

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Caracterização molecular e patogenicidade de *Thielaviopsis ethacetica*, agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, no estado de São Paulo

Claudio Dias da Silva Júnior

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2023

Claudio Dias da Silva Júnior
Engenheiro Agrônomo

Caracterização molecular e patogenicidade de isolados de *Thielaviopsis ethacetica*,
agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar no estado de São Paulo

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Silva Júnior, Claudio Dias da

Caracterização molecular e patogenicidade de isolados do fungo *Thielaviopsis* sp. agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar no estado de São Paulo / Claudio Dias da Silva Júnior. - - Piracicaba, 2023. 46 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Análise filogenética 2. *Thielaviopsis ethacetica* 3. Cana-de-açúcar 4. Podridão abacaxi I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que me apoiou a cada momento de dificuldade. Meu avô, que durante sua juventude trabalhou em exaustivos turnos em usinas de cana-de-açúcar e sempre me mostrou o valor do trabalho duro e do respeito. A todos os amigos próximos que considero parte da família, cujo carinho e apoio me sustentaram em momentos difíceis. A minha esposa, que esteve ao meu lado durante todos os altos e baixos que a vida da pós-graduação trás, sempre me motivando a seguir em frente e me inspirando com sua dedicação e inspiração. A minha mãe, que sempre lutou arduamente para que eu tivesse boas oportunidades, para me educar e formar como pessoa, sendo mãe e pai, ela me ensinou a perseguir meus sonhos sem perder quem eu sou, me ensinou a nunca desistir e o valor do esforço, sem ela, eu jamais chegaria tão longe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos sagrados Orixás e guias por me auxiliarem a trilhar o meu caminho ao longo deste projeto.

Agradeço a minha mãe Teresinha, meu pai Claudio (in memoriam), meu avô Niquinho e minha esposa Gabriela pelo carinho, pela inspiração, pelos ensinamentos e pelo suporte. Sem este apoio, nada disso seria possível.

Agradeço a minha família pelo suporte.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Nelson S. Massola Jr. pelo suporte, os ensinamentos, a paciência, e principalmente a amizade e o companheirismo que tornaram este projeto e o trabalho leve e fluido.

Agradeço a RIDESA/UFSCAR, em especial ao Dr. Roberto G. Chapola, pelo suporte a pesquisa e fornecimento de rebolos e colmos de cana-de-açúcar.

Agradeço a Dra. Raissa D. Moura pelo apoio e todos os ensinamentos que tornaram toda a parte molecular deste trabalho possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Maruzanete Pereira de Melo por todo o suporte fornecido ao longo do trabalho, assim como o compartilhamento de isolados.

Agradeço a todos os membros do laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP pelo companheirismo, suporte, bons momentos e apoio. Em especial, a Dra. Thais Boufleur e ao Me. Tulio Verissimo Martins pelas risadas, bons momentos, companheirismo e ensinamentos, e as alunas Isabela, Priscilla e Leticia por toda a ajuda durante o projeto.

Agradeço a CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado, sem a qual não seria possível a realização do presente trabalho.

Agradeço ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, todos os professores, funcionários e alunos, nos quais encontrei ensinamentos, amizades, companheirismo e ótimos momentos que ficaram marcados por uma vida.

EPÍGRAFE

“Somehow I know

The things are gonna change

New boundaries on the way

Like never before

Find a meaning to your life

Healing whispers of the angels

Bring the sunrise again”

Angra

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. A cultura da cana.....	11
2.2. O patógeno da podridão abacaxi.....	12
2.3. Análise filogenética.....	13
2.4. Podridão abacaxi da cana-de-açúcar	14
2.5. Manejo da podridão abacaxi	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção dos isolados.....	17
3.2. Cultivares de cana utilizadas.....	17
3.3. Testes de agressividade dos isolados	17
3.4. Caracterização da resposta de diferentes cultivares	19
3.5. Caracterização e filogenia dos isolados	20
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Isolamentos	23
4.2. Agressividade dos isolados	24
4.3. Resposta diferencial de cultivares comerciais do estado de São Paulo ao ataque de <i>T. ethacetica</i>	28
4.4. Caracterização e filogenia dos isolados	31
5. DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

Caracterização molecular e patogenicidade de isolados de *Thielaviopsis ethacetica*, agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar no estado de São Paulo

O complexo *Ceratocystis* compreende um grande grupo de fungos fitopatogênicos causadores de doenças em ampla gama de hospedeiros. Na cana-de-açúcar, *Ceratocystis paradoxa* (teleomorfo de *Thielaviopsis paradoxa*) é conhecido como o agente causal da podridão abacaxi da cana-de-açúcar, doença de grande impacto quando os rebolos são plantados em épocas mais frias. Este patógeno causa falhas de estande, uma vez que impede a germinação das gemas. Apesar do potencial impacto que pode ocorrer nos canaviais, os danos não são bem compreendidos. Outra importante questão é o fato de que *Ceratocystis paradoxa* compreende um complexo de espécies, podendo não ser a real espécie do agente causal da doença no Brasil. Indícios apontam para a espécie *Thielaviopsis ethacetica* associada a rebolos atacados no Brasil. Com a intenção de solucionar esta questão, foram sequenciadas as regiões ITS, β -tubulina e TEF-1 α a partir de isolados provenientes de rebolos atacados em diferentes canaviais no estado de São Paulo. A fim de entender a variabilidade patogênica do fungo, foram realizados testes de agressividade com diferentes isolados na variedade RB92579 de cana. O comportamento do hospedeiro também foi estudado, mediante inoculação de um isolado agressivo em diferentes cultivares de cana-de-açúcar utilizadas no estado. Para estes ensaios, adotaram-se como variáveis de avaliação a extensão das lesões internas nos rebolos, a massa seca da parte aérea das plântulas, a velocidade de emergência e o estande final das unidades amostrais. Por meio de análise filogenética, comprovou-se que a espécie associada a doença no estado de São Paulo é *Thielaviopsis ethacetica*, sendo todos os 19 isolados obtidos no experimento pertencentes a esta espécie. Todos os isolados foram patogênicos a cana-de-açúcar, não sendo observadas diferenças de agressividade entre os isolados. Dentre as cultivares, observou-se algum grau de resistência, de acordo com as variáveis avaliadas. Nos experimentos em casa de vegetação, as cultivares RB005014, RB015177, RB975033, RB975201, RB015935 e RB975375 apresentaram algum grau de resistência. As cultivares RB005014 e RB015177 destacaram-se de forma consistente, apresentando menor impacto da doença na massa seca das plântulas, estande final e índice de velocidade de emergência. Nos experimentos em condições controladas, destacaram-se as cultivares RB975033 e RB975201 com menores lesões internamente nos rebolos inoculados. No primeiro ensaio, a cultivar RB015177 foi posicionada em um grupo intermediário quanto ao tamanho da lesão, enquanto no segundo ensaio, a cultivar RB005014 foi agrupada com as cultivares de menor lesão. Os resultados indicaram a existência de duas diferentes respostas de resistência do hospedeiro ao patógeno, uma de rápida brotação e outra de restrição na colonização dos tecidos.

Palavras-chave: Análise filogenética, *Thielaviopsis ethacetica*, Cana-de-açúcar, Podridão abacaxi

ABSTRACT

Molecular characterization and pathogenicity of *Thielaviopsis* sp. causal agent of sugarcane pineapple rot in the state of São Paulo

The *Ceratocystis* complex comprises a large group of phytopathogenic fungi that cause disease in a wide range of hosts. In sugarcane, *Ceratocystis paradoxa* (teleomorph of *Thielaviopsis paradoxa*) is known as the causal agent of sugarcane pineapple rot, a disease that has a great impact when the sugarcane is planted in colder seasons. This pathogen causes stand failures as it prevents bud germination. Despite the potential impact that can occur on sugarcane fields, the damage is not well understood. Another important issue is the fact that *Ceratocystis paradoxa* comprises a complex of species and may therefore not be the actual species of the causal agent of the disease in Brazil. Recent works suggest that the species *Thielaviopsis ethacetica* is associated with attacked sugarcane buds in Brazil. With the intention of solving this question, the ITS, β -tubulin and TEF-1 α regions were sequenced from isolates from attacked sugarcane buds in different fields in the state of São Paulo. In order to understand the pathogenic variability of the fungus, aggressiveness tests were performed with different isolates from the sugarcane variety RB92579. The host's behavior was also studied, through the inoculation of an aggressive isolate in different sugarcane cultivars used in the state. For these tests, the extension of internal lesions on the sugarcane buds, the dry mass of the aerial part of the seedlings, the speed of emergence and the final stand of the sample units were adopted as variables to be evaluated. Through phylogenetic analysis, it was confirmed that the species associated with the disease in the state of São Paulo is *Thielaviopsis ethacetica*, with all 19 isolates obtained in the experiment belonging to this species. All isolates were pathogenic to sugarcane, with no differences in aggressiveness being observed between isolates. Among the cultivars, some degree of resistance was observed, according to the evaluated variables. In greenhouse experiments, cultivars RB005014, RB015177, RB975033, RB975201, RB015935 and RB975375 showed some degree of resistance. Cultivars RB005014 and RB015177 stood out consistently, showing less impact on seedling dry mass, final stand and emergence speed index. In the experiments under controlled conditions, the cultivars RB975033 and RB975201 stood out with smaller lesions among the replications. In the first replication, the cultivar RB015177 was placed in an intermediate group regarding the size of the lesion, while in the second repetition, the cultivar RB005014 was grouped with the cultivars with the smallest lesion. These results indicate the existence of two different host responses to the pathogen, one of rapid budding and the other of difficult tissue colonization.

