÉTODOS 24
3.1 COLETA DE AMOSTRAS 24
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO DE PCR 27
3.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO 28
3.4 ANÁLISE DOS DADOS 28

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
4.1 DIVERSIDADE MOLECULAR EM *Puccinia kuehnii* 31
4.2 DIVERSIDADE MOLECULAR EM *Sphaerellopsis paraphysata* e *Hyweljonesia queenslandica* 34

5 CONCLUSÕES 37

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 39
APÊNDICE 47

RESUMO

FERREIRA, L. G. R. **Diversidade molecular de fungos em lesões de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar**. 2024. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2024.[1]

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância tanto em nível mundial, quanto nacional. No entanto, um dos elementos limitantes da cultura tem sido a presença de fitopatógenos nas áreas produtoras, afetando a saúde das plantas e causando baixa produtividade. Dentre as principais doenças da cultura, a ferrugem alaranjada tem se destacado pela alta capacidade destrutiva do patógeno. A ferrugem alaranjada é causada pelo basidiomiceto *Puccinia kuehnii* que teve seu primeiro registro no Brasil em 2009. O uso de variedades resistentes tem sido o método de controle mais utilizado para ferrugem alaranjada nos canaviais. Essa estratégia tem sido adotada no Brasil, mas a suplantação da resistência em variedades previamente classificadas como resistentes mostra que a eficácia desse método é limitada e requer um melhor conhecimento da evolução molecular desse patógeno. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise filogenética do fungo *Puccinia kuehnii* e dos demais fungos associados, visando compreender a diversidade molecular desses organismos. Folhas com sintomas de ferrugem alaranjada foram coletadas em Goiás e no Tocantins, e os esporos presentes nas lesões foram submetidos à extração de DNA e amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) via PCR, seguida de sequenciamento pelo método Sanger. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando abordagens probabilísticas, gerando árvores consenso com 10 milhões de gerações no programa MrBayes, visualizadas e editadas no FigTree. Os resultados revelaram a presença de três espécies de fungos nas lesões de ferrugem alaranjada: *Puccinia kuehnii*, *Sphaerellopsis paraphysata* e *Hyweljonesia queenslandica*. A análise filogenética indicou diversidade molecular entre as amostras de *P. kuehnii*, destacando a necessidade de coleta de amostras em pelo menos três pontos distintos, amostrados neste estudo, para representar a variabilidade do fungo. Além disso, a identificação de *Sphaerellopsis paraphysata* nas lesões reforça seu potencial uso no controle biológico da ferrugem alaranjada, enquanto a presença de *Hyweljonesia queenslandica*, ainda pouco documentada na literatura, ressalta a necessidade de mais estudos para elucidar seu papel ecológico e potencial impacto na cultura da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Puccinia kuehnii*; *Saccharum* spp.; variação genética.

[1] Orientadora: Prof.ª Dr.ª Bruna Mendes de Oliveira. EA – UFG.
Coorientador: Dr. Márcio Lisboa Guedes. EA – UFG.

ABSTRACT

FERREIRA, L. G. R. **Molecular diversity of fungi in orange rust lesions of sugarcane**. 2024. Dissertation (Master's in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2024.[1]

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a crop of great importance both globally and nationally. However, one of the limiting factors for this crop has been the presence of phytopathogens in producing areas, affecting plant health and causing low productivity. Among the main diseases affecting sugarcane, orange rust stands out due to the high destructive capacity of its pathogen. Orange rust is caused by the basidiomycete *Puccinia kuehnii*, which was first reported in Brazil in 2009. The use of resistant cultivars has been the most widely used control method for orange rust in sugarcane fields. This strategy has been adopted in Brazil, but the breakdown of resistance in previously classified resistant cultivars shows that the efficacy of this method is limited and requires a better understanding of the molecular evolution of this pathogen. The objective of this study was to conduct a phylogenetic analysis of the fungus *Puccinia kuehnii* and other associated fungi, aiming to understand the molecular diversity of these organisms. Leaves with symptoms of orange rust were collected, and the spores present in the lesions were subjected to DNA extraction and ITS region amplification via PCR, followed by sequencing using the Sanger method. Phylogenetic analyses were conducted using probabilistic approaches, generating consensus trees with 10 million generations in the MrBayes program, visualized and edited in FigTree. The results revealed the presence of three fungal species in the orange rust lesions: *Puccinia kuehnii*, *Sphaerellopsis paraphysata*, and *Hyweljonesia queenslandica*. The phylogenetic analysis indicated significant molecular diversity among the *P. kuehnii* isolates, highlighting the need to collect samples from at least three distinct points, as sampled in this study, to represent the fungus's variability. Additionally, the identification of *Sphaerellopsis paraphysata* in the lesions reinforces its potential use in the biological control of orange rust, while the presence of *Hyweljonesia queenslandica*, still poorly documented in the literature, highlights the need for further studies to elucidate its ecological role and potential impact on sugarcane cultivation.

.

Keywords: *Puccinia kuehnii*; *Saccharum spp.*; genetic variation.

---

[1] Advisor: Prof.ª Dr.ª Bruna Mendes de Oliveira. EA – UFG.
Co-Advisor: Dr. Márcio Lisboa Guedes. EA – UFG.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância mundial, por ser matéria-prima de *commodities*, como o açúcar e o etanol (Embrapa, 2014). A produção mundial da cana é da ordem de 1,8 bilhão de toneladas, sendo os maiores produtores mundiais, o Brasil, a Índia e a China (Faostat, 2022). Na safra 2023/24, a produção brasileira de cana-de-açúcar total foi de aproximadamente 713,2 milhões de toneladas, em uma área plantada por volta de 8,3 milhões de hectares, com uma produtividade média de 85,5 $t.ha^{-1}$. A produção para Açúcar Total Recuperável (ATR) foi de 95,9 milhões de toneladas, com 45,5% desse total destinado à produção de açúcar e 54,5% à produção de etanol total (hidratado e anidro) (Conab, 2024).

Além da produção de açúcar e etanol, a indústria sucroenergética produz energia elétrica, vinhaça, plástico verde e outros subprodutos. No *ranking* de produção nacional de açúcar, destaca-se o estado de São Paulo ocupando o primeiro lugar com produção da ordem de 383,4 milhões de toneladas, seguido por Minas Gerais e Goiás com dados de produção de aproximadamente 81,3 e 76,6 milhões de toneladas, respectivamente. Para produção de etanol total estão em destaque os mesmos estados citados, integrantes da região centro-sul do país (Conab, 2024).

A produtividade da cana-de-açúcar é influenciada por fatores edafoclimáticos e, sobretudo, por fatores bióticos como doenças e pragas. A maioria dos patógenos presentes no cultivo da cana-de-açúcar paralisa o crescimento das plantas e proporciona acúmulo precoce de sacarose, o que resulta em baixa produção (Aude, 1993). Entre as doenças que afetam a cana-de-açúcar, à ferrugem alaranjada, causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, destaca-se como uma das mais preocupantes devido ao seu potencial de causar danos significativos nas plantações. Desde o seu primeiro registro no Brasil, no município de Araraquara, em São Paulo, no ano de 2009, a ferrugem alaranjada tem representado um desafio constante para os produtores, causando perdas econômicas substanciais em variedades comerciais e exigindo medidas eficazes de controle (Barbasso et al., 2010; Zuza & Borsato, 2013).

Além do próprio agente causal, estudos recentes têm revelado a presença de fungos endofíticos associados às lesões de ferrugem alaranjada, especialmente do gênero *Sphaerellopsis* (Ashmitha et al., 2019). Esses fungos apresentam potencial biotecnológico

como agentes de biocontrole, podendo influenciar a severidade da doença e afetar a dinâmica populacional do patógeno (Gordon & Pfender, 2012).

Estudos de diversidade molecular de fungos fitopatogênicos são essenciais para programas de melhoramento genético de plantas, pois fornecem informações sobre a variabilidade genética e a evolução dos patógenos. Essa compreensão permite traçar estratégias de desenvolvimento de variedades resistentes e que sejam eficazes a longo prazo. Além disso, a análise da diversidade molecular possibilita a identificação de marcadores genéticos específicos que podem auxiliar no monitoramento e no manejo integrado de doenças (Thurow, 2018).

Neste contexto, a compreensão da diversidade molecular dos fungos envolvidos nas lesões de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de manejo da doença. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma análise filogenética do fungo *Puccinia kuehnii*, bem como de outros fungos presentes em lesões de *P. kuehnii*, visando compreender a diversidade molecular desses fungos, de forma a auxiliar nas estratégias de desenvolvimento de variedades resistentes à ferrugem alaranjada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A CULTURA DA CANA DE AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância tanto em nível mundial, quanto nacional. Devido às características edafoclimáticas do Brasil, a cultura se adaptou bem às condições aqui presentes, o que motivou o país a ocupar o primeiro lugar mundial em produção de açúcar e etanol (Rodrigues & Ross, 2020). A região centro-sul do país destaca-se na produção da cultura, sendo o estado de São Paulo líder em produção (Conab, 2024). Goiás aparece em terceiro lugar no *ranking* de produção, contando com 43 unidades produtoras de etanol e açúcar (Nova Cana, 2024).

A contribuição da cultura para o país não se restringe apenas à relevância econômica, mas também à importância social. Esta, é justificada por meio da geração de empregos em todas as áreas sistemáticas da produção, que vai desde os empregos com características mais agrícolas como plantio, manejo e corte à empregos nas indústrias de etanol e açúcar (Silva, 2021).

Como já mencionado, os principais derivados da cana-de-açúcar são o etanol, essencial para a economia mundial, e o açúcar, amplamente utilizado nos setores de

alimentos e bebidas. Adicionalmente, esses dois insumos são caracterizados por sua versatilidade, uma vez que apresentam significativa contribuição às indústrias alimentícias e farmacêuticas, bem como de biocombustíveis e bioenergia (Rodrigues e Ross, 2020).

Pertencente à família *Poaceae*, a cana-de-açúcar apresenta características morfológicas diversas em relação a tamanho de colmos, densidade de perfilhamento e teores produtivos de sacarose a depender da espécie e da variedade. A planta é dividida em parte aérea englobando o colmo, folhas e a inflorescência em panícula aberta, denominada bandeira ou flecha; e em parte subterrânea, composta por rizomas e sistema radicular. Os colmos proporcionam a sustentação da planta e podem apresentar diferentes tamanhos de acordo com sua idade (Mozambani et al., 2008).

O ciclo fenológico da cultura fundamenta-se em quatro fases caracterizadas pela brotação e emergência dos brotos; perfilhamento e estabelecimento da cultura; período de grande crescimento; e maturação, caracterizado pelo intenso acúmulo de sacarose. Vale ressaltar que há fatores que afetam esse ciclo, influenciando negativamente o potencial produtivo da cultura, como temperatura, umidade, solos, pragas e doenças, além do manejo empregado pelo produtor (Segato et al., 2008). As doenças configuram um dos principais elementos de prejuízos agrícolas e econômicos da produção de cana-de-açúcar, portanto as ações de prevenção, monitoramento e controle são práticas indispensáveis no processo produtivo que visam o sucesso da lavoura.

A resistência varietal é uma das abordagens mais eficazes e ambientalmente sustentáveis para o controle de doenças na cultura da cana-de-açúcar. O desenvolvimento de variedades resistentes por meio do melhoramento genético, permite reduzir a incidência de patógenos, diminuindo o uso de defensivos químicos. No caso de doenças como as ferrugens, essa prática é fundamental, uma vez que afetam, principalmente, plantas adultas em fase de maior acúmulo de sacarose e podem causar grandes perdas econômicas. A introdução de resistência varietal torna-se, portanto, uma estratégia eficaz para proteger a cultura nos estágios mais vulneráveis do ciclo fenológico. Além de contribuir para a estabilidade da produção e a longevidade dos canaviais, a resistência genética se alinha com práticas de manejo agrícola mais sustentável e reduzindo o impacto ambiental do cultivo (Matsuoka, 2016).

2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

O melhoramento genético da cana-de-açúcar desenvolve variedades altamente produtivas e adaptadas a diversas condições ambientais. No entanto, esse processo enfrenta limitações como o longo ciclo de desenvolvimento das variedades e a complexidade genética da planta. Recentemente, a biotecnologia tem se mostrado promissora para superar essas barreiras, oferecendo novas possibilidades para atender às demandas do mercado por variedades com maior resistência a pragas e doenças, tolerância ao estresse hídrico e alta produtividade de etanol e biomassa (Morais et al., 2015).

Basicamente existem três programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar. O programa do Instituto Agronômico de Campinas (IAC); o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), antigo Centro de Tecnologia da Copersucar (Cooperativa de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo) e o programa da Ridesa (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético), antigo Programa Nacional de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (Planalsucar). Todos têm como objetivo principal o desenvolvimento e melhoramento de variedades adaptadas a diferentes ambientes e demais características interessantes à produção, como resistência a pragas e doenças.