Keywords: Phylogenetic analysis, *Thielaviopsis ethacetica*, Sugarcane, Pineapple rot

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é de grande importância a nível mundial, uma vez que seus produtos são consumidos em larga escala pelos mais diferentes países. Além dos principais produtos da cultura que são açúcar, etanol e bioenergia, outros produtos como etanol 2G, biogás, biometano, plásticos verdes e cosméticos apresentam grande importância (UNICA, 2021). Os maiores produtores de cana-de-açúcar são Brasil, Índia e China, com produções aproximadas de respectivamente 598 mi ton., 413 mi ton. e 285 mi ton. (CONAB, 2022; NOCELLI et al., 2017). Por ocupar a posição de maior produtor, o Brasil apresenta ganhos extremamente consideráveis com produtos como açúcar e álcool. No ano de 2020, as exportações de açúcar geraram 8,74 bilhões de dólares para o país, sendo os principais consumidores Argélia, Bangladesh, China e Índia. Já para o álcool, no mesmo ano foram gerados 1,19 bilhões de dólares com a exportação, sendo os principais consumidores Estados Unidos e Coreia do Sul (UNICA, 2021).

A cana-de-açúcar, assim como outras culturas agrícolas, está sujeita a estresses bióticos e abióticos que podem afetar sua produtividade. Dentre os fatores bióticos, encontram-se doenças causadas pelos mais diversos patógenos, com 23 doenças registradas na cultura até o momento (TOKESHI; RAGO, 2016). A ocorrência de doenças está fortemente ligada às condições ambientais. O plantio de inverno (junho a setembro) da cana-de-açúcar vem se consolidando no cenário brasileiro (ROSSETO; SANTIAGO, 2008), expondo a cultura às baixas temperaturas e ao clima seco, o que atrasa a germinação dos rebolos deixando-os mais expostos ao ataque de patógenos de solo, como o caso de *Thielaviopsis* sp., fungo causador da podridão abacaxi da cana-de-açúcar (GHELLER, 1995).

A podridão abacaxi da cana-de-açúcar afeta principalmente a brotação, causando falhas de plantio que levam a um estande final desigual, sendo muitas vezes necessário o replantio (TOKESHI; RAGO, 2016). O patógeno, habitante natural do solo, sobrevive neste ambiente na forma de conídios ou como saprófito, sendo disseminado por meio da movimentação de solo ou material infectado (TOKESHI; RAGO, 2016). A infecção nos rebolos ocorre por ferimentos, principalmente pelos cortes realizados durante o plantio, causando a fermentação dos mesmos, e liberando um odor característico de abacaxi, resultante do acetato de etila produzido pelo patógeno durante seu crescimento (KUO et al., 1969), o que dá nome à doença. Estas substâncias voláteis induzem a formação de etileno no rebolo, inibindo a germinação da gema, o que somado à podridão, resulta no elevado dano que essa doença pode causar (BYTHER; MOORE, 1974).

Dentre as estratégias de manejo, destacam-se a escolha da época de plantio, visando condições que favoreçam a rápida brotação das gemas e a utilização de fungicidas no sulco de plantio, principalmente em épocas desfavoráveis à brotação (CHAPOLA et al., 2014). Uma alternativa ao controle químico seria a utilização de variedades de cana resistentes à doença em épocas desfavoráveis ao brotamento, porém, até o momento não existem variedades efetivamente resistentes à podridão abacaxi da cana-de-açúcar (CHANQUINIE, 2015). No entanto, respostas variadas ao patógeno já foram relatadas para diversas variedades de cana (YADAHALLI, 2006; BEGUM et al., 2008), informação essa que é essencial para embasar programas de melhoramento.

Estudos recentes da etiologia do agente causal da podridão abacaxi, que levaram em consideração a morfologia e a genética do fitopatógeno, demonstraram a possibilidade de que o agente causal da doença seja, na verdade, *Thielaviopsis ethacetica* e não *Thielaviopsis paradoxa* no Brasil (BORGES et al., 2019). Ambas as espécies são pertencentes ao complexo *Ceratocystis paradoxa* e apresentam grande similaridade morfológica e epidemiológica, sendo possível sua distinção através de um marcador morfológico que pode ser encontrado na fase assexuada (sinema) ou por meio de métodos moleculares (Mbnoum et al., 2014). Os estudos moleculares realizados por Borges et al. (2019)

adotaram as regiões ITS (Internal Trasccribed Spacer) e TEF-1 α (Elongation Factor 1- α). A região ITS é considerada de baixa resolução em estudos filogenéticos dentro do complexo *Ceratocystis paradoxa* (Mbnoum et al., 2014), além poder apresentar múltiplas formas em espécies do complexo *Ceratocystis* (AL ADAWI et al., 2013). A região TEF-1 α é considerada a região de maior resolução para a separação de espécies do complexo *C. paradoxa* (Mbnoum et al., 2014). Ainda assim, ambas são consideradas marcadores importantes para reconstrução filogenética em espécies dentro de Ceratocystidaceae (Mbnoum et al., 2014; Mbnoum et al., 2015). A compreensão de respostas diferenciais das variedades de cana-de-açúcar a doença, assim como uma correta compreensão do agente causal, pode levar a avanços importantes no manejo da doença, principalmente tendo-se o enfoque em melhoramento genético e medidas quarentenárias cabíveis a cada diferente espécie.

Uma vez que a cultura possui grande importância econômica, e o mundo, grande dependência de seus produtos, é importante gerar informações quanto a resposta de cultivares, assim como a confirmação da espécie que causa a podridão abacaxi em regiões específicas. O presente trabalho buscou obter isolados de *Thielaviopsis* de diferentes regiões do estado de São Paulo, com a finalidade de realizar a caracterização filogenética e patogênica detalhada do fungo nessa região, assim como entender a resposta das cultivares que são utilizadas, contribuindo com futuros programas que busquem melhorar a cultura com enfoque na resistência à podridão abacaxi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é considerada uma cultura de grande relevância para o setor agrícola brasileiro, sendo uma das três culturas mais cultivadas no país, contando com uma área plantada de 8.3 milhões de ha na safra 22/23, perdendo apenas para soja (38 mi ha) e milho 2ª safra (14 mi ha) (IBGE, 2021; CONAB, 2022). Sua relevância advém principalmente devido a gama de produtos de importância econômica gerados a partir da cultura. Dentre estes produtos destacam-se, como principais, o etanol e o açúcar, ambos de grande importância nacional e internacional, uma vez que a utilização destes como biocombustível e na alimentação humana, respectivamente, se consagram nos mais diversos países (UNICA, 2021). O Brasil é responsável por 45% do açúcar exportado no mundo, totalizando 30,63 milhões de toneladas em 2020 (UNICA, 2021). Com relação ao etanol, no ano de 2020 foram exportados 2,67 milhões de metros cúbicos (UNICA, 2021; NOCELLI et al., 2017). Além do açúcar e do álcool, subprodutos como vinhaça e a torta de filtro, reutilizados no campo para adubação, também são obtidos a partir desta cultura (de LUCENA et al., 2013), o melado e o bagaço são destinados à alimentação animal, sendo a queima do último capaz de gerar energia suficiente para suprir a usina, além de gerar excedentes energéticos que são vendidos (MATSUOKA et al., 2012). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma produção estimada de 598,345.4 mil toneladas (CONAB, 2022), seguido da Índia e da China, com produções estimadas de 413 mi e 285 mi respectivamente (NOCELLI et al., 2017).

A propagação da cana-de-açúcar é feita de forma vegetativa. O colmo é segmentado em porções de 3 a 4 gemas (rebolos) e plantado. O momento do plantio deve ser considerado com bastante critério, uma vez que condições ideais para o brotamento dos rebolos refletem em uma cultura vigorosa e bem estabelecida. Os principais fatores que influenciam a brotação do rebolo são a temperatura, a umidade, a aeração, o estado nutricional das mudas, a idade das mudas, o preparo do solo adequado e a profundidade de plantio (SERGATO et al., 2006). A cultura de clima tropical é favorecida pelas condições climáticas e ambientais brasileiras, garantindo grande parte do sucesso da produção, uma vez que o clima é o fator de maior influência na produtividade da cana-de-açúcar, sendo temperaturas elevadas, insolação e umidade adequada os fatores determinantes para um bom desenvolvimento da cultura (MARCHIORI, 2014).

A época de plantio na região Centro-Sul varia entre os meses de setembro a março. O plantio de ano, com um ciclo em média de 12 meses, é realizado entre os meses de setembro e dezembro. O plantio de ano e meio, com um ciclo em média de 18 meses, é realizado entre os meses de janeiro e maio (ROSSETO; SANTIAGO, 2008). Nesta época as condições climáticas de temperatura e umidade ideais são atingidas com facilidade para um bom brotamento dos rebolos. Temperaturas do solo abaixo de 21°C ou superiores a 35°C fazem com que a brotação do rebolo seja lenta ou nula (CLEMETS, 1940; MANHÃES et al., 2015). A umidade adequada varia em função do tipo de solo, sendo, de modo geral, aquela onde existe disponibilidade de água para a planta, mas sem que ocorra o encharcamento do solo, permitindo boa aeração do rebolo (MANHÃES et al., 2015).

Além das épocas de plantio correspondentes a cana de ano e ano e meio, o plantio de inverno também é uma possibilidade. Realizado entre os meses de junho e setembro, este tipo de plantio é possibilitado pela utilização de irrigação, fertirrigação com vinhaça ou aplicação da torta de filtro no sulco de plantio. A torta de filtro contém 70% a 80% de umidade, auxiliando na brotação dos rebolos (ROSSETO; SANTIAGO, 2008). Uma boa combinação de

preparo de solo e variedades adaptadas no cultivo de inverno garante uma rápida brotação do rebolo e bom perfilhamento e desenvolvimento das plantas (ARCOVERDE et al., 2019).

O plantio é uma das etapas de maior importância na cultura da cana-de-açúcar, uma vez que diferentemente de outras culturas, erros cometidos durante a instalação do canavial não poderão ser facilmente corrigidos, sendo necessário conviver com eles pelos próximos anos. O plantio pode ser realizado de forma manual ou mecanizado, sendo que o segundo modelo tem apresentado crescente importância, uma vez que torna o plantio mais rápido e livre da dependência de mão obra (PARDINHO, 2013). Apesar de muito vantajoso, o plantio mecanizado traz algumas desvantagens com relação a podridão abacaxi, como ferimentos que são causados aos rebolos tanto na colheita quanto no plantio mecanizado, assim como a possibilidade de plantio em épocas desfavoráveis para a cultura, uma vez que viabiliza o plantio ao longo de todo o ano (COOPERCITRUS, 2021).

2.2. O patógeno da podridão abacaxi

O fitopatógeno *Thielaviopsis* sp. é um fungo necrotrófico capaz de sobreviver no solo ou em restos de cultura infectados, causando infecções em mudas logo após o plantio (TOKESHI; RAGO, 2016). Outra característica importante deste patógeno é o comportamento polífago, que explica sua ocorrência a diversas regiões. O patógeno já foi relatado em espécies como abacaxi, cana-de-açúcar e palmeiras, como coqueiros, causando podridões (YU et al., 2012; HUBERT et al., 2014; ROBERTSON et al., 1962; BORGES et al., 2019).

A podridão abacaxi da cana-de-açúcar foi por muito tempo associada ao patógeno *Thielaviopsis paradoxa* (MOUTIA et al., 2001). Em trabalho recente, Borges et al. (2019) demonstraram através de testes filogenéticos, marcadores morfológicos e testes de patogenicidade, que o fungo fitopatogênico associado a esta doença é, na verdade, *T. ethacetica*. A confusão entre estes dois patógenos ocorreu por muito tempo em função de identificação baseada na morfologia. Mesmo com a existência de marcadores morfológicos, a idade da colônia e aspectos relacionados ao ambiente, como o substrato para cultivo do fungo, podem induzir a uma identificação errônea. Na fase teleomórfica, *Ceratocystis paradoxa* e *Ceratocystis ethacetica* possuem muitas semelhanças. Os peritécios de ambas as espécies possuem morfologia similar, apresentando inclusive hifas de ornamentação digitada em sua base. Já na fase anamórfica, destacam-se alguns marcadores que podem ser utilizados na diferenciação das espécies, sendo o de maior importância a presença de sinema, estrutura formada a partir do crescimento conjunto e alongado de conidióforos. O sinema está presente em *T. paradoxa*, mas ausente em *T. ethacetica*, que apresenta conidióforos solitários, além de existirem diferenças em forma e tamanho nos conídios primários e secundários.

Thielaviopsis ethacetica (anamorfo de *Ceratocystis ethacetica* (Went)) (MBENOUN et al., 2014) é um habitante natural do solo que causa podridões em diversas culturas (TOKESHI; RAGO, 2016). O fungo pertence ao filo Ascomycota, ordem Microascales. Segundo a descrição morfológica da espécie feita por Mbenoun et al. (2014), em sua fase sexuada, o fungo produz um ascocarpo do tipo peritécio, com a base globosa e ornamentações digitadas como apêndices, um rostro alongado, de coloração preto a cinza e ereto, possuindo ao redor do ostíolo hifas divergentes. Os ascósporos são hialinos, asseptados e elipsoidais. Na fase assexuada, o fungo é do tipo fialídico, com conidióforos solitários. Nesta fase o fungo produz três tipos de conídios diferentes, sendo destes, dois de origem enteroblástica fialídica e um de origem holoblástica. Os conídios produzidos em fialídes são denominados primários e secundários. Os conídios primários são hialinos, asseptados e cilíndricos. Os conídios secundários são asseptados, de coloração inicialmente hialina, tornando-se acinzentados, possuem parede grossa e forma cilíndrica oblonga. O terceiro tipo de esporo assexuado produzido são os aleuroconídios, esporo com função de sobrevivência, muito semelhante a

clamidósporos. Estes esporos são produzidos de forma holoblástica, solitários ou em cadeias de 2-10 unidades, de coloração acinzentada, parede espessa, formato subgloboso, oblongo ou ovoide. A temperatura ótima para o desenvolvimento do fitopatógeno encontra-se ao redor de 30°C, sendo que seu crescimento é reduzido próximo a 35°C e nulo a 10°C (BORGES et al., 2019; MBENOUN et al., 2014).

A identificação molecular de *T. ethacetica* pode ser realizada através do sequenciamento multilocus. As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e TEF-1 α (Elongation Factor 1- α) foram adotadas em alguns casos (BORGES et al., 2019), porém, por mais que a região ITS seja amplamente utilizada em estudos filogenéticos de fungos (SCHOCH et al., 2012), apresenta baixa resolução o para o gênero *Thielaviopsis* (MBENOUN et al., 2014). Descobertas recentes demonstraram que existem múltiplas formas da região ITS em certas espécies do gênero (AL ADAWI et al., 2013), o que pode levar a uma identificação errônea da espécie com base na região ITS. Para solucionar este problema, outras regiões podem ser adotadas com sucesso. De Beer et al. (2014) demonstrou a eficácia das regiões MCM7 (Mini-Chromosome Maintenance complex component 7), 60S (60S ribossomal protein RPL10) e LSU (nuclear ribossomal DNA large unit) para separar diferentes espécies e linhagens dentro do complexo *Ceratocystis paradoxa*. Mbenoun et al. (2014) demonstrou que para a linhagem *Thielaviopsis*, contendo as espécies *C. cerberus*, *C. radiciicola*, *C. ethacetica*, *C. musarum*, *C. euricoi* e *C. paradoxa*, as regiões TEF-1 α , β -tubulina e ITS são suficientemente acuradas para distinção a nível de espécie, sendo esta última, a região que acrescenta menor resolução a análise. A partir destas informações, pode-se realizar uma busca mais detalhada para entender qual seria a real espécie associada a doença em cana de açúcar no Brasil.

2.3. Análise filogenética

A análise filogenética é um estudo de relações evolutivas e permite inferir ou estimar este tipo de relação entre diferentes organismos (BRINKMAN; LEIPE, 2001). Esta técnica possui os mais variados usos na biologia e atua em diferentes níveis, como genes, genomas, indivíduos, populações e espécies, permitindo que dentro destes, encontrem-se relações entre diferentes organismos, ou a não existência de relações entre eles (HEATH et al., 2008). Para o estudo de fungos fitopatogênicos a filogenia mostra-se como uma ferramenta de grande importância, pertencendo ao leque de técnicas moleculares que facilitam a correta identificação destes organismos. A caracterização de espécies de fungos através da morfologia apresenta muitos desafios como a falta de características morfológicas discriminatórias, a incapacidade de cultivo de algumas espécies, a variação de estruturas produzidas com base em hospedeiro e ambiente e a dificuldade de obtenção de corpos de frutificação (HYDE et al., 2014). Estes desafios levam, muitas vezes, a classificações errôneas que causam confusões entre diferentes espécies, como é o caso do gênero *Ceratocystis*.

O gênero *Ceratocystis* foi estabelecido em 1890 para acomodar o agente causal de podridão negra em batata doce, *Ceratocystis fimbriata* (HALSTED, 1890). Entre 1934 e 1952 diversos estudos (MELIN; NANNFELDT, 1934; BAKSHI, 1951; MOREAU, 1952) adicionaram a espécie tipo do gênero (*C. fimbriata*) dentro do gênero *Ophiostoma*, que havia sido descrito em 1919 (SYDOW; SYDOW, 1919), baseando-se em características morfológicas do corpo de frutificação, dando início a grande confusão e controvérsia que pairou pelo gênero por anos. Entre 1993 e 1994, com o advento do sequenciamento de DNA e de estudos filogenéticos, os dois gêneros, *Ceratocystis* e *Ophiostoma* foram finalmente separados (HAUSNER et al., 1993a, b; SPATAFORA; BLACKWELL, 1994). Mesmo após a separação dos gêneros, a história que envolve o estudo da complexidade de *Ceratocystis* continuou a ser desenvolvida. Nos anos seguintes à separação clara dos gêneros, trabalhos demonstraram a grande variabilidade morfológica e ecológica dentro

de *Ceratocystis*, o que agregado às comparações de sequências de DNA, levou a descoberta de novas espécies (WINGFIELD et al., 1996; WITTHUHN et al., 1998; HARRINGTON; WINGFIELD, 1998).

Em 2013 a primeira reconsideração do gênero *Ceratocystis* baseada em filogenia foi publicada (WINGFIELD et al., 2013) evidenciando a existência de cinco diferentes grupos taxonômicos, sendo eles os complexos *C. fimbriata*, *C. moniliformis*, *C. coeruleascens*, *Ambrosiella* e *Thielaviopsis*, sendo os dois últimos formados apenas por fases assexuadas. Posteriormente De Beer et al. (2014) aprofundou os estudos filogenéticos dentro do gênero com regiões de maior resolução, identificando sete grupos taxonômicos, sendo eles *Ambrosiella*, *Ceratocystis sensu strictu*, *Chalaropsis*, *Endoconidiophora*, *Thielaviopsis*, *Davidsoniella* e *Huntiella*, sendo estes últimos, dois novos com relação ao descrito anteriormente, e os cinco primeiros, acomodando os já descritos. Estes sete grupos taxonômicos foram então caracterizados como gêneros, uma vez que as espécies pertencentes a estes não apenas são agrupadas filogeneticamente como também compartilham características morfológicas e ecológicas.