A Ridesa é composta por dez universidades federais (Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, Universidade Federal de Sergipe-UFS, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, Universidade Federal de Goiás-UFG, Universidade Federal de Viçosa-UFV, Universidade Federal do Mato Grosso-UFMT, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Universidade Federal de São Carlos-UFSCar e Universidade Federal do Paraná-UFPR), que trabalham integradas entre si e em parcerias empresariais para desenvolvimento do conhecimento científico da cultura da cana-de-açúcar. A Ridesa conta com dois bancos de germoplasma, a estação Serra do Ouro, em Alagoas, e a estação de cruzamento Devaneio, em Pernambuco, com total de, aproximadamente, quatro mil acessos entre espécies e híbridos (Ridesa, 2024).

No Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar/UFG (PMGCA-UFG), as sementes são obtidas nas estações de cruzamentos Serra do Ouro, em Alagoas, e Devaneio, em Pernambuco. Após essa etapa, ocorre a semeadura, seguida pelas fases de germinação e seleção em diferentes fases: *seedlings*, teste clonal 1 (T1), teste clonal 2 (T2), teste clonal 3 (T3) e ensaios de série. No PMGCA-UFG, a fase inicial

utiliza o sistema “Tapetinho”, que agrupa mudas de cada família de cruzamentos sem individualização. O processo de seleção envolve a avaliação de cerca de um milhão de mudas, selecionando aproximadamente 5 mil genótipos para o ensaio T1, e seguindo uma seleção rigorosa em fases subsequentes (T2, T3), até reduzir para 10-15 clones promissores. Estes são testados em ensaios finais que incluem validação em áreas comerciais, levando cerca de quinze anos para desenvolver e liberar uma nova cultivar (Ridesa, 2024).

Durante o processo de melhoramento genético, são realizadas avaliações de resistência dos clones de cana-de-açúcar a doenças. Isso é feito através de inoculação controlada do patógeno nos clones selecionados. Após a inoculação, as plantas são monitoradas e avaliadas por meio de escalas diagramáticas, que permitem quantificar a severidade da doença e a reação de variedades (Ridesa, 2024). Essa avaliação é importante para identificar e selecionar clones com maior resistência, garantindo o desenvolvimento e o lançamento de novas variedades que sejam mais produtivas e menos suscetíveis à doença, contribuindo para uma produção com maior eficiência agrícola.

2.3 DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

As doenças nos vegetais são processos biológicos com interferência prejudicial e contínua no sistema fisiológico das plantas, que levam a um comportamento anormal do vegetal e, muitas vezes, resultam na expressão de sintomas. As doenças bióticas originam-se da interação dos organismos planta hospedeira e patógeno, nesse caso, além da expressão de sintomas é possível observar os sinais do agente patogênico presente no hospedeiro, como estruturas reprodutivas ou características visíveis do patógeno (Krügner, 1995).

De acordo com Rossetto & Santiago (2022), das 216 doenças descritas para a cultura da cana, mais de cinquenta já foram relatadas no país. No ano de 1920, o vírus do mosaico da cana-de-açúcar (*Sugarcane mosaic virus*) foi responsável por grandes perdas econômicas, em decorrência do uso de variedades de cana da espécie *S. officinarum* que eram altamente suscetíveis ao vírus. A epidemia só foi contida após a substituição de aproximadamente 93% dos canaviais por variedades resistentes à doença (Tokeshi, 1980). Assim como no caso do mosaico, grande parte das doenças da cana são controladas pela adoção de variedades resistentes, entretanto vale ressaltar que o manejo com adubação balanceada, época adequada de plantio, bem como o monitoramento e

controle de pragas que possam favorecer a presença de doenças nas lavouras, devem ser práticas constantes para um efetivo controle preventivo (Tokeshi, 1980).

O carvão, causado pelo fungo *Ustilago scitaminea*, foi detectado pela primeira vez no país em 1946 e também teve sua epidemia controlada por meio da substituição de variedades nas décadas de 1970 e 1980, quando a doença apresentou níveis maiores que 30 mil touceiras infectadas por hectare em áreas com plantas de resistência intermediária (Moreira et al., 2018). Posteriormente, outra doença fúngica chegou às áreas produtoras da cultura, a ferrugem marrom causada por *Puccinia melanocephala*, que mostrou estimativa de perdas de 50% das lavouras em variedades suscetíveis. Todavia, os danos por *P. melanocephala* não chegaram aos níveis das epidemias anteriormente citadas, posto que, as unidades de plantio já estavam ocupadas, em grande parte, com variedades que já eram resistentes à ferrugem marrom (Moreira et al., 2018; Rossetto & Santiago, 2022).

Contrariamente à ferrugem marrom, que teve seu primeiro registro no Brasil em 1986, a ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) foi relatada no país em 2009, no município de Araraquara, em São Paulo, e deixou em alerta toda comunidade ligada ao setor canavieiro. Essa preocupação foi devido ao grande potencial destrutivo e capacidade de disseminação do patógeno (Agostini, 2009). Em pouco tempo, a doença atingiu estados centrais do país como Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás causando perdas econômicas consideráveis. Zuza & Borsato (2013) analisando prejuízos econômicos e agrícolas na variedade comercial SP89-1115 em São Paulo, estimaram a perda econômica em mais de 2 milhões de reais e queda na produção de 3,55 toneladas de ATR por hectare.

Dos demais patossistemas que acometem a cultura são citados a escaldadura das folhas *(Xanthomonas albilineans)*, raquitismo das soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli)* e estria vermelha *(Acidovorax avenae* subsp. *avenae)* causadas por bactérias que atacam, sobretudo, as folhas prejudicando o processo fotossintético e causando implicações nos colmos; além de mancha parda (*Cercospora longipes*), podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum*) e podridão abacaxi (*Ceratocystis paradoxa*), causadas por fungos (Simon et al., 2016). Sendo que para todas as doenças citadas, o método de controle mais importante se fundamenta no uso de variedades resistentes e para controle preventivo, o tratamento térmico de mudas e adubação balanceada.

Embora grande parte das doenças sejam causadas por um único agente fitopatogênico, há doenças causadas por um complexo de microrganismos ou agentes patogênicos que apenas são capazes de se desenvolver em condições de associação com

outras espécies, como é o caso da mancha anelar na cana-de-açúcar (Tokeshi, 1980). Em outro contexto, as lesões de doenças causadas por patógenos, podem abrigar mais de um agente biológico. Lesões de ferrugem alaranjada na cultura do amendoim, do milheto e milho causadas respectivamente pelos patógenos *Puccinia arachidis, Puccinia substriata* e *Puccinia sorghi* têm abrigado microrganismos do gênero *Sphaerellopsis*, sendo considerados parasitas dos agentes etiológicos das doenças (Durgadevi et al., 2024; Urashima et al., 2019; Reis & Urashima, 2017). Diante disso, microrganismos com potencial biotecnológico voltado para o biocontrole estão sendo estudados em diversas culturas de importância econômica afetadas por patógenos do gênero *Puccinia*. A utilização desses microrganismos ou de seus metabólitos oferece alternativas promissoras para o desenvolvimento de produtos destinados ao manejo dessas doenças (Ashmitha et al., 2019).

Diante do exposto, fica claro que as doenças configuram potente elemento limitante ao desenvolvimento da lavoura e que esses prejuízos refletem negativamente no custo de produção e de oferta dos produtos oriundos da cana, o que resulta na elevação dos preços à classe consumidora (Zuza & Borsato, 2013). Portanto, há necessidade em conhecer os mecanismos e características dos agentes causais, além de entender a interação entre agentes biológicos presentes nas lesões das doenças, com a finalidade de desenvolver estratégias viáveis de controle às doenças nas plantas.

2.4 FERRUGEM ALARANJADA-*Puccinia kuehnii*

Integrante do gênero *Puccinia*, o agente causal da ferrugem alaranjada caracteriza-se por atacar um pequeno conjunto de hospedeiros e ser biotrófico, habilidade que lhe permite extrair nutrientes dos tecidos vivos das plantas. Esses fungos apresentam uma complexidade em seu ciclo de vida, manifestada por uma variedade de estruturas esporogênicas e esporos com morfologias e funções distintas. Mesmo com poucos estudos sobre seus ciclos de vida, diferentes tipos de ciclos vitais são conhecidos, demonstrando a diversidade dentro deste grupo (Figueiredo & Passador, 2008; Perera, 2020).

P. kuehnii é considerado hemiforma, pois suas fases uredinial e telial são conhecidas, enquanto seus possíveis hospedeiros alternativos permanecem desconhecidos. Os télios, estruturas usadas para identificar a forma “perfeita” do fungo, produzem os teliósporos, esporos sexuais raramente vistos em *P. kuehnii*. Os uredínios surgem do micélio dicariótico e geram esporos também dicarióticos, conhecidos como

urediniósporos (Figura 1), que são comumente vistos em campo (Figueiredo & Passador, 2008).

Os urediniósporos presentes nas pústulas abertas (Figura 1) podem apresentar formas obovoides, piriformes, elipsoidais ou retangulares, com coloração alaranjada ou verde claro. Eles têm um número constante de aproximadamente quatro poros germinativos e, devido ao seu pequeno tamanho, são facilmente dispersos pelo vento, contribuindo para a disseminação da doença em ambientes favoráveis (Perera, 2020). A germinação dos esporos ocorre em uma faixa de temperatura entre 5ºC e 34ºC, juntamente com umidade relativa máxima de 98% a 99%, muitas vezes proveniente da chuva ou do orvalho (Oliveira & Mendes, 2008).

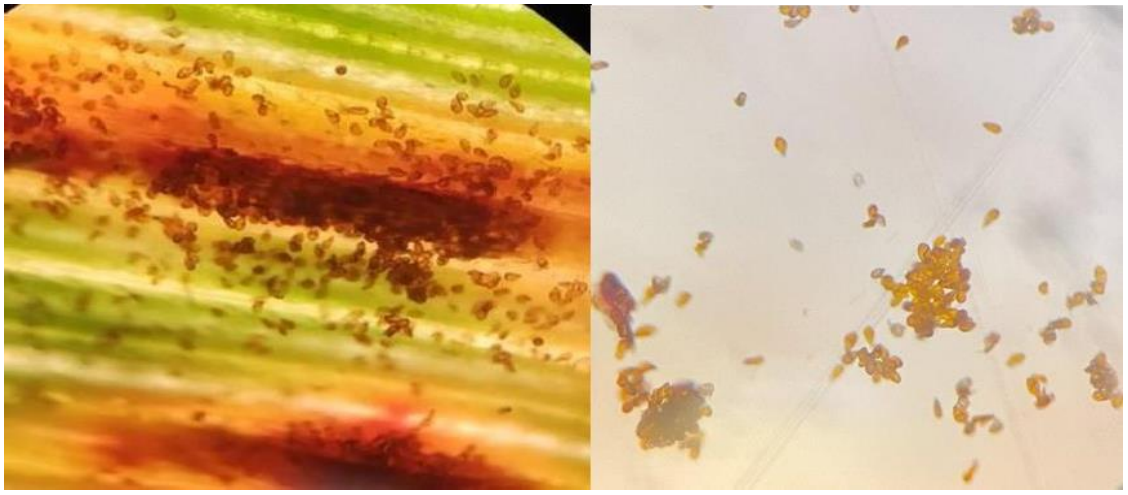

Figura 1. Urediniósporos de *P. kuehnii* em folhas de cana-de-açúcar com sintomas de ferrugem alaranjada vista em microscópio óptico (Ferreira, L. G. R., 2022).

O gênero *Puccinia* possui ciclo vital envolvendo diferentes fases e variações a depender da espécie, caracterizando como uma biologia complexa. Este ciclo vital está diretamente ligado aos danos que *P. kuehnii* causa às plantas hospedeiras, facilitando a disseminação da doença de forma efetiva. Os sintomas da doença manifestam-se em lesões nas folhas, inicialmente como pequenas pontuações que evoluem para pústulas de coloração alaranjada. Essas pústulas, alongadas longitudinalmente, são predominantemente encontradas nos tecidos abaxiais das folhas. Essas lesões abrigam as estruturas de resistência do patógeno, os urediniósporos, as pústulas podem evoluir para necrose da área foliar afetada e, dependendo do nível de infecção, pode influenciar negativamente no processo fotossintético e/ou causar a morte da planta (Perera, 2020).

Algumas divergências que ocorrem entre as ferrugens marrom e alaranjada, possibilitam a diferenciação da doença em campo. Enquanto a ferrugem marrom apresenta pústulas maiores e formam pequenas áreas necróticas nos tecidos, a ferrugem

alaranjada apresenta pústulas menores. No entanto, mostram maior intensidade de necrose nas folhas maduras, que começam no centro e progridem para as bordas. Ademais, essas pústulas tendem a se agruparem próximo ao ponto de inserção das folhas. Além disso, a ferrugem alaranjada ataca plantas maduras, enquanto a ferrugem marrom incide com maior frequência no início do desenvolvimento da planta, geralmente nos primeiros três meses (Simon et al., 2016; Souza et al., 2018).

Em relação aos métodos de controle da doença, a adoção integrada de todas as estratégias disponíveis é recomendada, o que engloba manejo cultural, químico e, sobretudo, genético. Embora os controles químico e genético sejam os mais usuais, o controle cultural colabora no processo produtivo da cultura (Souza et al., 2018). Por meio de dados de temperatura e umidade relativa, é possível o desenvolvimento de mapas que apontam regiões de risco para infecção da doença, esses mostram quais são os meses mais e menos favoráveis para desenvolvimento do patógeno em campo. Partindo disso, produtores de regiões com maior incidência da doença podem desenvolver um planejamento para monitorar de maneira efetiva a doença. Além da época de plantio, os cuidados com preparo e adubação dos solos e manejo de plantas daninhas são exemplos de estratégias culturais a serem utilizadas (Souza et al., 2018; Sumida et al., 2019).