Mbnoom et al. (2014) realizou um estudo aprofundado em um dos gêneros de De Beer et al. (2014), *Thielaviopsis*, denominando-o como complexo *Ceratocystis paradoxa*. Neste estudo, foi demonstrado que apesar das quatro espécies agrupadas neste grupo taxonômico por Wingfield et al. (2013), mais espécies faziam parte dele, sendo o complexo composto por *Ceratocystis paradoxa*, *Ceratocystis ethacetica*, *Ceratocystis euricoi*, *Ceratocystis musarum*, *Ceratocystis radiciicola*, *Ceratocystis cerberus*. Para este complexo, as regiões utilizadas para separação das espécies foram ITS, TEF-1 α e β -tubulina, sendo que a segunda se mostrou com a melhor resolução e a primeira, com a menor resolução para separar as espécies.

2.4. Podridão abacaxi da cana-de-açúcar

A podridão abacaxi é uma doença estreitamente relacionada à época de plantio e às condições climáticas, como condições do solo, temperatura e velocidade da germinação dos rebolos, que irão definir o dano potencial da doença (TOKESHI; RAGO, 2016). Em épocas frias e secas, quando os rebolos apresentam germinação mais lenta em função das condições, o patógeno acaba causando maiores danos, uma vez que a gema fica por mais tempo exposta aos voláteis produzidos por ele. A mesma lógica pode ser aplicada às cultivares de germinação mais lenta, que também apresentarão maior tempo de exposição. Chapola et al. (2014) relata redução de 44-48% na brotação de rebolos em substrato contaminado, assim como redução na massa fresca da parte aérea e das raízes de respectivamente 67% e 66%.

Thielaviopsis sp. penetra nos rebolos através de ferimentos ou cortes, sendo incapaz de penetrar diretamente ou por aberturas naturais, característica que se torna particularmente importante no caso da cana-de-açúcar, uma vez que os rebolos plantados são cortados para evitar a dominância apical entre as gemas (TOKESHI; RAGO, 2016). Nos rebolos atacados pelo patógeno, observa-se um encharcamento nas extremidades do tecido, que se aprofunda rapidamente, cruzando o nó sem dificuldades. O tecido então adquire coloração avermelhada em função da produção de substâncias de defesa pela planta. Conforme a colonização dos tecidos avança, a coloração se altera para cinza, até que finalmente se torne negra, quando sobra então, apenas a casca do rebolo e os feixes fibrovasculares internos, expostos e recobertos por uma camada de esporos. A germinação dos rebolos pode ocorrer, dando origem a raízes e plantas formadas frágeis, com capacidade reduzida de desenvolvimento, uma vez que sua capacidade competitiva é inferior. No campo são observadas falhas de plantio, plantas subdesenvolvidas e o odor característico produzido pela fermentação dos rebolos pelo patógeno (TOKESHI; RAGO, 2016).

Durante o processo de crescimento do patógeno no rebolo, são produzidas substâncias voláteis que inibem o desenvolvimento da gema. A principal substância produzida é o acetato de etila, que se propaga por toda extensão do rebolo e inibe a germinação das gemas através de ação hormonal. Mesmo gemas distantes do ponto de ataque ficam com seu crescimento inibido, demonstrando que o patógeno atua até mesmo em locais onde seu micélio ainda não se desenvolveu (BRANDI, 2015). Em baixas concentrações (1%), o acetato de etila já é capaz de inibir a germinação das gemas, ou até levar a morte. Em temperaturas mais baixas, ao redor de 20°C, o acetato de etila é produzido em maiores quantidades, fator que contribui para um maior dano potencial em plantios realizados em épocas mais frias (KUO et al., 1969). Somando-se ao efeito de inibição da germinação, o patógeno ainda causa inibição do enraizamento do rebolo, uma vez que tanto o ataque em si do patógeno quanto os voláteis produzidos pelo mesmo, induzem elevada produção de etileno na planta (BYTHER; MOORE, 1974).

2.5. Manejo da podridão abacaxi

O controle da podridão abacaxi é realizado com base em estratégias culturais, genéticas e químicas. Inicialmente, devem ser empregadas medidas culturais que favoreçam a rápida brotação dos rebolos, como por exemplo, o tamanho do rebolo, a profundidade de plantio, umidade do solo, temperatura, variedade de cana e reserva energética (TOKESHI; RAGO, 2016).

Dentre as medidas culturais destacam-se, o plantio em épocas adequadas, quando a temperatura do solo é superior a 18°C, a realização de preparo adequado do solo, escolha da profundidade adequada de colocação do rebolo, a utilização de mudas jovens, com pelo menos três gemas e variedades de rápida brotação. Quanto mais rápido a gema brota, menos tempo fica exposta aos voláteis produzidos pelo patógeno, assim como, quanto mais gemas no rebolo, mais protegidas ficam as gemas centrais (RAID, 2012). Recomenda-se a preferência por gemas jovens, como as provenientes do ápice do colmo, em situações de áreas muito infestadas, uma vez que essas germinam mais rapidamente quando comparadas àquelas localizadas na porção mais basal do colmo (BRANDI, 2015).

Até o momento, não existem variedades de cana-de-açúcar resistentes a doença (CHANQUINIE, 2015). As variedades ditas resistentes, são aquelas capazes de germinar mais rapidamente, reduzindo seu tempo de exposição ao patógeno, por tanto, são as priorizadas para utilização em áreas na qual o patógeno esteja presente. Trabalhos como os de Yadahalli (2006) e Begum et al (2008) demonstraram a existência de reposta diferencial de produção de diferentes cultivares de cana à *C. paradoxa*, porém, não encontraram resistência ao mesmo. O controle genético é uma estratégia de manejo de grande importância, uma vez que reduz custos de aplicação de produtos químicos, danos ao meio ambiente ou mesmo custos associados a outras estratégias de manejo (CAMARGO, 2018). O comportamento diferencial já observado, pode servir, em um primeiro momento, como base para programas de melhoramento. Devido à alta eficiência do controle químico, e do fato da doença estar associada a épocas específicas, outras abordagens têm sido adotadas. Com a grande importância da cultura da cana-de-açúcar e a crescente utilização de mecanização, além da realização de plantios ao longo de todo o ano, a doença apresenta grande potencial de ameaça a cultura, justificando investimentos em programas de melhoramento no sentido de variedades de rápida emergência em condições adversas.

O controle químico da podridão abacaxi é realizado através do tratamento de rebolos ou da aplicação de fungicidas no sulco de plantio (CHAPOLA et al., 2014). Atualmente, existem 16 produtos registrados para o controle da doença, sendo pertencentes aos grupos químicos fluazinam, tiofanato-metílico, ciproconazol, picoxistrobina e oxicloreto de cobre (AGROFIT, 2021).

Além das estratégias mais comuns, o controle biológico vem sendo estudado como possibilidade para controle da podridão abacaxi. Existem exemplos de sucesso com controle *in vitro* do patógeno com formulações comerciais de *Bacillus subtilis* (Serenade) e *Bacillus pumilus* (Sonata) (BRANDI, 2015) e *Trichoderma* spp. (SÁNCHEZ et al., 2007), sendo que o segundo demonstrou parasitismo dos aleuroconídios e produção de metabólitos tóxicos em meio de cultura. O controle em campo por antagonismo também já foi relatado de duas formas diferentes. Produtos que favorecem rápida brotação da gema, permitindo fuga do patógeno e seus voláteis (ESPÍNDOLA et al., 2017; BRANDI, 2015) e até mesmo por antagonismo direto, como relatado no trabalho de TALUKDER et al. (2007) utilizando o fungo *Trichoderma harzanium*, demonstrando efeitos positivos de controle *in vitro* e *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos isolados

Os isolados de *Thielaviopsis* spp. utilizados nos experimentos foram obtidos de três fontes diferentes, sendo elas a coleção do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), a coleção do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ – USP e através de isolamento direto e indireto de material infectado coletado em diferentes regiões produtoras do estado de São Paulo.

Para o isolamento indireto, seguindo o protocolo de Alfenas et al. (2016), os rebolos infectados recebidos passaram por assepsia superficial em duas etapas, sendo a primeira, lavagem com água e sabão, e a segunda, imersão em álcool seguida de flambagem, a fim de eliminar possíveis contaminantes na parte mais interna do tecido. Após a assepsia, o rebolo foi seccionado longitudinalmente e com o auxílio de um bisturi, a parte superficial do tecido lesionado foi removida, expondo a parte interna da lesão. Da parte interna, foram retirados fragmentos da região limítrofe entre o tecido lesionado e sadio, onde o patógeno apresenta crescimento ativo. Estes fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). O crescimento do patógeno foi acompanhado diariamente todo crescimento micelial obtido foi rapidamente repicado a fim de evitar contaminantes. Com o rápido crescimento do patógeno, e possível evitar facilmente bactérias e outros fungos de crescimento lento.

Os isolados recebidos das coleções e obtidos do isolamento, foram submetidos a cultivo monospórico, que consiste na obtenção de uma colônia advinda de um único esporo (VEEN, 1967). Após a obtenção das colônias monospóricas, todos os isolados foram preservados em papel filtro e armazenados em ultrafreezer a -80°C.

3.2. Cultivares de cana utilizadas

Os rebolos de cana-de-açúcar de 1 e 5 gemas utilizados nos experimentos foram fornecidos pela RIDESA/UFSCar. A cultivar RB92579, de velocidade lenta de crescimento, foi utilizada nos experimentos para avaliar a agressividade dos diferentes isolados. Nos experimentos para avaliar o comportamento de diferentes genótipos de cana, foram utilizadas as cultivares com velocidade de crescimento considerado médio RB975242, RB975952, RB005014, RB985476, RB975375 e RB015177, de velocidade de crescimento considerado rápido RB975033, RB975201 e RB015935, e uma cultivar não classificada, RB015279.