A maioria dos produtos químicos, registrados pelo Ministério da Agricultura, para controle da ferrugem alaranjada, são compostos pelo grupo químico dos triazois associado às estrobilurinas (Agrofit, 2022). Analisando a eficácia de fungicidas no controle das ferrugens marrom e alaranjada em cana-planta e cana-soca, Koch (2020) mostrou que o controle com aplicação dos fungicidas permitiu a recuperação e aumento da produtividade em cana-soca, que variou de 18,5% a 31,1% em comparação às testemunhas, quando aplicados no começo da infecção. Outro estudo mostrou a viabilidade técnica e econômica da mistura de produtos químicos com redução da severidade dos sintomas em variedades suscetíveis à doença, contudo para variedades intermediárias o método químico não se mostrou viável economicamente (Zeneratto, 2017). Portanto, o emprego de variedades resistentes caracteriza-se como principal método de controle para doenças vegetais, incluindo a ferrugem alaranjada, devido tanto a vantagens econômicas quanto ambientais.

Variedades elite, coleções de germoplasmas, espécies silvestres, bem como mutações são fontes de resistência genética dos quais programas de melhoramento vegetal lançam mão para desenvolvimento de variedades resistentes, sobretudo, à resistência a patógenos, sendo uso da recombinação e seleção de variedades elites a fonte

mais utilizada (Thurow et al., 2018). Dessa forma, instituições de pesquisas como a Ridesa, o CTC e o IAC, além de buscarem desenvolver variedades resistentes, buscam a durabilidade dessa resistência, que depende, dentre demais fatores, da avaliação da reação dos genótipos de cana-de-açúcar à doença e da diversidade genética do patógeno. Quanto à avaliação da doença, essa pode ser testada tanto no campo, com infecção natural e com possibilidade de se testar maior quantidade de plantas, quanto em ambiente protegido com processo de inoculação artificial do patógeno, permitindo classificação de reações das variedades em resistentes, intermediárias e suscetíveis. (Mistura, 2016; Borella, 2022).

Nas avaliações de reação das variedades, as escalas diagramáticas são utilizadas atribuindo notas visualmente à severidade dos sintomas em cada genótipo. Na literatura, Klosowski (2012) desenvolveu e validou a mais recente escala diagramática para a ferrugem alaranjada. Essa escala atribui pontuações de 1 a 9, com as porcentagens de área foliar afetada variando para cada nota, com base nos sintomas observados nas folhas. Sendo que, de 1 a 3 estão classificadas as plantas resistentes; de 4 a 6 intermediárias ou tolerantes; e de 7 a 9 suscetíveis. Ademais, outras escalas são usadas, como a proposta por Amorim et al. (1987) para ferrugem marrom, que também traz porcentagem de área afetada e é dividida em 9 notas e, ainda, a elaborada por Sood (2009), considerando além das notas, a quantidade de pústulas esporulantes nas plantas. Além da severidade, outros parâmetros são avaliados como período médio de incubação, período médio de latência e porção de pústulas abertas e fechadas.

Para que ocorra uma correta classificação da reação das variedades é importante o adequado preparo do inóculo bem como da realização da inoculação, além de levar em consideração a viabilidade dos urediniósporos que é verificada por meio do teste de germinação dos esporos (Urashima et al., 2019). O teste de germinação dos esporos foi descrito por Braithwaite et al. (2009) e se baseia no inóculo disperso em meio de cultura e posterior contagem dos esporos com microscópio óptico, sendo que a frequência de germinação é dada em porcentagem. A inoculação é realizada com a pulverização do inóculo com equipamentos manuais e coberta por plástico preto por período de 18 horas e temperatura de 23ºC, para efetivar a infecção (Sood, 2009).

Outro fator relacionado à resistência de variedades a doenças é a compreensão da filogenia molecular do patógeno, já que permite investigar as relações evolutivas entre diferentes linhagens do patógeno, identificar padrões de dispersão e entender a diversidade genética presente nas populações do fitopatógeno. Portanto, programas de melhoramento genético fundamentados nesse conhecimento, são essenciais para garantir

a sustentabilidade e eficácia das estratégias de controle da doença (Thurow, 2018; Dallagnol & Dornelles, 2021).

A herança da resistência da cana-de-açúcar ao patógeno causador da ferrugem alaranjada ainda não é completamente elucidada, principalmente devido à escassez de estudos específicos sobre este patossistema. Entretanto, pesquisas em doenças semelhantes, como a ferrugem marrom, indicam que a resistência pode ser monogênica, associada a um gene de efeito dominante e possível influência de efeito materno (Moura, 2004). Assim, estudos focados na análise da herança genética da resistência à ferrugem alaranjada são essenciais para definir o padrão de herança das variedades frente ao patógeno *P. kuehnii*.

2.5 FUNGOS DO GÊNERO *Sphaerellopsis* PRESENTES EM LESÕES DE FERRUGENS

Em estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos, como os urediniósporos nas lesões de ferrugens, encontram-se fungos endofíticos que parasitam esses agentes etiológicos, sobretudo, fungos do gênero *Sphaerellopsis*. Esse é conhecido como anamorfo de *Eudarluca*. As espécies desse gênero são micoparasitas bem conhecidos que ocorrem em ampla gama de ferrugens. A filogenia molecular do gênero ainda é discutida e o gênero é mostrado como pertencente à *Leptosphaeriaceae.* Sendo conhecidas as espécies *S. filum*, *S. macroconidiales* e *S. paraphysata* (Trakunyingcharoen et al., 2014).

Pesquisas realizadas por Fraser et al. (2021), com a espécie *S. macroconidiales*, mostravam os padrões sazonais do micoparasita como sendo mais prevalentes durante a estação seca, entre os meses de maio e novembro. Além de relatar o padrão de ocorrência do fungo nas pústulas de ferrugens, que se mostraram em maior abundância em lesões mais antigas. Apesar disso, *S. macroconidiales* mostrou capacidade de reduzir a carga de inóculo no início e após a estação de crescimento do fitopatógeno.

A espécie mais conhecida do gênero, a *S. filum*, foi descrita morfologicamente por Plachecka (2005). Os picnídios de *S. filum* são de coloração preta, brilhantes e observação microscópica. Os autores descreveram como *S. filum* agem sob *Puccinia recondita*. As hifas brancas e soltas desenvolvem-se na superfície e no interior das pústulas subglobulosos. Os urediniósporos em contato com o parasita são colapsados e desintegram-se. Além das ações mecânicas de *Sphaerellopsis* spp. observadas, pesquisas sobre a ação bioquímica por meio de metabólitos secundários têm sido realizados, por

exemplo, para aplicação no manejo da ferrugem do milheto (Ashmitha et al., 2020). Neste estudo, metabólitos foram explorados para conter a produção de urediniósporos, reduzindo assim a incidência de ferrugem. Foram relatados componentes bioquímicos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes. O estudo ainda mostrou a ocorrência de lise máxima dos uredinióporos de *P. substriata* em até 92,67% com a pulverização do metabólito bruto de *S. paraphysata* (Ashmitha et al., 2020).

2.6 DIVERSIDADE MOLECULAR EM FUNGOS

A diversidade genética consiste na variação dos alelos presentes nos organismos, a qual é garantida por fatores evolutivos como mutação, fluxo gênico, deriva genética e a seleção. A variabilidade de alelos dentro de uma população possibilita que os indivíduos possam reagir de formas diferentes a depender do ambiente que se encontram, no caso de organismos fitopatogênicos, por exemplo, podem se mostrar mais virulentos ou não (Thurow, 2018). A diversidade molecular, a qual além de englobar a variação dos alelos, leva em conta a variação nas sequências de DNA e proteínas, podendo influenciar na expressão gênica (Testa et al., 2009). Apesar de configurarem fatores vantajosos para sobrevivência e perpetuação dos organismos, representam um desafio para programas de melhoramento que buscam pela longevidade da resistência das variedades.

No mecanismo de mutação, a mudança na sequência do DNA em genes individuais possibilita a geração de novos alelos na população. Novas variantes genéticas, por meio de mutações, motivam a suplantação da resistência em plantas pelos patógenos (Thurow, 2018; Dallagnol & Dornelles, 2021). Da mesma forma, os elementos transponíveis, com a capacidade de moverem de um local para outro no genoma, podem ser inseridos em novas posições, criando novas variantes genéticas e contribuindo para evolução da população ao longo do tempo. O fluxo gênico pode introduzir novos alelos em uma população através da disseminação de esporos e recombinação gênica entre populações de patógenos (Griffiths et al., 2016).

A distribuição da diversidade molecular entre e dentro de populações também é influenciada pelo sistema de reprodução dos organismos em estudo. Patógenos com sistema de reprodução sexuada conferem maior capacidade de superar a resistência genética, por apresentar maior variabilidade genética e promover adaptação dos isolados a novos ambientes. Contrariamente, ao mecanismo de reprodução sexuada que pode aumentar a variabilidade, a deriva genética pode reduzir a diversidade por meio da perda

de alelos e fixação de alelos raros (Griffiths et al., 2016; Thurow, 2018). Outro mecanismo que pode gerar variabilidade genética em determinadas espécies de fungos é a reprodução parassexual, processo que independe da recombinação meiótica e envolve a anastomose de hifas haploides e, posterior fusão de dois núcleos para gerar um único núcleo diploide, e posterior redução cromossômica para gerar descendentes haploides recombinantes (Li et al., 2019).

Fatores ambientais podem atuar sobre os mecanismos naturais de variabilidade dos organismos, como a temperatura influenciando na quantidade e no tipo de mutação (Liu & Zhang, 2019). Assim como a estrutura genética de fungos pode ser influenciada por fatores geográficos, pela espécie hospedeira e os metabólitos secundários do hospedeiro. E, ainda, a pressão de seleção pode influenciar a composição molecular da população de fungos fitopatogênicos, por meio da adoção da não rotação de princípios ativos e modos de ação das moléculas químicas utilizadas para controle de doenças (Ghini & Kimati, 2002).

Estudos com *P. kuehnii* têm mostrado diversidade genética entre isolados, podendo ser identificados diferentes cepas com relação a diferenças localidades geográficas (Moreira et al., 2018), mostrando o quão relevante é o estudo dessa diversidade para entender o padrão de evolução desse patógenos e decidir a melhor estratégia de controle baseado nessas informações.

2.7 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR EM FUNGOS

O processo de análise da diversidade molecular em isolados de *P. kuehnii* e demais populações, se fundamenta em uma série de etapas que possibilitam a busca de variabilidade genética, compreensão da estrutura genética e características evolutivas do patógeno. Posto isso, a análise inicia-se pela coleta do fungo em diferentes locais geográficos, oriundos de folhas com lesões causadas pela doença. Baseado nas amostras coletadas, faz-se a extração de DNA total dos isolados. Em seguida, marcadores moleculares são selecionados de acordo com os objetivos da pesquisa, disponibilidade de recursos e das informações genéticas disponíveis. A partir dos marcadores selecionados, as regiões genômicas de interesse são amplificadas por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) fazendo-se uso de *primers* específicos. A determinação das sequências das regiões amplificadas, são realizadas por meio das técnicas de sequenciamento, que entregam mais informações sobre aquele organismo (Embrapa, 2007).

Em estudos com *P. kuehnii*, os marcadores moleculares têm sido muito utilizados, seja para estudo de correlação do genótipo com a virulência do fitopatógeno, seja para comparação genética entre os isolados. Usando marcadores AFLP, Sanjel et al. (2021) verificaram a ocorrência de duas raças de *P. kuehnii* na Flórida, sugerindo pequenas alterações genéticas no genoma do patógeno. Além de estudos de diversidade, marcadores AFLP e microssatélites são usados em estudos de caracterização morfológica e molecular de isolados de *P. kuehnii* (Perera et al., 2020). Usando marcadores microssatélites, Urashima et al. (2020) mostraram diversidade genética entre populações de *P. kuehnii* sendo divididos em quatro grandes agrupamentos, assim como o autor Mistura (2016), que revelou diversidade genética e fenotípica de *P. kuehnii* mostrando que há correlação direta entre o genótipo e fenótipo dos isolados.

Além dos marcadores moleculares e das técnicas de PCR, determinar a sequência de DNA dos fragmentos amplificados, configura etapa fundamental na análise da diversidade molecular. Nesse contexto, as tecnologias de sequenciamento contaram com alguns marcos importantes ao longo dos tempos, como o sequenciamento de Sanger em 1977 e o sequenciamento de nova geração (NGS) (Shendure et al., 2017). A metodologia de Sanger consiste em marcar radiotivamente alguns desoxinucleotídeos livres e adicioná-los em uma fita molde de DNA e, posteriormente, ler em impressão de PCR. Sanger incorporou reagentes típicos de uma PCR com a adição dos respectivos didesoxirribonucleotídeo trisfosofatado (ddNTP) em tubos separados. A cada ciclo de PCR um novo fragmento de DNA é formado dependendo do dNTP e ddNtp incorporado. O sequenciamento NGS utiliza tecnologias, como por exemplo, Illumina e Nanopore, que são técnicas mais aperfeiçoadas para melhor qualidade e menor tempo de sequenciamento, gerando maior quantidade e qualidade de leitura dos genomas (Silva et al., 2022).

Outra metodologia empregada na busca por diversidade genética e molecular em microrganismos é a filogenia molecular. A filogenia consiste na busca da compreensão das relações evolutivas entre os organismos e a identificação de espécies utilizando tanto características morfológicas quanto sequências moleculares. Devido à complexidade das características morfológicas e à subjetividade na interpretação associada aos métodos clássicos de identificação de espécies fúngicas, as técnicas moleculares levam a resultados mais precisos e rápidos (Martin & Rygiewicz, 2005). E ainda, as aplicações do estudo filogenético incluem a dispersão das espécies por meios da análise filogeográfica e a reconstrução de genomas ancestrais.

De acordo com Fajarningsih (2016), a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), das regiões de DNA ribossômico (rDNA) em fungos, tem sido fundamental na filogenia e identificação dos organismos. A região contém duas sub-regiões principais, ITS1 e ITS2, separadas por uma região conservada, 5.8S, e é altamente variável entre as espécies de fungos. Isso a torna uma ferramenta útil na distinção entre diferentes isolados e cepas de fungos fitopatogênicos como *P. kuehnii* e investigação de suas relações evolutivas e distribuição geográfica (Moreira et al., 2018). Adicionalmente, a comparação das sequências da região ITS de diferentes espécies de fungos oferece informações úteis sobre a origem, dispersão e potencial de adaptação das espécies (Dixon et al., 2010). Pesquisas com isolados de *P. kuehnii* da Austrália foram realizadas por Braithwaite et al. (2009), os quais compararam filogeneticamente 28 isolados, baseados em dados da região ITS, IGS (*Intergenic Spacer*) e LSU (*Large Subunit rRNA gene*). Por meio deste estudo, os autores puderam mostrar a diversidade dos isolados, com a divisão de três clados na análise filogenética. Da mesma forma, usando as regiões ITS e IGS, Moreira et al. (2018) estudaram isolados coletados em regiões brasileiras e encontraram diversidade entre isolados de populações de onze países, mostrando a capacidade do emprego da metodologia para avaliação da diversidade genética dentro da espécie causadora de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para inferir árvores filogenéticas que representam a história evolutiva dos grupos estudados. Uma dessas abordagens é a utilização de modelos evolutivos, que descrevem como as sequências moleculares evoluem ao longo do tempo. Os fatores evolutivos consideram diferentes aspectos da evolução molecular, como taxas de mutação e padrões de substituição, transversão e transição das bases nitrogenadas. Além dos modelos evolutivos, a construção de árvores filogenéticas também envolve a utilização de matrizes de distâncias, que representam a divergência entre as sequências moleculares comparadas. Essas matrizes podem ser construídas com base em análises quantitativas e qualitativas (Verli, 2014; Wiley & Lieberman, 2011). Como exemplo de metodologias para inferir árvores filogenéticas, o método *Neighbor-Joining* é baseado em distâncias de dissimilaridade, enquanto a Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana são métodos probabilísticos, comumente empregados para inferir estatisticamente as árvores filogenéticas. *Neighbor-Joining* agrupa pares de unidades taxonômicas que minimizam a soma total das ramificações em cada etapa, sendo eficiente e rápido para grandes conjuntos de dados (Saitou & Nei, 1987). Por outro lado, o método de Máxima Verossimilhança estima a

árvore filogenética que tem a maior probabilidade de ter gerado os dados observados, considerando modelos estatísticos de evolução molecular (Felsenstein, 1981). A Inferência Bayesiana estima as árvores filogenéticas utilizando cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) para amostrar árvores filogenéticas de acordo com a distribuição posterior de probabilidade, levando em consideração a incerteza nos parâmetros do modelo evolutivo (Wiley & Lieberman, 2011).

Como produto das análises de filogenia, as árvores filogenéticas são representações gráficas das hipóteses sobre a história evolutiva dos organismos. Elas consistem em pontos ou nós ligados por ramos, os nós terminais identificam os indivíduos ou genes que foram amostrados. É importante destacar que essas árvores são classificadas em cladograma ou filograma, a depender do tipo de dados, da finalidade do estudo, bem como da interpretação e da forma da representação gráfica da árvore. Os cladogramas objetivam mostrar as relações evolutivas com base em características derivadas, sejam morfológicas ou moleculares, por meio de clados conectados por linhas que representam a ordem de divergência evolutiva. Os filogramas são construídos com base na similaridade de sequências moleculares, apresentando uma estrutura de árvore onde os ramos refletem o grau de similaridade genéticas entre as sequências, com as distâncias proporcionais à sua similaridade (Wiley & Lieberman, 2011; Verli, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Folhas de cana-de-açúcar com lesões de ferrugem alaranjada foram coletadas em nove municípios do estado de Goiás e no município de Pedro Afonso, no estado do Tocantins, totalizando 36 ambientes de coleta (Tabela 1). As coletas ocorreram entre os meses de janeiro a março de 2023 e em fevereiro de 2024. Em cada ambiente, as amostras foram obtidas em um raio de aproximadamente três metros, constituindo uma amostra representativa de cada local (Figura 2). As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com suas respectivas coordenadas geográficas e transportadas à Escola de Agronomia, da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde foram armazenadas em câmara fria até a extração dos esporos fúngicos das lesões de ferrugem. No laboratório de Genética e Genômica de Plantas da UFG, os esporos foram coletados utilizando um método adaptado de Klosowski et al. (2015). Os esporos foram, cuidadosamente, raspados com uma lâmina de bisturi, visando aumentar a eficiência na

coleta. Em seguida, os esporos foram então armazenados em microtubos de 2 mL, mantidos a -20ºC, para posterior extração do DNA total.

Tabela 1. Identificação, data, local, e pontos geográficos de todas as amostras coletadas.

Identificação	Mês/Ano	Local	Coordenadas geográficas
Am01 (UFG-Goiânia1)	jan/23	Goiânia/GO	16º 36' 06" S 49º 16' 58" O
Am02 (UFG-Goiânia2)	mar/23	Goiânia/GO	16º 35' 55" S 49º 17' 37" O
Am03*	mar/23	Goiânia/GO	16º 36' 0.03" S 49º 16' 55" O
Am04*	fev/23	Pedro Afonso/TO	9º 26' 58" S 48º 07' 73" O
Am05 (UFG-Mauri 1)	jan/23	Maurilândia/GO	17º 57' 46" S 50º 19' 52" O
Am06 (UFG-Mauri 2)	mar/23	Maurilândia/GO	17º 59' 24" S 50º 17' 44" O
Am07 (UFG-Mauri 3	mar/23	Maurilândia/GO	17º 59' 24" S 50º 17' 44" O
Am08*	mar/23	Maurilândia/GO	17º 59' 26" S 50º 16' 32" O
Am09*	mar/23	Quirinópolis/GO	18º 34' 04" S 50º 26' 42" O
Am10*	mar/23	Quirinópolis/GO	18º 15' 61" S 50º 25' 57" O
Am11*	mar/23	Quirinópolis/GO	18º 33' 15" S 50º 19' 55" O
Am12*	mar/23	São Luiz do Norte/GO	14º 56' 35" S 49º 14' 26" O
Am13 (UFG-SLN)	mar/23	São Luiz do Norte/GO	14º 55' 23" S 49º 21' 41" O
Am14(UFG-SLN)	mar/23	São Luiz do Norte/GO	14º 55' 36" S 49º 22' 04" O
Am15 (UFG-Uruaçu 1)	mar/23	Uruaçu/GO	14º 25' 04" S 49º 03' 55" O
Am16 (UFG-Uruaçu 2)	mar/23	Uruaçu/GO	14º 24' 38" S 49º 03' 37" O
Am17 (UFG-Uruaçu 3)	mar/23	Uruaçu/GO	14º 25' 59" S 49º 04' 21" O
Am18 (UFG-Uruaçu)	mar/23	Uruaçu/GO	14º 27' 03" S 49º 08' 20" O
Am19*	mar/23	Jandaia/GO	17º 12' 53" S 50º 09' 14" O

Identificação	Mês/Ano	Local	Coordenadas geográficas
Am20*	mar/23	Jandaia/GO	17º 16' 58" S 50º 08' 55" O
Am21*	mar/23	Jandaia/GO	17º 15' 51" S 50º 08' 51" O
Am22 (UFG-Goianésia 1)	mar/23	Goianésia/GO	15º 13' 19" S 49º 10' 39" O
Am23*	mar/23	Goianésia/GO	15º 05' 29" S 49º 16' 33" O
Am24 (UFG-Goianésia 2)	mar/23	Goianésia/GO	15º 03' 59"S 49º 15' 46" O
Am25*	mar/23	Goianésia/GO	15º 01' 23" S 49º 16' 30" O
Am26*	mar/23	Goianésia/GO	15º 14' 07" S 49º 00' 07" O
Am27 (UFG-Goianésia 3)	mar/23	Goianésia/GO	15º 08' 22" S 48º 53' 45" O
Am28*	mar/23	Goianésia/GO	15º 11' 40" S 49º 04' 00.7" O
Am29 (UFG-Goianésia 4)	mar/23	Goianésia/GO	15º 13' 09" S 49º 07' 55" O
Am30 (UFG-Goianésia 5)	mar/23	Goianésia/GO	15º 08' 52" S 48º 55' 52" O
Am31*	mar/23	Goianésia/GO	15º 08' 29" S 48º 53' 49" O
Am32 (UFG- Port 1)	mar/23	Porteirão/GO	17º 52' 10" S 50º 20' 52" O
Am33 (UFG-Port 2)	mar/23	Porteirão/GO	17º 44' 10" S 50º 08' 48" O
Am34*	mar/23	Jataí/GO	17º 49' 33" S 51º 22' 49" O
Am35*	mar/23	Serranópolis/GO	18º 27' 54" S 52º 12' 13" O
Am36 (UFG-Goiânia)	fev/24	Goiânia/GO	16º 35' 60" S 49º 16' 58" O

* Indica amostras excluídas devido à baixa qualidade do sequenciamento.

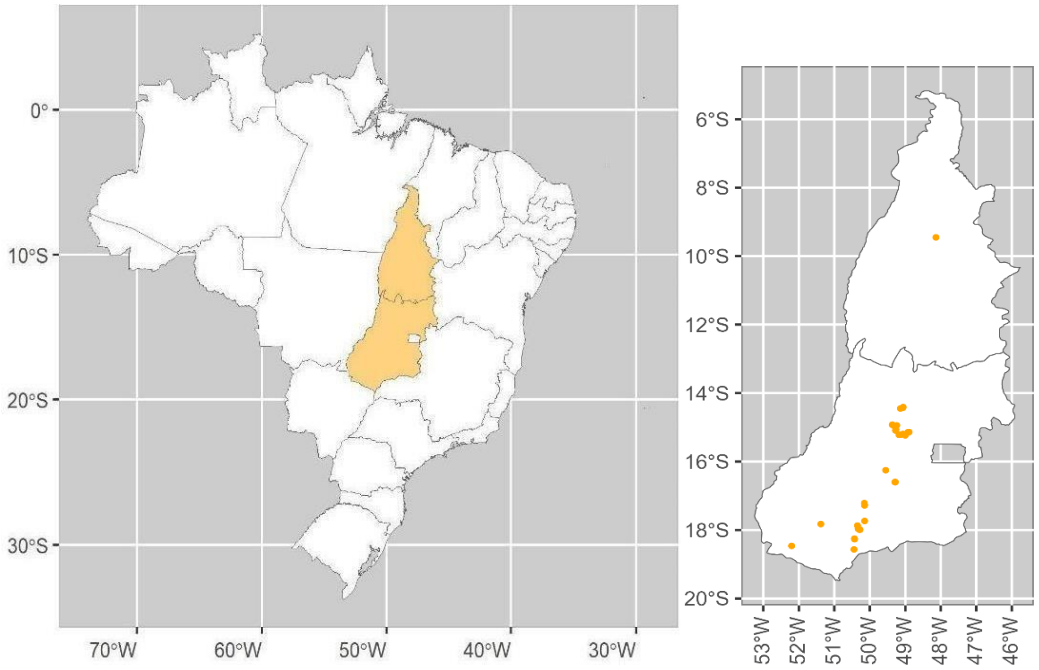

Figura 2. Pontos de coletas de amostras, realizados em dezenove locais nos estados de Goiás e Tocantins.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO DE PCR

A extração de DNA foi realizada de acordo com protocolo proposto por Villaréal et al. (2002) e adaptado por Alessio (2013). A verificação da integridade do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, a quantificação e a pureza do DNA extraído foram indicadas por meio da análise espectrofotométrica, no equipamento *Nanodrop (Thermo Scientific).*

A reação de PCR foi conduzida em termociclador PCR T100-Bio-Rad, com volume total de 25 µL. Foram utilizados na reação 2,5 µL de DNA amostral diluído a 50 ng/µL e 2,5 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), adicionalmente, o kit comercial multiplex QIAGEN® foi usado de acordo com recomendações do fabricante. Por não se tratar de cultura monospórica, os *primers* utilizados foram para amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), ITS5F (5’ GGAAGTAAAAGTCGT 3’) e ITS4R (5’ TCCTCCGCTTATTGA 3’) (White et al., 1990) a uma concentração final de 2 µM. A programação da PCR consistiu em pré-aquecimento por 15 minutos a 95ºC, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30 segundos, anelamento a 60ºC por 40 segundos, período de extensão a 72ºC por 40 segundos e extensão final a mesma temperatura por cinco minutos. A separação dos fragmentos foi realizada em gel de agarose a 1% em eletroforese, com tampão de carregamento com *Gel red*. A corrida teve duração de

aproximadamente 60 minutos a 100 V e 160 mA. O tamanho esperado dos fragmentos foi de aproximadamente 600 pares de base.