Os Rebolos de 1 gema foram fornecidos já cortados pela RIDESA/UFSCar, enquanto os rebolos de 5 gemas foram retirados da parte central de colmos inteiros, também cedidos pela mesma empresa. Os cortes superior e inferior foram realizados logo abaixo ao nó. A face inoculada foi aquela a qual se manteve o entrenó.

3.3. Testes de agressividade dos isolados

Os testes de agressividade dos isolados foram realizados de duas maneiras, em casa de vegetação e em condições controladas. Para o teste em casa de vegetação foram utilizados os rebolos de 1 gema. Os rebolos foram distribuídos dentro de bandejas preenchidas com solo autoclavado úmido até a metade de sua profundidade. Cuidados foram tomados para que as gemas estivessem sempre posicionadas para cima e as regiões de corte não se tocassem ou

tocassem a parede da bandeja, de modo a evitar a obstrução da entrada do patógeno (Figura 1a). A inoculação foi realizada a partir de aspersão de suspensão de esporos na concentração 10^5 esporos/mL sobre os rebolos. As bandejas então foram completadas com solo de modo a cobrir os rebolos. A primeira irrigação se deu um dia após a inoculação para evitar a lavagem dos esporos. Termômetros eletrônicos (Incoterm, Porto Alegre) foram dispostos aleatoriamente nas bandejas para que fosse possível acompanhar a temperatura do solo ao longo do experimento. O registro das temperaturas momentânea, mínima e máxima foi aferido diariamente, sempre no mesmo horário. O experimento foi mantido no campo por volta de 60 dias, até que se obtivesse a estabilização da emergência. Avaliações diárias foram realizadas do número de plantas afim de se calcular o Índice de Velocidade de Emergência (IVE), que expressa o número de plantas emergidas ao longo do tempo (DOS SANTOS et al., 2015). No último dia do experimento, o número final de plantas deu origem ao estande final e a massa seca da parte aérea das plântulas foi mensurada. Um total de 50 rebolos foram acomodados em cada bandeja, constituindo-se a unidade amostral. As bandejas foram distribuídas no interior da casa de vegetação em um esquema de blocos casualizados. Cada isolado contou como um tratamento e foi repetido três vezes (três diferentes bandejas). O experimento foi conduzido duas vezes no inverno de 2021. Os dados obtidos foram analisados no Software R através da ANOVA e do teste de agrupamento de Scott-Knott.

Para o teste de patogenicidade em ambiente controlado, rebolos de 5 gemas foram inoculados com 200 μ L de suspensão de esporos na concentração de 10^5 esporos/mL na extremidade cujo corte foi realizado logo abaixo do entrenó, enquanto a outra extremidade foi selada com parafilme a fim de evitar contaminação. Após a inoculação, os rebolos foram colocados no interior de baldes com as extremidades inoculadas também cobertas de modo a impedir a contaminação cruzada entre os isolados. Estes rebolos foram mantidos em sala com temperatura controlada a 23°C por 15 dias até a avaliação. Ao final desse período, os rebolos foram seccionados longitudinalmente e o comprimento da lesão foi medido com auxílio de uma régua. Todos os rebolos cortados foram escaneados para confirmação das medidas manuais. O experimento foi conduzido duas vezes. Cada isolado foi inoculado em três repetições, sendo cada uma um rebolo de 5 gemas. Os dados foram analisados no Software R através da ANOVA e do teste de agrupamento de Scott-Knott.

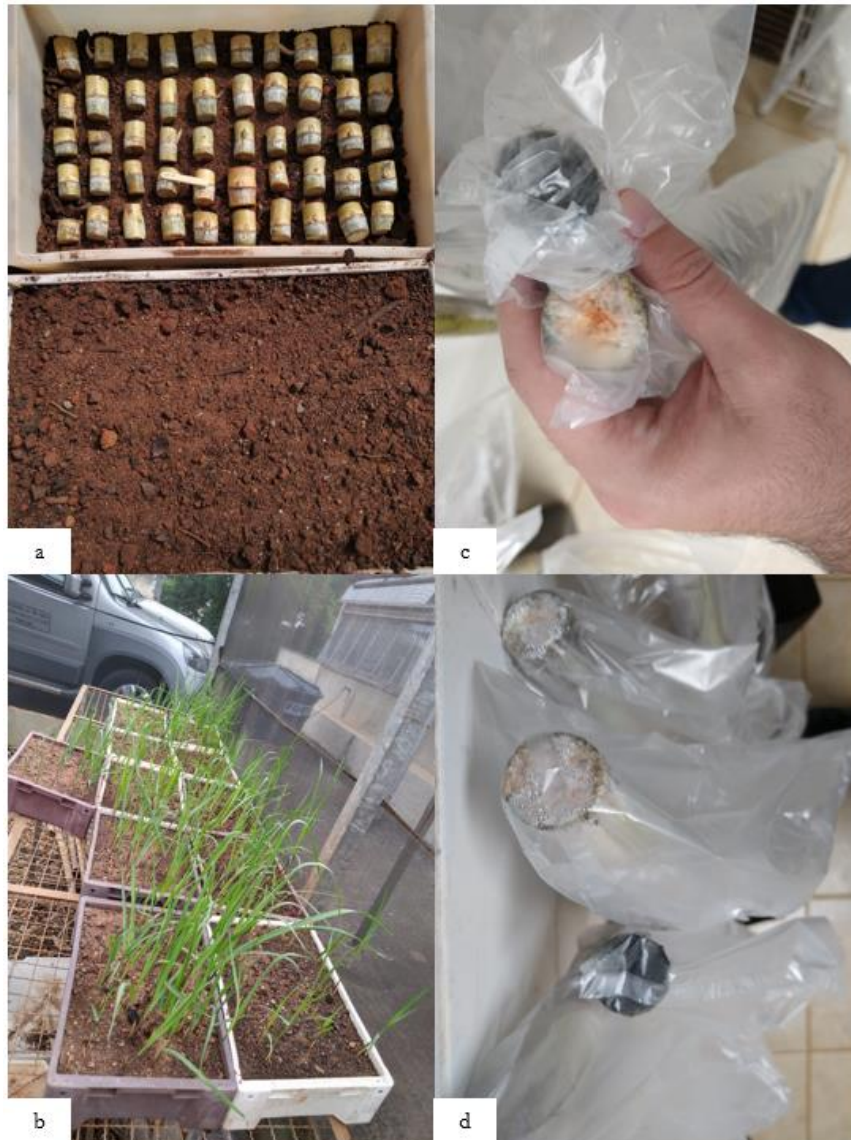


Figura 1. **a.** Bandejas contendo reboles de 1 gema, bandeja com reboles expostos e bandeja após cobertura; **b.** Bloco do experimento em casa de vegetação com bandejas dos diferentes isolados; **c.** Reboles de 5 gemas com a extremidade ensacada inoculada, contraste entre rebolo controle e inoculado; **d.** Contraste entre reboles controle e inoculado, detalhe do ensacamento da extremidade inoculada sem vedação, permitindo a passagem de ar.

3.4. Caracterização da resposta de diferentes cultivares

A partir do teste de agressividade dos isolados, selecionou-se um isolado representativo para realização da caracterização da resposta das cultivares. Assim como para o teste de agressividade, dois diferentes tipos de experimentos foram realizados, um em casa de vegetação e um em ambiente controlado, seguindo padrões semelhantes, mas com algumas adaptações. Nesses experimentos os diferentes tratamentos foram as diferentes cultivares. Cada cultivar teve o seu próprio controle não inoculado, a fim de permitir a comparação entre cultivares e dentro do nível cultivar entre inoculado e não inoculado. Para o experimento em casa de vegetação foram utilizados vasos de 5L onde foram acomodados 6 reboles de 1 gema para cada cultivar. Da mesma forma que nas bandejas, os vasos foram preenchidos com solo autoclavado úmido até a metade, onde foram posicionados os reboles com as gemas voltadas para cima e sem obstrução das regiões do corte. Os reboles foram inoculados por aspersão de

suspensão de esporos de concentração 10^5 esporos/mL e cobertos com solo. Os vasos foram distribuídos na casa de vegetação em um esquema de blocos casualizados. A primeira irrigação ocorreu apenas após um dia da inoculação. Termômetros eletrônicos (Incoterm, Porto Alegre) foram dispostos aleatoriamente nos vasos para que fosse possível acompanhar a temperatura do solo ao longo do experimento. O registro das temperaturas momentânea, mínima e máxima foi aferido diariamente, sempre no mesmo horário. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de 50 dias, até a estabilização da emergência. Medidas diárias de número de plantas emergidas foram realizadas para cálculo do IVE. No último dia do experimento, a contagem final do número de plantas foi realizada para obtenção do estande final para cada cultivar, assim como a mensuração da massa seca da parte aérea das plântulas. Cada tratamento contou com três repetições. O experimento foi conduzido duas vezes no inverno de 2022. Os dados foram analisados em um esquema fatorial no Software R através da ANOVA e do teste de agrupamento de Scott-Knott.

Para os experimentos em ambiente controlado, a mesma metodologia adotada para os isolados foi utilizada, com o único diferencial de que desta vez, cada tratamento (cultivar) teve o seu próprio controle não inoculado. Rebolos de 5 gemas foram inoculados com 200 μ L de suspensão de esporos a concentração de 10^5 esporos/mL na extremidade cujo corte foi realizado logo abaixo do entrenó, enquanto a outra extremidade foi vedada com parafilme a fim de evitar contaminação. Após a inoculação, os rebolos foram colocados no interior de baldes com as extremidades inoculadas também cobertas de modo a impedir a contaminação cruzada entre os isolados. Estes rebolos foram mantidos em sala de temperatura controlada a 23°C por 15 dias até a avaliação. Ao final dos 15 dias, os rebolos foram seccionados longitudinalmente e o comprimento da lesão foi medido com auxílio de uma régua. Todos os rebolos cortados foram escaneados para confirmação das medidas manuais. O experimento foi conduzido duas vezes. Cada tratamento contou com três repetições. Os dados foram analisados em um esquema fatorial no Software R através da ANOVA e do teste de agrupamento de Scott-Knott.