3.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

A purificação do produto de PCR foi realizada baseado na adição de 50 μL de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5 M), incubação a 37ºC por 30 minutos e centrifugação por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 125 μL de etanol 80% e após um minuto foi novamente centrifugado. Os sobrenadantes foram descartados novamente e evaporados a 55ºC, os *pellets* foram ressuspendidos em 15 μL de água ultrapura. Após purificação do produto de PCR foi realizado o sequenciamento *Sanger* (Sanger et al., 1977) em equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio), do Instituto de Ciências Biológicas, da UFG.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

A qualidade dos dados brutos foi avaliada por meio do programa *PHRED* (*Phil's Read Editor*). Sítios com *score phred* inferiores a 15 foram removidos, e as sequências consenso foram montadas no *PHRAP* (Ewing & Green, 1998). O blastn (Altschul et al., 1990) foi utilizado para identificação e anotação dos contigs obtidos por meio do alinhamento de sequências contra o banco de dados da região ITS do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foram baixadas do banco de dados do GenBank (NCBI) quarenta e oito sequências utilizadas nas análises filogenéticas, das quais seis sequências foram utilizadas nas representações gráficas como grupos externos (Apêndice A). Os grupos externos são sequências que não pertencem ao grupo principal em estudo, mas são incluídas para fornecer a raiz da árvore filogenética, o que ajuda a orientar e distinguir as relações evolutivas entre as sequências analisadas.

Para as análises filogenéticas, alinhamentos múltiplos foram obtidos no programa R 4.3.2 (R Core Team, 2024) com o pacote *MAS* (Bodenhofer et al., 2015) com algoritmo *Muscle*. Os alinhamentos foram inspecionados no programa Jalview 2.11.1.4 (Waterhouse et al., 2009). As análises foram realizadas com o pacote *PHANGORN* (Schliep, 2011) com uso da função ModelTest para escolha dos melhores modelos de substituição baseados no *Akaike Information Criterion* (AIC) (Akaike, 1974), na análise de Máxima Verossimilhança. A escolha dos modelos evolutivos para análise Bayesiana foi realizada no MrModeltest2 v.2.4 (Posada & Crandall, 1998) sob AIC. As análises

foram feitas no programa MrBayes v 3.2.7a (Ronquist et al., 2012) com 10 milhões de gerações, amostrando a cada 1000 gerações. As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree 1.2.2 (Rambaut, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os alinhamentos das amostras sequenciadas, em comparação ao banco de dados de nucleotídeos do GenBank, permitiram a identificação de três espécies de fungos: *Puccinia kuehnii*, *Sphaerellopsis paraphysata* e *Hyweljonesia queenslandica* (Figura 3). Das 36 amostras originais, 19 foram mantidas após a exclusão das que apresentaram baixa qualidade de sequenciamento. Dentre as amostras analisadas, quatro foram identificadas como *P. kuehnii*, dez como *S. paraphysata* e cinco como *H. queenslandica* (Figura 3). Embora as sequências da região ITS tenham sido utilizadas, o BLASTn foi realizado com o banco de dados de nucleotídeos, devido ao número reduzido de sequências disponíveis no banco ITS. A porcentagem de identidade, que reflete a similaridade entre as sequências de interesse e as depositadas no banco de dados, variou de 92,56% a 99,61% entre as espécies identificadas (Tabela 2). A cobertura da sequência de interesse (Query cover) com as sequências do banco de dados apresentou valores superiores a 90% (Tabela 2). O E-value, que indica a probabilidade de alinhamentos encontrados ao acaso, foi significativo para todas as espécies analisadas (Tabela 2), reforçando a baixa chance de que esses alinhamentos tenham ocorrido aleatoriamente.

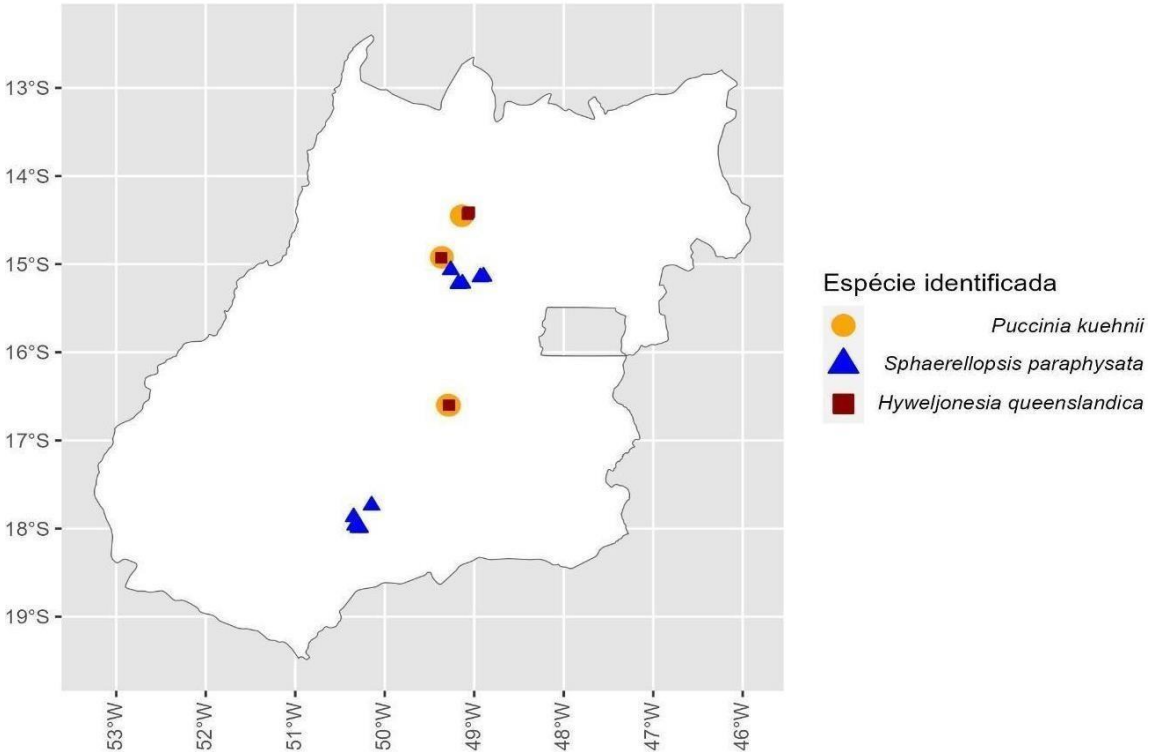

Figura 3. Identificação e distribuição espacial, no estado de Goiás, das espécies de fungos coletadas em lesões de ferrugem alaranjada.

Tabela 2. Alinhamento *Blastn* das sequências das amostras do estudo contra o banco de dados nr/nt.

Amostras	ID	Query Cover	E-value	Per. Ident.
UFG-Goiânia 1	*Puccinia kuehnii*	100%	0,00	95,58%
UFG-Goiânia 2	*Puccinia kuehnii*	100%	0,00	94,02%
UFG-SLN	*Puccinia kuehnii*	100%	0,00	97,89%
UFG-Uruaçu	*Puccinia kuehnii*	100%	9×10^{-170}	98,01%
UFG-Mauri 1	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	97,27%
UFG-Mauri 2	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,42%
UFG-Mauri 3	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,42%
Goianésia 1	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,61%
Goianésia 2	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,03%
Goianésia 3	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,61%
Goianésia 4	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,25%
Goianésia 5	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	95,17%
UFG-Port 1	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,42%
UFG-Port 2	*Sphaerellopsis paraphysata*	100%	0,00	99,33%
UFG-Uruaçu 1	*Hyweljosia queenslandica*	91%	2×10^{-125}	96,76%
UFG-Uruaçu 2	*Hyweljosia queenslandica*	99%	8×10^{-161}	93,45%
UFG-Uruaçu 3	*Hyweljosia queenslandica*	98%	0,00	92,56%
UFG-SLN	*Hyweljosia queenslandica*	98%	1×10^{-128}	93,77%
UFG-Goiânia	*Hyweljosia queenslandica*	98%	0,00	92,95%

ID: Identificação única do alinhamento encontrado no banco de dados; **Query Cover**: Percentual da sequência de entrada que é coberta pelo alinhamento com a sequência no banco de dados; **E-value**:

Valor expectante, que indica a probabilidade de o alinhamento ter ocorrido por acaso; **Per. Ident.**: Percentual de identidade, que representa a proporção de nucleotídeos idênticos no alinhamento em relação à sequência de entrada.

4.1 DIVERSIDADE MOLECULAR EM *Puccinia kuehnii*

Das 19 sequências analisadas, quatro foram identificadas como *P. kuehnii*. A análise descritiva da diversidade genética das amostras, realizada com o software DnaSP v. 6 (Librado & Rozas, 2009), incluindo as sequências de *P. kuehnii* obtidas do banco de dados (APÊNDICE A), revelou uma diversidade genética moderada, com 46 sítios polimórficos e um total de 48 mutações. A diversidade nucleotídica foi de aproximadamente 4% ($\pi = 0,39$) entre os 666 sítios avaliados.

Uma etapa importante do programa de melhoramento da RIDESA/UFG é a avaliação da reação dos genótipos das etapas finais do programa, em relação às principais doenças que acometem a cana-de-açúcar. Dentre as doenças estudadas, ressalta-se a importância da ferrugem alaranjada, devido aos danos provocados pela doença no estado de Goiás. A análise filogenética das populações de *P. kuehnii* coletadas em Goiás, revelou a formação de três grupos principais da espécie. O grupo 1 incluiu amostras encontradas nos municípios de Goiânia 1 e Uruaçu (Figura 4), que apresentaram alta similaridade molecular. Esse resultado indica que a coleta dos urediniósporos, para fins de inoculação, em um desses municípios seja suficiente para representar a região. No entanto, como houve maior dissimilaridade molecular das amostras coletadas em São Luiz do Norte e Goiânia 2, também se faz necessário a coleta dos esporos para testes de inoculação, nesses dois municípios. Dessa forma, para uma inoculação que representa diversidade entre as cepas de *P. kuehnii*, faz-se necessário a coleta em diferentes ambientes devido a diversidade genética apresentada pelo fungo que pode ser algo dinâmico. O grupo 2, com amostras da Indonésia, Samoa e Papua Nova Guiné, apresentaram considerável dissimilaridade molecular em comparação ao primeiro grupo que inclui as amostras analisadas neste trabalho, além disso, a análise filogenética mostra a formação de um agrupamento distinto como grupo externo, confirmando a separação filogenética da espécie *P. melanocephala* das demais amostras de *P. kuehnii* (Figura 4).

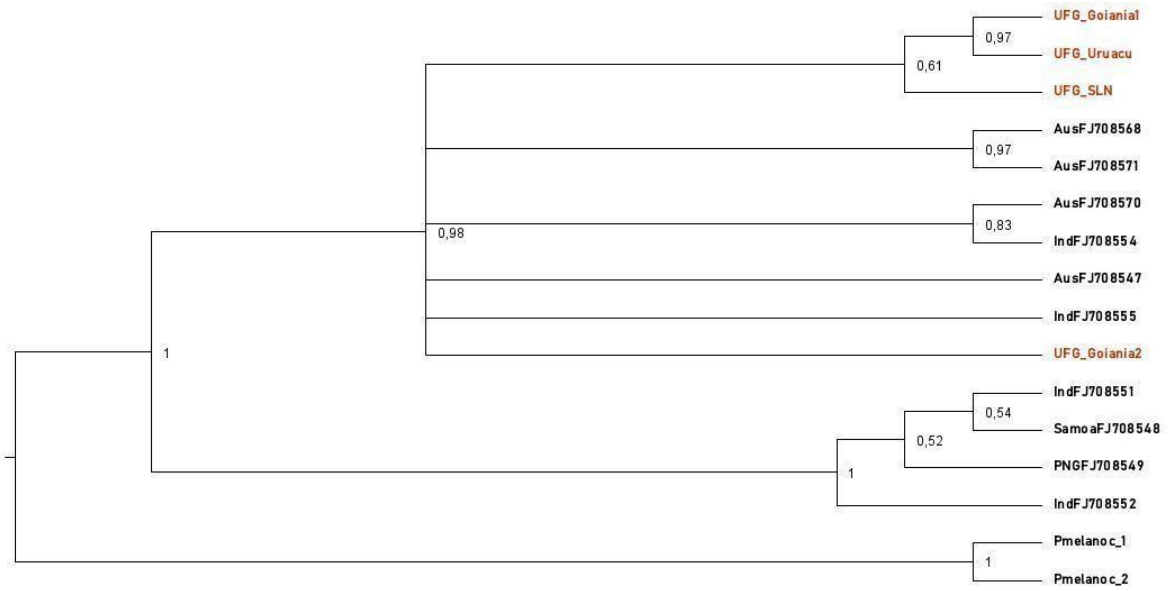

Figura 4. Árvore filogenética construída a partir de sequências da região ITS, utilizando análise de inferência bayesiana e enraizamento com sequências da espécie de *Puccinia melanocephala*. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para o conjunto das sequências foi o HKY (*Hasegawa-Kishino-Yano*), que considera diferentes taxas de transição e transversão. Valores de probabilidade posterior são indicados por números.

Pesquisas com isolados de *P. kuehnii* foram realizadas por Braithwaite et al. (2009), os quais compararam filogeneticamente 28 isolados provenientes de herbários feitos com plantas de campos comerciais, selvagens e de jardins, coletados na Austrália, Papua Nova Guiné, Indonésia e China. Estes autores encontraram três grupos filogenéticos indicando que há evidências de diversidade genética considerável entre populações de *P. kuehnii*.

Com intuito de compreender o movimento de *P. kuehnii*, a partir da Austrália para o continente Americano, Glynn et al. (2010) verificaram a variabilidade deste patógeno nas diversas regiões com a presença da doença. Por meio de análises de polimorfismo na região ITS1, encontraram dois alelos de *P. kuehnii* (183A e 183G) e dentre esses alelos, apenas o 183A predomina no hemisfério Oeste. Conforme Glynn et al. (2010), há duas possíveis formas da chegada do alelo 183A no hemisfério Oeste: dispersão aérea a partir do hemisfério Leste ao hemisfério Oeste; ou transporte indevido de material vegetal com folhas infectadas da Austrália e Ásia, seguido por rápida dispersão. De forma similar, pode-se indicar que a diversidade genética observada entre as amostras de *P. kuehnii*, em Goiás, pode refletir diferentes fontes de introdução do patógeno na região. A proximidade molecular observada entre a amostra local (Goiania

2) e aqueles da Indonésia (Figura 4) pode indicar uma possível rota de dispersão envolvendo movimento humano ou transporte de material vegetal contaminado.

Em estudo de comparação, Moreira et al. (2018) revelaram, por meio da análise filogenética das regiões ITS e IGS, agrupamento de seis isolados brasileiros com outros isolados da Austrália, Indonésia e Cuba. Esses resultados corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que as amostras coletadas em Goiás foram agrupados em conjunto com isolados da Austrália e Indonésia, formando o grupo 1 (Figura 4). Ainda de acordo com Moreira et al. (2018), a rota de disseminação para o Brasil, provavelmente tenha ocorrido após a epidemia na Austrália, no ano de 2000, devido à similaridade nas sequências entre os isolados brasileiros, americanos e australianos. Em 2007, ocorreu o primeiro relato de *P. kuehnii* próximo a *Belle Glade*, na Flórida, encontrados em folhas de cana-de-açúcar de variedades resistentes à ferrugem marrom, e, posteriormente, infectando lavouras no Sul da Flórida (Comstock et al. 2010).

No Brasil, o primeiro relato da doença, foi no ano de 2009, no Estado de São Paulo, em pouco tempo o fitopatógeno se fez presente em outras regiões produtoras de cana-de-açúcar do país como no estado do Paraná (Barbasso et al., 2010). Ademais, o primeiro relato de fitopatógeno no continente africano ocorreu em 2011 e não se sabe ao certo de quais continentes os esporos possam ter vindo (Saumtally et al., 2011).

Ainda baseado na análise intraespecífica, com abordagem de divergência, foi realizada Análise de Coordenadas Principais (Figura 5) e Análise de correlação cofenética que revelaram concordância com os resultados da árvore filogenética. O grupo externo, com dois isolados de *P. melanocephala*, formaram um agrupamento bem definido, assim como os isolados IndFJ708551, SamoaFJ708548, PNGFJ708549 e IndFJ708552 (Figura 5) e um terceiro agrupamento incluindo amostras locais (UFG-Goiânia 1, UFG-Uruaçu, UFG-SLN e UFG-Goiânia 2) e de isolados da Austrália e Indonésia (AusFJ708568, AusFJ708571, AusFJ708570, IndFJ708554, AusFJ708547 e IndFJ708555) (Figura 5). A análise cofenética com teste de Mantel, revelou correlação forte e positiva entre as distâncias originais e as distâncias cofenéticas (r = 0,99). Esses resultados indicam boa concordância entre as distâncias originais e a representação bidimensional.

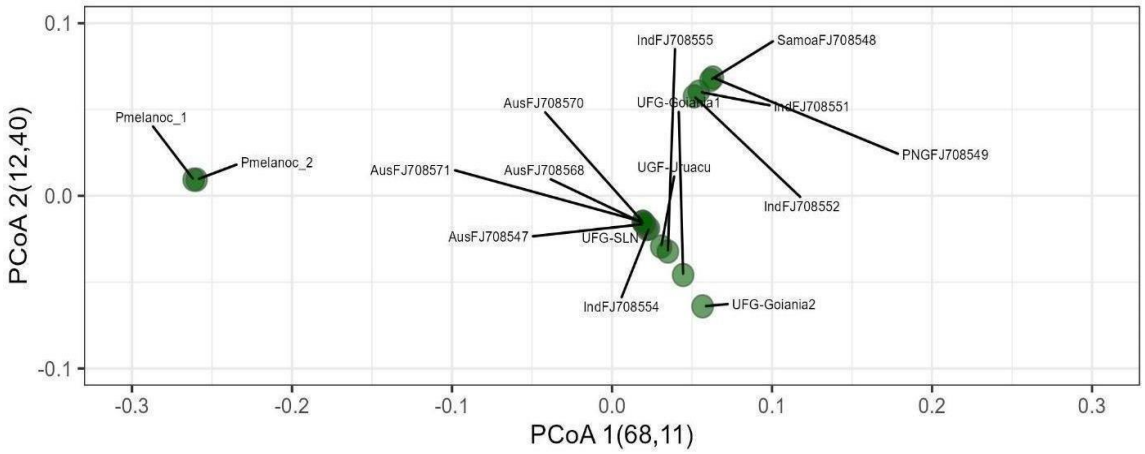

Figura 4. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada em divergência intraespecífica de *P. kuehnii*.

4.2 DIVERSIDADE MOLECULAR EM *Sphaerellopsis paraphysata* E *Hyweljonesia queenslandica*

Das 19 amostras de folhas com lesões de ferrugem alaranjada, além do fitopatógeno *P. kuehnii*, dez amostras foram identificadas molecularmente como da espécie *Sphaerellopsis paraphysata* e cinco da espécie *Hyweljonesia queenslandica* (Figura 3; Tabela 2). Fungos do gênero *Sphaerellopsis* têm sido encontrados associados em lesões causadas por fungos fitopatogênicos do gênero *Puccinia* em gramínea como milheto e outras culturas; e como micoparasitas do agente causal da ferrugem alaranjada (Ashmitha et al., 2019; Bordon & Pfender, 2012). Na cana-de-açúcar, existem relatos de associação de *S. filum*, com ação parasita sobre *P. kuehnii* (Leite & Urashima, 2017). No entanto, este é o primeiro registro de *S. paraphysata* nesta cultura, ampliando o conhecimento sobre os fungos associados às lesões de ferrugem alaranjada e destacando a relevância de novas investigações sobre seu papel ecológico e potencial biotecnológico.

Na análise filogenética de *S. paraphysata*, as amostras foram organizadas em três grupos principais, evidenciando a diversidade molecular entre os isolados (Figura 6). O grupo 1 compreende amostras internacionais e brasileiras, incluindo India_Sp, ChiKUMCC, TaiNCYUCC, AusCBS, AfrCPC, BraCPC, BraSBIBC e IndiaSP_201. Esse grupo apresentou valores de suporte moderados a elevados (0,83), indicando uma relação filogenética próxima entre as sequências brasileiras e as amostras internacionais depositadas no Genbank (Trakunyingcharoen et al., 2018).

O grupo 2, formado exclusivamente por amostras goianas, divide-se em três subgrupos, demonstrando a existência de diversidade molecular entre as amostras regionais. O subgrupo 2.1 incluiu as amostras Goianesia1 e Goianesia5, que se agrupam

de forma distinta das demais amostras goianas, sugerindo variações genéticas significativas dentro das populações locais. O subgrupo 2.2 foi composto pelas amostras UFG_Mauri1, UFG_Mauri2, UFG_Mauri3, UFG_Port1 e UFG_Port2, este subgrupo apresentou elevados valores de suporte (0,97), indicando alta similaridade genética entre as amostras provenientes das regiões de Maurilândia e Porteirão, reforçando uma relação filogenética estrita entre essas amostras. O subgrupo 2.3 agrupa as amostras de Goianesia2, Goianesia3 e Goianesia4, que se posiciona em um grupo separado dos demais subgrupos de Goianésia, destacando-se pela variação molecular entre esses isolados, o que pode refletir diferenças nas condições ambientais ou no histórico evolutivo das amostras (Figura 6). Essa subdivisão em três subgrupos sugere uma estruturação genética dentro da população regional. As variações genéticas observadas reforçam a hipótese de que diferentes subpopulações podem estar adaptadas a condições ambientais específicas, refletindo um possível isolamento genético e adaptativo na região.

O grupo 3 é composto por amostras da família *Leptosphaeriaceae* (Leptos_1 e Leptos_2), que formam o grupo separado dos demais grupos, usado para o enraizamento da árvore, reforçando a distinção filogenética entre esse grupo com as demais amostras de *S. paraphysata* (Figura 6). Bayon et al. (2006) investigaram a diversidade genética entre 51 isolados de *S. filum* e identificaram que as sequências ITS foram praticamente idênticas entre si, consequentemente com índices de baixa diversidade. Esse resultado possivelmente pode estar relacionado ao ciclo assexual do fungo, uma vez que a forma sexual é raramente encontrada.

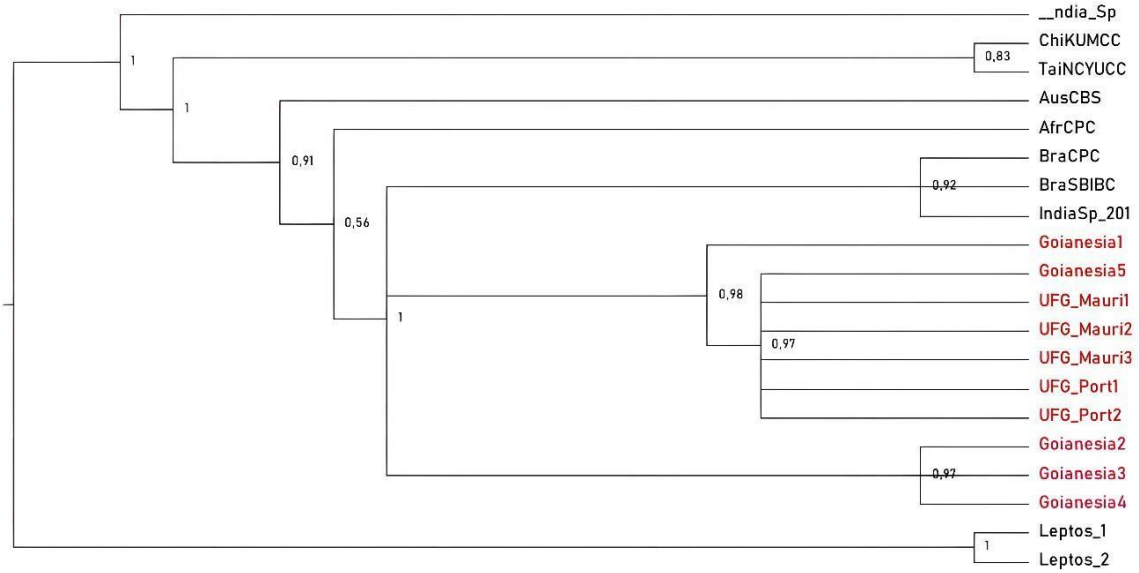

Figura 6. Árvore filogenética construída a partir de sequências da região ITS, utilizando análise de inferência bayesiana e enraizada com sequências da família *Leptosphaeriaceae*. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para o conjunto das sequências foi o GTR (*General Time*

Reversible) que considera todas as possíveis substituições nucleotídicas de forma independente a uma taxa simétrica. Valores de probabilidade posterior são indicados por números.

Em relação ao potencial biotecnológico de *S. paraphysata*, estudos sobre mecanismos de ação do micoparasita foram explorados por Ashmitha et al. (2020) que mostraram redução na produção de urediniósporos de *Puccinia* com pulverização dos metabólitos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes. Gordon & Pfender (2012) conduziram, em ambiente controlado, a inoculação de *S. filum* e verificaram a redução na produção de esporos de *Puccinia graminis*. Um desafio reportado na literatura, para uso desse agente biológico como controle para ferrugem alaranjada, tem sido a dificuldade para o desenvolvimento efetivo do fungo em meio de cultura e um método mais adequado de aplicação do fungo endofítico (Gordon & Pfender, 2012).