3.5. Caracterização e filogenia dos isolados

Para esta etapa diferentes processos foram realizados, sendo eles, extração de DNA, realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), análise filogenética, mensuração da velocidade de crescimento das colônias, mensuração das dimensões dos conídios e registro fotográfico das colônias.

A extração de DNA foi realizada com kit Promega Wizard Gemomic DNA Purification seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop (ThermoFisher) e sua integridade observada em gel de agarose 1% em eletroforese. As amostras foram então armazenadas a -20°C. A PCR foi realizada utilizando os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATIGATATGC-3') para a região ITS (WHITE et al., 1990), β tla (5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3') e β tlb (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3') para a região β -tubulina (GLASS; DONALDSON, 1995), e EF1-688F (5'-CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC-3') e EF1-1251R (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3') para a região TEF-1 α (ALVES et al., 2008). Inicialmente, os primers a serem adotados para a região TEF-1 α seriam EF1F e EF2R (JACOBS et al., 2014), assim como adotados por Mbnouem et al. (2014) e Borges et al. (2019), porém, não foi possível amplificar a região com estes primers, mesmo após várias tentativas, obrigando a seleção de novos. Os parâmetros adotados para as reações variaram em função de cada primer, para a região ITS, a enzima utilizada foi a Platinum SuperFi II DNA Polymerase da marca ThermoFisher, a PCR foi realizada com os seguintes parâmetros, desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C. Para a região

β -tubulina, foi utilizado o reagente PCR Master Mix da marca Promega com os seguintes parâmetros, desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C. Para a região TEF-1 α , foi utilizado o reagente PCR Master Mix da marca Promega com os seguintes parâmetros, desnaturação inicial a 96°C por 1 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos e manutenção a 4°C. Os amplicons obtidos foram então avaliados em gel de Agarose 1% em Eletroforese para confirmação dos tamanhos esperados, sendo eles 500 bp para região ITS, 500 bp para região β -tubulina e aproximadamente 800 bp para região TEF-1 α . Uma vez confirmada a amplificação nos tamanhos corretos, as amostras foram enviadas para a empresa ACTGene para purificação e sequenciamento. As sequências obtidas foram utilizadas na confecção do cladograma a partir da análise filogenética com o intuito de identificação das espécies dos isolados. A árvore filogenética foi construída a partir da concatenação das sequências de nucleotídeos dos genes β -tubulina e TEF-1 α . As árvores foram geradas a partir do algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) utilizando probabilidades Bayesianas com o software MrBayes 3.2.1. Com o algoritmo MCMC 1.000.000 árvores foram geradas, descartando as 100.000 primeiras e amostrando a cada 1000. O isolado CMW11164 da espécie *Davidsoniella virescens* foi utilizado como outgroup. A análise filogenética foi conduzida no software Geneious Prime.

Tabela 1. Isolados de referência utilizados na análise filogenética.

Especie	N°	N° alt.	Hospedeiro	Origem	N° acesso GenBank		
					ITS	β -tubulina	TEF-1 α
<i>Davidsoniella virescens</i>	CMW11164			USA	KC305133.1	EF070441.1	EF070413.1
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW28533	CBS 601.70	<i>Ananas comosus</i>	Brasil	JX518331	JX518363	JX518299
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW37775	IMI5056 0	<i>Ananas comosus</i>	Malásia	JX518341	JX518373	JX518309
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW37777	IMI3440 82	<i>Cocos nucifera</i>	Tanzania	JX518339	JX518371	JX518307
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW28534	CBS 453.66	<i>Cocos nucifera</i>	Nigeria	JX518332	JX518364	JX518300
<i>Thielaviopsis ethacetica</i>	CMW36662		<i>Elaeis guineensis</i>	Cameroon	JX518353	JX518385	JX518321
<i>Thielaviopsis musarum</i>	CMW1546		<i>Musa</i> sp.	New Zealand	JX518325	JX518357	JX518293
<i>Thielaviopsis euricoi</i>	CMW28538	CBS 107.22	<i>Cocos nucifera</i>		JX518336	JX518368	JX518304
<i>Thielaviopsis euricoi</i>	CMW28537	CBS 893.70		Brasil	JX518335	JX518367	JX518303
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	CMW28535	CBS 101054	<i>Rosa</i> sp.	Países Baixos	JX518333	JX518365	JX518301
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	CMW36642	CBS 130760	<i>Elaeis guineensis</i>	Camarões	JX518346	JX518378	JX518314
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	CMW36689	CBS 130761	<i>Theobroma cacao</i>	Camarões	JX518342	JX518374	JX518310
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	CMW36754		<i>Elaeis guineensis</i>	Camarões	JX518344	JX518376	JX518312
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	CMW28536	CBS 116770	Palmeira	Equador	JX518334	JX518366	JX518302
<i>Thielaviopsis cerberus</i>	CMW35024		<i>Theobroma cacao</i>	Camarões	JX518356	JX518388	JX518324
<i>Thielaviopsis cerberus</i>	CMW35021	CBS 130763	<i>Theobroma cacao</i>	Camarões	JX518355	JX518387	JX518323
<i>Thielaviopsis cerberus</i>	CMW36668	CBS 130765	<i>Elaeis guineensis</i>	Camarões	JX518348	JX518380	JX518316
<i>Thielaviopsis radicicola</i>	CMW1032	CBS 114.47	<i>Pboenix dactylifera</i>	USA	KF612023	KF612025	KF612024
<i>Thielaviopsis radicicola</i>	CMW37776	IMI3162 25	<i>Pboenix dactylifera</i>	Iráque	JX518338	JX518370	JX518306

Para a velocidade de crescimento, os isolados foram reativados da preservação em -80°C em placas de Petri contendo meio BDA. Posteriormente, cada isolado teve um disco de micélio de 0.7 cm repicado no centro de três diferentes placas de Petri (repetições) contendo meio BDA. O crescimento radial foi mensurado diariamente até que a primeira colônia atingisse a borda da placa. As medidas foram tomadas do centro da colônia a sua borda em quatro diferentes direções. Ao final do experimento, as fotografias das colônias frente e verso foram tiradas.

A mensuração das medidas de comprimento e diâmetro dos esporos foi realizada com auxílio de microscópio de luz Axioskop 2 (Zeiss) e do software Vision Rel 4.9., onde foram feitas as medidas de comprimento e diâmetro de 50 esporos de cada tipo (conídio primário e secundário, e aleuroconídio) para cada isolado. Imagens foram feitas de cada isolado representando cada tipo de conídio.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamentos

Doze isolados de *Thielaviopsis* sp. foram isolados dos rebolos de diferentes regiões. Estes isolados somaram-se aos 7 isolados provenientes da coleção do CTC e do laboratório de fungos fitopatogênicos, gerando os 19 isolados utilizados nos experimentos (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados de *Thielaviopsis* sp. obtidos.

Isolado	Origem	Local de coleta	Identificação prévia	Cultura	Data da coleta
LFN - T01	Coleção CTC	Ribeirão preto - SP	-	Cana-de-açúcar	-
LFN - T02	Coleção CTC	Fazenda Barrinha	RB72 - 454	Cana-de-açúcar	-
LFN - T03	Coleção CTC	Usina Buriti	SP90 - 1107	Cana-de-açúcar	-
LFN - T04	Coleção CTC	Usina Santa Maria	-	Cana-de-açúcar	-
LFN - T05	Coleção CTC	-	LFN0035	Cana-de-açúcar	-
LFN - T06	Coleção CTC	-	LFN0034	Cana-de-açúcar	-
LFN - T07	Isolamento	Porto Ferreira - SP	-	Cana-de-açúcar	15/05/2021
LFN - T08	Isolamento	Porto Ferreira - SP	-	Cana-de-açúcar	15/05/2021
LFN - T09	Coleção Lab.	Usina São Martinho	Ceratocystis p.	Cana-de-açúcar	-
LFN - T10	Isolamento	Tambaú - SP	-	Cana-de-açúcar	29/05/2021
LFN - T11	Isolamento	São Joaquim - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T12	Isolamento	São Joaquim - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T13	Isolamento	Alvorada - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T14	Isolamento	Tabelão - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T15	Isolamento	Tabelão - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T16	Isolamento	Bom Jesus - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T17	Isolamento	Alvorada - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T18	Isolamento	Bom Jesus - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021
LFN - T19	Isolamento	Tabelão - SP	-	Cana-de-açúcar	19/06/2021

Os isolamentos foram realizados por método direto e indireto. Alguns dos rebolos recebidos, quando cortados, já apresentavam esporulação do patógeno em seu interior, enquanto outros precisaram passar por câmara úmida para que se observasse os sinais do patógeno e fosse possível seu isolamento.