O terceiro fungo observado, *Hyweljonesia queenslandica*, foi coletado pela primeira vez, de um casulo de coleóptero não identificado aderido a folha de uma dicotiledônea, na Austrália, em 2016 (Shivas et al., 2016). *H. queenslandica* é classificado como *Dothideomycetes* e não foi possível encontrar na literatura maiores informações sobre a atividade da espécie, se *H. queenslandica* atua como fungo fitopatogênico, causador de doenças em plantas ou como um saprófito, que se alimenta exclusivamente de matéria orgânica morta, sem causar danos às plantas hospedeiras. A análise filogenética das cinco amostras brasileiras de *H. queenslandica*, comparadas com duas sequências de isolados coletadas na Austrália, revelou a formação de dois grupos filogeneticamente distintos, evidenciando a existência de diversidade genética dentro da espécie (Figura 7). As amostras brasileiras formam um grupo separado dos isolados australianos, sugerindo variações genéticas regionais. Considerando a presença de *H. queenslandica* em lesões de ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar, torna-se necessário aprofundar os estudos para explorar a interação desse fungo com o agente causal da doença, a fim de compreender seu papel ecológico e seu impacto na cultura.

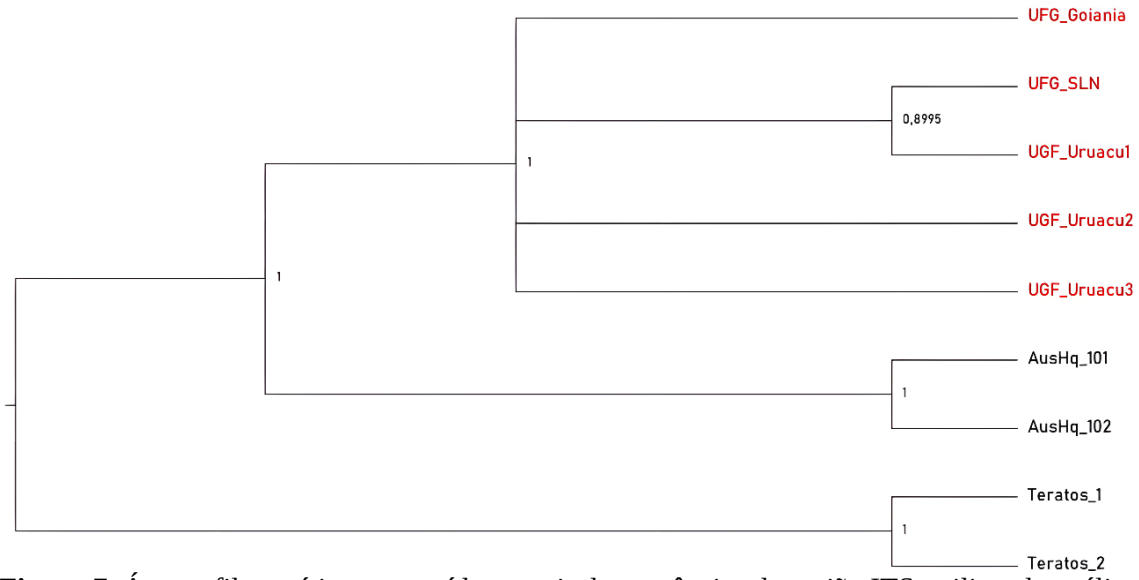

Figura 7. Árvore filogenética construída a partir de sequências da região ITS, utilizando análise de inferência bayesiana e enraizada com sequências da família *Teratosphaeriaceae*. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para o conjunto das sequências foi o GTR (*General Time Reversible*) que considera todas as possíveis substituições nucleotídicas de forma independente a uma taxa simétrica. Valores de probabilidade posterior são indicados por números.

5 CONCLUSÕES

Em lesões de ferrugem alaranjada, além do fungo fitopatogênico *Puccinia kuehnii*, foram identificados os fungos *Sphaerellopsis paraphysata* e *Hyweljonesia queenslandica*. Enquanto *S. paraphysata* apresenta potencial biotecnológico para o controle da ferrugem, *H. queenslandica* ainda carece de informações na literatura sobre seu papel, não sendo possível determinar se é um fungo saprófita ou fitopatogênico.

Para uma inoculação mais eficaz, visando obter isolados de *P. kuehnii* com maior diversidade molecular, é importante realizar coletas de esporos em diferentes pontos, considerando a diversidade e a dinâmica populacional do patógeno.

A análise filogenética de *Sphaerellopsis paraphysata* sugere que diferentes subpopulações locais podem estar adaptadas a condições ambientais específicas, refletindo um isolamento genético parcial na região.

A análise filogenética de *Hyweljonesia queenslandica* indica um possível isolamento entre as populações. Há necessidade de mais pesquisas para aprofundar o conhecimento dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDE, M. I. da S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v. 23, n. 2, p. 241-248, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-84781993000200022. Acesso em: 13 set. 2022.

AGOSTINI, D'. S.; REBOUÇAS, M. M.; BATISTA FILHO, A.; VITIELLO, N. A Cana-de-açúcar permeando pelo centro de memória do instituto biológico. **Instituto Biológico**. São Paulo, SP, 2009.

AGROFIT, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário**, 2014. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/princ. Acesso em: 19 out. 2022.

AKAIKE, H. (1974). A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, **19**(6), 716-723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705.

ALESSIO, V.M.; HOFFMANN, H.P.; CARNEIRO, M.S. Método rápido para extração de DNA de *Puccinia kuehnii*. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.3, p.198-200, 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alingnment search tool. **Journal of Molecular Biology**, United States, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C. O. N.; MORAES, V. A.; FERNANDES, C. R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, v.39, p.13-16, 1987.

ASHMITHA SRI, P., RAGUCHANDER, T. JOHNSON, I. Occurrence of mycoparasitic fungi *Sphaerellopsis paraphysata* on pearl Millet rust pathogen, *Puccinia substriata* in India. **Madras Agric. J.**, v.106, p.249-254, 2019. doi:10.29321/MAJ 2019.000255

ASHMITHA SRI, P.; SENDHILVEL, V.; RAGUHANDER, T. Metaboltes of the rust mycoparasite, *Sphaerellopsis paraphysata* for manageme in pearl Millet. **Journal of Biological Control**, v.34, n.2, p.94-100, 2020. Doi:10.18311/jbc/2020/25236

BAYON, C.; PEI, M. H.; RUIZ, C.; HUNTER, T. Genetic structure and spatial distribution of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* on Melampsora larici-epitea in a short-rotation coppice willow planting. **Plant Pathology**, v. 56, p. 616-623, 2006. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01606.x

BARBASSO, D.; JORDÃO, H.; MACCHERONI, W.; BOLDINI, J.; BRESSIANI, J.; SANGUINO, A. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agente of orange rust of sugarcane, in Brazil. **The American Phytopathological Society (APS)**, v. 94, n. 9, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1170C. Acesso em: 09 abr. 2024.

BODENHOFER, U.; BONATESTA, E.; HOREJS-KAINRATH, C.; HOCHREITER, S. (2015). msa: an R package for multiple sequence alignment. Bioinformatics, v.31, n.24 p.3997-3999. DOI: doi:10.1093/bioinformatics/btv494.

BORELLA, J. **Reação dos principais genitores de cana-de-açúcar da Ridesa às ferrugens marrom e alaranjada e associação com marcadores moleculares.** 2022. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

BRAITHWAITE, K.S., CROFT, B.J., MAGAREY, R.C. *et al.* Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian* **Plant Pathology** 38, 380-388 (2009). https://doi.org/10.1071/AP09012

COMSTOCK, J. C.; GLYNN, N. C.; DAVIDSON, W. R. **Sugarcane rusts in Florida**. Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol., Vol. 27, 2010. Disponível em: https://issct.org/wp-content/uploads/proceedings/2010/2010%20Comstock,%20SUGARCANE%20RUSTS%20IN%20FLORIDA.pdf. Acesso em: 19 set. 2022.

CONAB. Boletim da cana-de-açúcar: 4º levantamento - 2023/24. Brasília, DF, 2024. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana. Acesso em: 06 maio 2024.

DALLAGNOL, L. J. & DORNELES, K. da R. Resistência genética da planta a agentes patogênicos. *In*: RIOS, J. A.; ALMEIDA, L. C. SOUZA, E. B. de. **Resistência de plantas a patógenos**. 1. ed. Recife, PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2021. ISBN 978-65-00-20814-6.

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

DURGADEVI, D.; RAJENDRAN, L.; KARTHIKEYAN, G.; RAGUCHANDER, T. Investigation of rust mycoparasite *Sphaerellopsis filum* (TNAU SF1) volatilome during mono and di-partite interaction with *Puccinia arachidis*, causing Peanut rust. **European Journal of Plant Pathology**, n.168, p.167-181, 2024.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Márcia Cristina de Sena Oliveira et al. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007.

EMBRAPA. Circular Técnica 160 - online. Petrolina: Embrapa, 2014, p. 10. Disponível em: Circ Técnica Manejo de palhada.indd (embrapa.br). Acesso em: 14 fev. 2023.

EWING, B. & GREEN, P. (1998) Base-Calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res 8: 186-194.

FAOSTAT. **Crops and livestock products**. 2022. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#data/QSL. Acesso em: 28 set. 2022.

FAJARNINGSIH, N. D. Internal transcribed spacer (ITS) as DNA barcoding to identify fungal species: a review. **Squalen Bull. of Mar. and Fish**. v. 11, n. 2, p. 37-44, 2016.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal Molecular Evolution**. v. 17, n. 6, p. 368-76, 1981 DOI: 10.1007/BF01734359.

FIGUEIREDO, M. B. & PASSADOR, M. M. Morfologia, funções dos soros e variações dos ciclos vitais das ferrugens. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.117-134, 2008.

FRASER, S.; MCTAGGART, A. R.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Hyperparasitism by *Sphaerellopsis macroconidialis* may lower over-wintering survival of *Uromycladium acaciae*. **Forest Pathology**, v.51, 2021.

GORDON, T. C. & PFENDER, W. F. Effects of the Mycoparasite *Sphaerellopsis filum* on Overwintering Survival of Stem Rust in Perennial Ryegrass. **Plant Disease**, v. 96, p.1474-1481. 2012

GHINI, R & KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2002.

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

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B. & DOEBLEY, J. **Introdução a genética**. Tradução Sylvia Werdmüller von Elgg Roberto. – 11. ed. – Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan, 2016.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J Mol Evol**. v.22, n.2, p.160-74.1985. DOI: 10.1007/BF02101694. PMID: 3934395.

KLOSOWSKI, A.C. **Escala diagramática, segregação da resistência em progênies de cana-de-açúcar e reação de cultivares à ferrugem alaranjada (***Puccinia kuehnii)*. 2012. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

KLOSOWSKI, A. C.; FILHO, J. C. B.; RUARO, L.; FRAGOSO, R. B.; MIO, L. L. M. Reação de cultivares e época de avaliação da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, vol. 31, n. 2, p. 489-498, 2015.

KOCH, G. **Eficácia de fungicidas no controle das ferrugens marrom e alaranjada da cana-de-açúcar**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção vegetal) - Setor de ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

KRÜGNER, T. L. A Natureza da doença. *In*: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. 3ª ed. v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.34-43, 1995.

LEITE, F. A. C. & URASHIMA, A. S. Levantamento da incidência e severidade de *Sphaerellopsis filum* em pústulas de ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) da cana-de-açúcar. *In*: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 50, 2017, Uberlândia. 50 anos de fitopatologia: do manejo à edição do genoma. Disponível em: http://anais.infobibos.com.br/CBFito/50/Resumos/Resumo50CBFito_0082.pdf. Acesso em: 04 jan. 2024.

LI, F., UPADHYAYA, N. M., SPERSCHNEIDER, J., MATNY, O., NGUYEN-PHUC, H., MAGO, R., RALEY, C., MILLER, M. E., SILVERSTEIN, K. A. T., HENNINGSEN, E., HIRSCH, C. D., VISSER, B., PRETORIUS, Z. A., STEFFENSON, B. J., SCHWESSINGER, B., DODDS, P. N., & FIGUEROA, M. Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. **Nature communications**, v.10, n.1, p.5068, 2019.

LIU, H. & ZHANG, J. Yeast Spontaneous Mutation Rate and Spectrum Vary with Environment. **Current Biology, v.** 29, p.1584-1591, 2019.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p.1451-1452, 2009.

MARTIN, K. J. & RYGIEWICZ, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**. v. 5, n. 28, p.1471-2180, 2005.

MATSUOKA, Z. Identificação de doenças da cana-de-açúcar e medidas de controle. *In*: SANTOS, F. & BORÉM, A. **Cana-de-açúcar do plantio à colheita**. Ed. UFV, p.89-115. 2016.

MISTURA, M. de F. **Fatores que influenciam no sucesso e longevidade do controle das ferrugens da cana-de-açúcar por variedades resistentes**. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) Universidade Federal de São Carlos, 2016. Disponível em: https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/8303?show=f. Acesso em: 15 set. 2022.

MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; SANTOS, J. M.; SAMPAIO, M.; CÂMARA, T. M. M.; SILVA, P. A.; BARBOSA, G. V.; HOFFMANN, H. P.; CHAPOLA, R. G.; JÚNIOR, A. R. F.; GAZAFFI, R. **Melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Embrapa, 2015. Disponível em:https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142119/1/Doc-200.pdf. Acesso em: 23 jul. 2024.

MOREIRA, A. S.; NOGUEIRA JUNIOR, A. F.; GONÇALVES, C. R. N. B.; SOUZA, N. A.; BERGAMIN FILHO, A. Pathogenic and molecular comparison of *Puccinia kuehnii* isolates and reactions of sugarcane varieties to orange rust. **Plant Pathology**. v. 67, n. 8, p. 1687-1696, 2018. Doi: 10.1111/ppa.12870

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. de S.; SEGATO, V. MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. *In:* SEGATO, S. V.; PINTO, A. de S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização Em Produção de Cana-de-açúcar**. 1ª Edição ed. Livroceres, p. 11-18, 2008.

NOVA CANA. **Usinas de açúcar e álcool no estado: Goiás**. Nova Cana, 2024. Disponível em: https://www.novacana.com/usinas_brasil/estados/goias. Acesso em: 24 jul. 2024.

OLIVEIRA, I. C. S. de & MENDES, M. A. S. *Puccinia kuehnii*, um risco para cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA - Comunicado Técnico, 184)

PLACHECKA, A. Microscopical observations of *Sphaerellopsis filum*, a parasite of *Puccinia recondita*. **Acta Agrobotanica**. Warsaw Agricultural University, Department of Plant Pathology, V. 58, n. 1, p: 67-71, 2005.

PERERA, M. F.; BERTANI, R. P.; ARIAS, M. E. HECHAVARRÍA, M. de la L. L. O.; NAVARRO, M. de los Á. Z.; DEBES, M. A.; LUQUE, A. C.; CUENYA, M. I.; ROJAS, R. A.; CASTAGNARO, A. P. Morphological and molecular characterization of *Puccinia kuehnii*, the causal agent of sugarcane orange rust, in Cuba. **Scientia agricola.** v. 77, n. 2, 2020.

POSADA, D. & CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

TESTA, B.; VISTOLI, G.; PEDRETTI, A.; BOJARSKI, A. Atomic diversity, molecular diversity, and chemical diversity: the concept of chemodiversity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1145 - 1151, 2009.

TOKESHI, H. Doenças da Cana de Açúcar. *In*: GALLI, F.; CARVALHO, P. de C. T. de; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KRÜGNER, T.; CARDOSO, E. J. B. N.; FILHO, A. B. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda.. v. 2, p. 141-144, 1980.

THUROW, L. B.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. da S. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. *In*: DALLAGNOL, L. J. **Resistência genética de plantas à patógenos**. Ed. UFPel, p. 71-75, 2018.

TRAKUNYINGCHAROEN, T.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J, Z.; ANUN, R. C.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Mycoparasitic species of *Sphaerellopsis*, and allied lichenicolous and other genera. **IMA FUNGUS**, v.5, n.2, p.391-414, 2014.

SAITOU, N & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAUMTALLY, A. S.; VIREMOUNEIX, T. R.; GIRARD, J-C. R.; CASTLEBURY, L. A.; DIXON, L.; GLYNN, N. C.; COMSTOCK, J. C. First report of orange rust of

sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Ivory Coast and Cameroon, **Plant Disease**, v.95, n.3, p.357, 2011.

SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.74, n.12, p. 5463-5467, 1977.

SANJEL, S.; HINCAPIE, M.; WANG, Y.; TODD, J.; CHAULAGAIN, B.; SOOD, S.; COMSTOKC, J. C.; RAID, R. N. ROTT, P. Occurrence of two races of *Puccinia kuehnii* causing orange rust of sugarcane in Florida. **Plant Pathology**. v.70, p.1616-1625, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1111/ppa.13405. Acesso em: 30 out. 2022.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. *In:* SEGATO, S. V.; PINTO, A. de S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. de. **Atualização Em Produção de Cana-de-açúcar**. 1ª Edição ed. [s.l.] Livroceres, p. 19-36, 2008.

SILVA, M. S. C. da. Análise do Mercado de Trabalho do Setor Sucroenergético do Brasil. **Boletim Economia Empírica**, v. 2, n. 10, 2021. Disponível em: https://www.portaldeperiodicos.idp.edu.br/bee/article/view/6150. Acesso em: 29 set. 2022.

SILVA, R. C.; LIMA, A.; SOUZA, L. C. S. Principais métodos de sequenciamento de DNA. **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 10, 2022. Disponível em: https://sea.ufr.edu.br/index.php/SEA/article/view/1603. Acesso em: 6 jun. 2024.

SIMON, E. D. T.; VERÍSSIMO, M. A. A.; HÄRTER, A.; UENO, B. Doenças da Cana-de-açúcar. In: SILVA, S. D. dos A. e: MONTEIRO, C. R. S.; SANTOS, R. C. dos; NAVA, D. E.; GOMES, C. B.; ALMEIDA, I. R. de. **Sistema de produção de cana-de-açúcar para o Rio Grande do Sul**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 104-111. 2016. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream. Acesso em: 13 set. 2022.

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

SOUZA, B. F.; TREVISAN, D. P.; MOSCHINI, L. E. Aspectos gerais da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Iniciação Científica (RBIC),** Itapetininga, v.5, n.5, p.32-47, out./dez., 2018.

SUMIDA, C. H.; FANTIN, L. H. GONÇALVES, R. M.; CANTERI, M. G.; ARAÚJO, K. L.; GIGLIOTI, A. A system to map the risk of infection by *Puccinia kuehnii* in Brazil. **Acta Scientiarum.** Agronomy, v.41, 2019. Doi: 10.4025/actasciagron.v41i1.39905

SCHLIEP, K. P. "Phangorn: Phylogenetic Analysis in R." **Bioinformatics**, v.27, n.4, p.592-593. 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706. Acesso em: 13 abr. 2024.

SHENDURE, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHURCH, G. M.; GILBERT, W.; ROGERS, J.; SCHLOSS, J. A.; WATERSON, R. H. DNA sequencing at 40: past, present and future. **Nature**, v.550, p.345-353, 2017.

SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P. MARNEY & ABELL. Hyweljonesia. *In*: **Fungal Planet 490-21,** v. 37, p. 268-269, 2016.

RAMBAUT, A. 2009. FigTree 1.2.2. Disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

R Core Team (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Disponível em: https://www.R-project.org. Acesso em: 25 mar 2024.

RIDESA. REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **Programa de melhoramento da Ridesa**. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. Disponível em: https://www.ridesa.com.br/melhoramento. Acesso em: 26 jun. 2024.

RODRIGUES, G. S. de S. C.& ROSS, J. L. S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. Uberlândia - MG: Editora Universidade Federal de Uberlândia, p. 272. 2020.

RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D.L. AYRES, A.; DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, L. LIU, M.A. SUCHARD e J.P. HUELSENBECK. 2012. MRBAYES 3.2: Filogenética bayesiana eficiente inferência e seleção de modelos em um grande espaço de modelo. Syst. Biol. 61:539-542.

ROSSETTO, R. & SANTIAGO, A. D. **Doenças**. 2022. Disponível em: https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/producao/manejo/fitossanidade/doencas. Acesso em: 24 jul. 2024.

URASHIMA, A. S.; MISTURA, T. F.; PORTO, L. N. R. Como avaliar reação de variedades de cana-de-açúcar à *Puccinia kuehnii*? **Summa Phytopathologica**, Botucatu, SP. v.45, n.4, p.387-392, 2019.

URASHIMA, A. S.; MISTURA, T. F.; PORTO, L. N. R.; AUSTIN, P. D.; ARIAS, R. S. Genetic diversity of *Puccinia kuehnii*, the causal agent of orange rust of sugarcane, from Brazil. **Journal of Phytopathology**, Araras, SP. v.168, Issue 10, p.581-590, 2020.

VILLARÉAL, L. M. M. A.; LANNOU, C.; VALLAVIEILLE-POPE, C. de; NEEMA, C. Genetic Variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Populations Sampled on a Local Scale during Natural Epidemics. **Planty Microbiology,** Paris, France. v.68, Issue 12, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6138-6145.2002. Acesso em: 30 set. 2022.

VERLI, Hugo. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo: SBBq, p. 282, 2014.

WATERHOUSE, A. M. Jalview version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, United Kingdom, v. 9, p. 1189-1191, 2009.

WILEY, E. O. & LIEBERMAN, B. S. **Phylogenetics: Theory and Practice of phylogenetic systematics**. 2 ed. New Jersey, 2011.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. & TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.): **PCR Protocols**: A Guide to Methods and Applications; Academic Press Inc., New York. p.315-322. 1990.

ZENERATTO, M. A. **Ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar:** viabilidade técnica e econômica do controle químico, e curvas de progresso da doença sob condições naturais de cultivo. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017. Disponível em: zeneratto_ma_me_jabo.pdf (unesp.br). Acesso em: 23 out. 2022.

ZUZA, J. L. M. F. & BORSATO, J. M. S. L. Análise de perdas agrícolas e econômicas ocasionada pela doença ferrugem alaranjada em canaviais comerciais de uma empresa de bioenergia no interior de São Paulo. **Anais do Congresso Brasileiro de Custos – ABC**, 2013. Disponível em: https://anaiscbc.emnuvens.com.br/anais/article/view/148. Acesso em: 11 out. 2022.

APÊNDICE A

Apêndice–Códigos de acesso no GenBank e siglas correspondentes das sequências dos fungos utilizadas neste estudo

Código de acesso (GenBank)	Descrição da Sequência	Sigla utilizado no estudo	Referência
KY173476	Sequência ITS de *H. queenslandica* da Austrália	AusHq-101	Crous & Groenewald, 2020
NR_154095	Sequência ITS de *H. queenslandica* da Austrália	AusHq-102	
MK387927	Sequência ITS de *S. paraphysata* da China	ChiKUMCC	Karunaratha et al., 2019
ON878080	Sequência ITS de *S. paraphysata* da Taiwan	TaiNCYUCC	Silva & Lumyong, 2022
ON406279	Sequência ITS de *S. paraphysata* da Índia	Índia Sp	Selvakumar et al., 2022
NR_137956	Sequência ITS de *S. paraphysata* do Brasil	BraSBIBC	Trakunyingcharoen et al., 2018
KP170662	Sequência ITS de *S. paraphysata* do Brasil	BraCPC	
KP170661	Sequência ITS de *S. paraphysata* da África do Sul	AfrCPC	
MH107918	Sequência ITS de *S. paraphysata* da Australia	AusCBS	Crous et al., 2018
MK863554	Sequência completa ITS de *S. paraphysata* da Índia	IndiaSp-201	Ashmitha et al., 2019
MF948614	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Cuba	Cub227	Oloriz et al., 2017
KT261382	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Argentina	Arg-Misiones	Bertani et al., 2016
PP516644	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Gabon	GAB43	Dijoux et al., 2024
PP516642	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Gabon	GAB41	
PP516638	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Gabon	GAB21	
MK302478	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Mauritius	Mau201	Joomun 2019
MG008686	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Guyana	Guy201	Briggs, 2017
MK578657	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Reunion	Reu201	Hubert 2019
FJ708571	Sequência completa ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusQ177Mac	Braithwaite, 2009
FJ708570	Sequência completa ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusRB72Bal	
FJ708569	Sequência completa ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusQ155Fai	
FJ708568	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusQ78Tul	
FJ708567	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusQ124Tul	
FJ708566	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusQ124Mac	
FJ708562	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Austrália	AusDalyR	
FJ708561	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Indonésia	Ind338	
FJ708560	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Indonésia	Ind-Lam	
FJ708564	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Austrália	AusQ124Bur	
FJ708559	Sequência ITS de *P. kuehnii* da China	Chi2009	
FJ708555	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Indonésia	Ind322	
FJ708554	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Indonésia	Ind355	
FJ708553	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Indonésia	Ind337	

Código de acesso (GenBank)	Descrição da Sequência	Sigla utilizado no estudo	Referência
FJ708550	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Indonésia	Ind346	Braithwaite, 2009
FJ708547	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Austrália	Aus1955	
FJ708549	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Papua New Guinea	PNG75	
FJ708557	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Papua New Guinea	PNG143	
FJ708552	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Indonésia	Ind345	
FJ708548	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Samoa	SM1961	
FJ708551	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Indonésia	Ind312	
FJ708558	Sequência ITS de *P. kuehnii* de Papua New Guinea	PNG214	
AJ406049	Sequência ITS de *P. kuehnii* de USA: Hawaii	USA-HW	Virtudazo, 2000
GU564419	Sequência ITS de *P. kuehnii* da Austrália	AusQ124MD	Glynn, 2010
FJ009327	Sequência ITS de *P. melanocephala*	Pmelanoce_1	Braithwaite al., 2009
GU564423	Sequência ITS de *P. melanocephala*	Pmelanoce_2	Glynn et al., 2010
DQ093683	Sequência ITS de *Leptosphaeria* sp.	Leptos_1	Menkis et al., 2014
GU934536	Sequência ITS de *Leptosphaeria* sp.	Leptos_2	Corredor et al., 2011
NR_137553	Sequência ITS de *Teratosphaeria fimbriata*	Teratos_1	Crous et al., 2021
MN162040	Sequência ITS de *Teratosphaeria cryptica*	Teratos_2	Crous et al., 2019