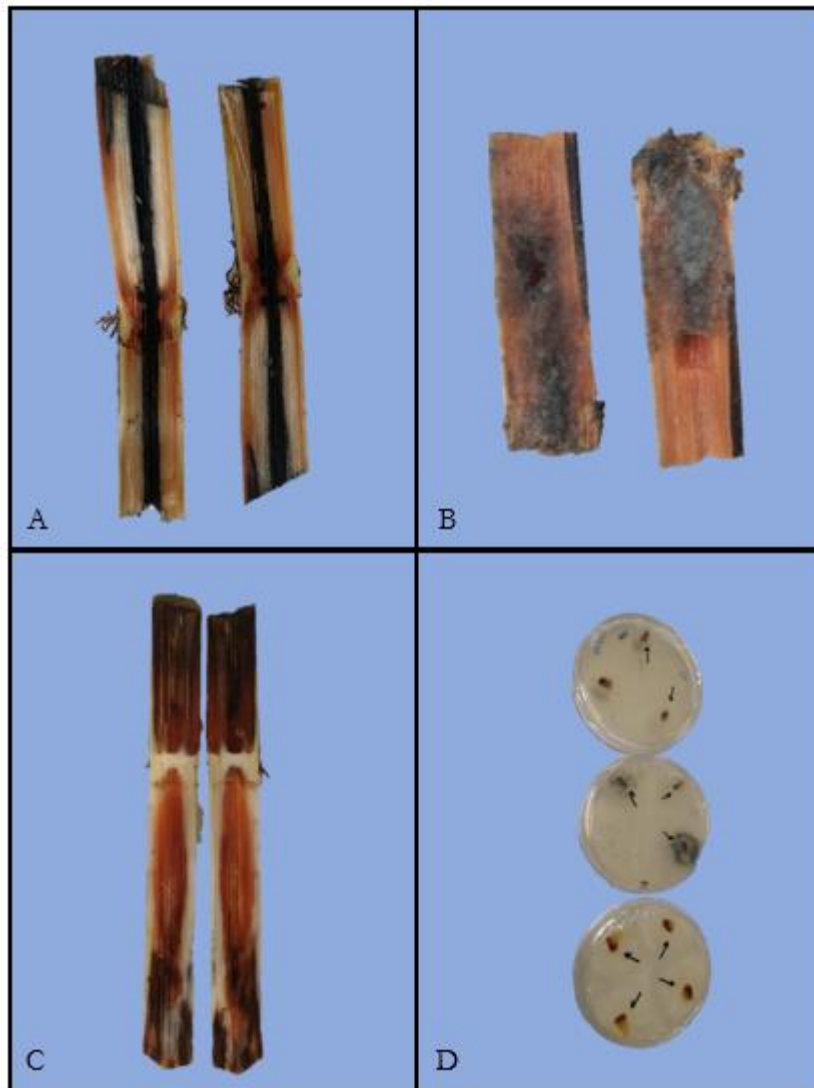


Figura 2. **A.** Rebolo de cana-de-açúcar recebido para isolamento, já contendo esporulação do patógeno; **B.** Rebolo recebido após 5 dias em câmara úmida; **C.** Rebolo recebido apresentando sintomas de ataque do patógeno, mas sem sinais visíveis; **D.** Placas de Petri com meio BDA contendo fragmentos retirados de regiões de sintomas dos rebolos.

4.2. Agressividade dos isolados

Em ambos os experimentos, em casa de vegetação e em ambiente controlado, foi possível comprovar a agressividade de todos os isolados obtidos em cana-de-açúcar. Não foi possível identificar um isolado que se destacasse dos demais em termos de agressividade.

4.2.1. Teste de agressividade em casa de vegetação

Como discutido anteriormente, em casa de vegetação, foram avaliados os parâmetros estande final (número de plantas), massa seca da parte aérea e índice de velocidade de emergência (IVE) para os rebolos de uma gema inoculados com cada isolado. A repetição do experimento em casa de vegetação não apresentou diferenças estatísticas

entre as médias, portanto, não será apresentada. Essa falta de diferença estatística na segunda repetição e a diferença entre ambos os experimentos pode ser explicada pela diferença de temperatura média no solo entre as duas repetições do ensaio (Figura 3). Durante a repetição 1 a temperatura média do solo observada foi de 24,4°C, enquanto na repetição 2 a temperatura média do solo observada foi de 27,3°C. No primeiro ensaio, a temperatura foi menos favorável à brotação e, portanto, mais favorável à ocorrência da doença. A temperatura basal de brotação para cana-de-açúcar se encontra em torno de 21°C (CELEMENTS, 1940; MANHÃES et al., 2015), temperaturas próximas a 20°C além de favoráveis ao crescimento do patógeno, induzem a produção em maior quantidade de acetato de etila, do que temperaturas em torno de 28°C (KUO et al., 1969), sendo assim, temperaturas próximas a esta faixa tendem a ser mais favoráveis ao patógeno. No segundo ensaio, com temperatura média acima de 27 °C, os rebolos brotaram mais rapidamente e não foi possível observar o efeito das inoculações com o patógeno.

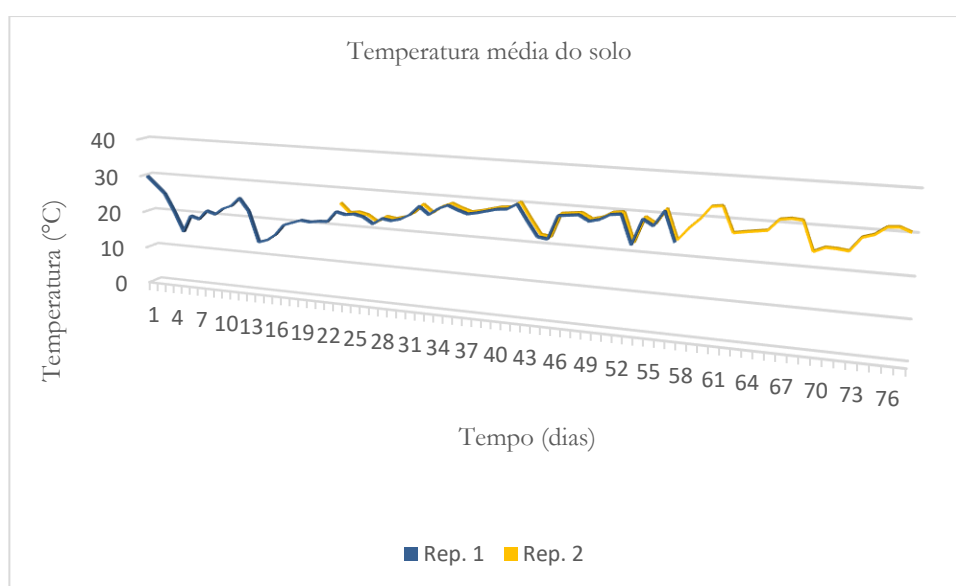


Figura 3. Temperatura média do solo das bandejas ao longo das repetições 1 e 2 em casa de vegetação.

Nos experimentos em casa de vegetação apenas dez isolados representativos dos 19 obtidos foram utilizados.

Para o estande final, os isolados LFN-T01, LFN-T03, LFN-T04, LFN-T05, LFN-T07, LFN-T08, LFN-T09 e LFN-T10 se destacaram como mais agressivos dentre os isolados utilizados, resultando em estande final menor. Já os isolados LFN-T02 e LFN-T06, causaram redução menor no estande, porém significativa em relação ao controle, apresentando-se como intermediários (Tabela 3).

Para a massa seca da parte aérea das plântulas, não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 3).

Para o IVE, foram observadas diferenças significativas para o efeito dos isolados. Os únicos isolados a mostrarem semelhança ao controle foram LFN-T02 e LFN-T06, enquanto os demais causaram redução na velocidade de emergência das plântulas, corroborando os resultados observados para o estande final.

Tabela 3. Resultados de estande final, IVE e massa seca dos rebolos de uma gema da variedade RB92579 inoculada com 10 isolados representativos de *Thielaviopsis* sp.

Tratamento	Estande Final	IVE	Massa seca (g)
Controle	37,00 a	21,16 a	8.30
LFN-T01	12,00 c	6,31 b	1.69
LFN-T02	22,00 b	12,88 a	4.20
LFN-T03	10,67 c	6,17 b	2.38
LFN-T04	7,00 c	3,91 b	1.29
LFN-T05	7,33 c	4,38 b	1.33
LFN-T06	21,67 b	14,36 a	5.99
LFN-T07	13,00 c	7,31 b	4.15
LFN-T08	16,33 c	8,60 b	3.29
LFN-T09	14,00 c	8,75 b	3.59
LFN-T10	11,67 c	7,94 b	2.56
CV	39.60%	59.66%	69.82%

* Letras iguais indicam medias semelhantes segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

4.2.2. Teste de agressividade em ambiente controlado

Ambos os experimentos para o teste em ambiente controlado apresentaram medias semelhantes, portanto, foi conduzida análise conjunta e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.

Apesar dos experimentos não permitirem identificar um isolado mais agressivo, confirmou-se a patogenicidade de todos os isolados obtidos. Todos os isolados foram capazes de produzir lesões nos rebolos de cinco gemas, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os isolados. Assim, todos foram considerados igualmente agressivos nesse teste. A partir desta etapa, o isolado LFN-T11 foi selecionado para os experimentos subsequentes em diferentes cultivares, por ter sido o isolado que numericamente proporcionou a maior lesão.

Tabela 4. Comprimento das lesões causadas por *Thielaviopsis ethacetica* em rebolos de 5 gemas da variedade RB92579.

	Comprimento da lesão (cm)
Controle	0,00 b
LFN -T01	31,75 a
LFN-T02	28,76 a
LFN-T03	26,72 a
LFN-T04	27,80 a
LFN-T05	28,05 a
LFN-T06	27,77a
LFN-T07	32,88 a
LFN-T08	32,93 a
LFN-T09	31,93 a
LFN-T10	31,62 a
LFN-T11	37,48 a
LFN-T12	33,80 a
LFN-T13	29,93 a
LFN-T14	32,97 a
LFN-T15	24,30 a
LFN-T16	33,07 a
LFN-T17	25,93 a
LFN-T18	21,92 a
LFN-T19	25,23 a
CV	20.51%

* Letras iguais indicam medias semelhantes segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Foi observado durante as análises que o patógeno foi capaz de atingir de duas a três gemas do rebolo durante os 14 dias do experimento (Figura 4). Esta informação permite inferir sobre as implicações desta velocidade de colonização quando comparado ao tempo necessário para a gema brote. Nos experimentos em casa de vegetação a emergência iniciou por volta de 11 dias após o plantio.

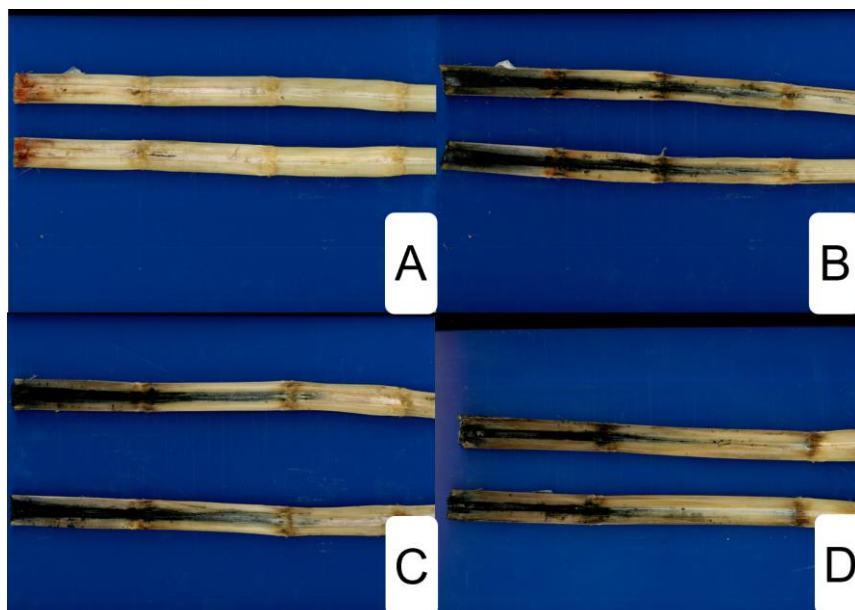


Figura 4. Corte longitudinal de rebolos de 5 gemas inoculados com suspensão de esporos de *T. ethacetica* e mantidos em ambiente controlado por 14 dias. **A.** Controle, rebolo não inoculado; **B.** Rebolo inoculado com LFN-T11, mostrando extensão da lesão até a terceira gema; **C.** Rebolo inoculado com LFN-T17 mostrando extensão da lesão até a segunda gema; **D.** Rebolo inoculado com LFN-T01 mostrando extensão da lesão até a primeira gema.

4.3. Resposta diferencial de cultivares comerciais do estado de São Paulo ao ataque de *T. ethacetica*

Seguindo o mesmo padrão dos experimentos conduzidos para patogenicidade dos isolados, os experimentos com diferentes cultivares foram conduzidos em casa de vegetação com rebolos de uma gema e em ambiente controlado com rebolos de cinco gemas. Foram observados alguns padrões entre as cultivares que serão apresentados a seguir.

4.3.1. Resposta diferencial de cultivares em casa de vegetação

Neste experimento não foram observadas diferenças entre os resultados das repetições dos dois ensaios realizados, por este motivo, foi conduzida análise conjunta dos resultados aqui apresentados.

Para o estande final, as cultivares RB975242, RB015279, RB975952 e RB985476 apresentaram diferenças significativas entre o número de plantas em bandejas com rebolos de uma gema inoculados e não inoculados, indicando que apenas estas cultivares apresentaram um efeito de redução no número de plantas final em relação ao controle. Dentro dos níveis inoculado e não inoculado, encontraram-se diferenças estatísticas entre as cultivares, onde destacam-se as cultivares RB005014 e RB015177 com o maior estande final na presença do patógeno. Para a primeira, observou-se ainda que o número médio de plantas nas bandejas com rebolos inoculados foi superior ao observado em bandejas não inoculadas (Tabela 5).

Tabela 5. Número médio de plântulas (estande final) por cultivar ao final do experimento para rebolos de uma gema inoculados e não inoculados e variação do estande final dos rebolos inoculados com relação ao controle.

Cultivar	Número final de plântulas		
	Controle	Inoculado	Redução
RB975033	5.67 a	5.00 b	11.8%
RB975242	5.67 a A	4.17 c B	26.5%
RB975201	5.67 a	4.67 b	17.6%
RB015279	6.00 a A	3.33 c B	44.5%
RB975952	5.17 a A	2.33 d B	54.9%
RB005014	5.83 a	6.00 a	+ 2.9%
RB015935	5.83 a	5.00 b	14.2%
RB985476	5.67 a A	3.50 c B	38.3%
RB975375	5.17 a	5.00 b	3.3%
RB015177	5.83 a	5.83 a	0%
CV	-	12.01%	-

*Letras maiúsculas para comparação entre médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas, segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

As cultivares RB015279, RB975952, RB015935 e RB985476 tiveram redução significativa na massa seca da parte aérea em decorrência da inoculação com *T. ethacetica* quando comparadas aos controles não inoculados. Na comparação entre as cultivares, RB975033, RB975201, RB005014, RB015935, RB975375 e RB015177 formaram um grupo de cultivares cuja massa seca média se mostrou superior às demais após inoculação com *T. ethacetica*. Destaca-se a cultivar RB975201 cuja massa seca da parte aérea dos rebolos inoculados foi superior à dos não inoculados (Tabela 6).

Tabela 6. Massa seca da parte aérea das plântulas, em gramas, para rebolos inoculados e não inoculados em cada cultivar e variação da massa seca dos rebolos inoculados com relação ao controle.

Cultivar	Massa seca da parte aérea		
	Controle	Inoculado	Redução
RB975033	2.95 a	2.77 a	6.1%
RB975242	2.30 b	1.51 b	34.3%
RB975201	2.01 b	2.24 a	+ 11.4%
RB015279	2.34 b A	0.88 b B	62.4%
RB975952	2.69 b A	0.88 b B	67.3%
RB005014	2.57 b	1.90 a	26.1%
RB015935	3.68 a A	2.47 a B	32.9%
RB985476	2.10 b A	1.25 b B	40.5%
RB975375	1.97 b	1.76 a	10.6%
RB015177	2.99 a	2.45 a	18.0%
CV	-	22.41%	-

*Letras maiúsculas para comparação entre médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas, segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Para o índice de velocidade de emergência, observou-se que um grupo maior de cultivares apresentaram diferença entre as médias entre rebolos inoculados e não inoculados. Este índice representa melhor o dano causado

por este patógeno em comparação aos demais. As cultivares RB015279, RB015935, RB975033, RB975242, RB975952 e RB985476 apresentaram diferença significativa entre as médias de rebolos inoculados e não inoculados, indicando que estas cultivares tiveram a velocidade de emergência afetada pela presença do patógeno. Dentre as médias de rebolos inoculados, destaca-se a cultivar RB005014 assim como visto para estande final, indicando que esta cultivar foi a mais rápida a germinar e, por tanto, a menos afetada. Houve ainda um grupo intermediário em termos de velocidade composto pelas cultivares RB975033, RB975201, RB015935 e RB015177, das quais apenas a segunda e a última não apresentaram diferença significativa entre inoculado e não inoculado. Novamente, a cultivar RB975201 apresentou um valor superior para os rebolos tratados em relação aos não tratados.

Tabela 7. Índice de Velocidade de Emergência (IVE) das plântulas originadas de rebolos inoculados e não inoculados por cultivar e variação do IVE dos rebolos inoculados com relação ao controle.

Índice de velocidade de emergência			
Cultivar	Controle	Inoculado	Redução
RB975033	7.87 a A	6.10 b B	22.5%
RB975242	7.27 a A	4.60 c B	36.7%
RB975201	5.00 b	5.09 b	+ 1.8%
RB015279	7.89 a A	2.25 d B	71.5%
RB975952	6.79 b A	2.58 d B	62.0%
RB005014	8.25 a	7.81 a	5.3%
RB015935	8.38 a A	5.80 b B	30.8%
RB985476	6.32 b A	3.45 c B	45.4%
RB975375	5.71 b	4.29 c	24.9%
RB015177	7.59 a	5.94 b	21.7%
CV	-	16.76%	-

*Letras maiúsculas para comparação entre médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas, segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

4.3.2. Resposta de cultivares em ambiente controlado

Os ensaios para avaliar a resposta de cultivares em ambiente controlado foram conduzidos e avaliados de forma semelhante aos experimentos realizados para os diferentes isolados, como comentado anteriormente. Para estes experimentos, ambas as repetições apresentaram médias diferentes, portanto, foi conduzida análise individual.

Nestes experimentos, comprimentos médios inferiores indicam que para a cultivar, o progresso da doença foi inferior ao das demais cultivares. Na repetição 1, foi observada a formação de três grupos, sendo o grupo composto pelas cultivares RB975033 e RB975201, o que apresentou menores comprimentos de lesão. Um grupo intermediário foi formado pelas cultivares RB975242, RB975952, RB015935 e RB015177, enquanto as demais formaram um grupo que apresenta os maiores comprimentos de lesão. Na repetição 2, apenas dois grupos se formaram, sendo as cultivares RB975033, RB975201, RB005014 e RB015935 integrantes do grupo de menor comprimento de lesão. As cultivares RB975033 e RB975201 mostraram-se consistentemente com lesões menores. Já a cultivar RB005014, que se mostrou com maior velocidade de emergência, melhor estande final e no grupo de menor efeito sobre a massa seca, não apresentou constância entre as repetições, sendo na repetição 1 colocada no grupo de maiores lesões e na repetição 2 no grupo de menor, apresentando a maior média dentro deste segundo grupo. A cultivar RB975201, que apresentou

para massa seca e IVE valores maiores em rebolos tratados com relação a rebolos não tratados, compôs em ambas as repetições o grupo de menores lesões.

Tabela 8. Comprimento das lesões causadas por *Thielaviopsis ethacetica* em rebolos de 5 gemas das diferentes variedades utilizadas no experimento.

Comprimento	Comprimento da lesão (cm)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
RB975033	13,93 c	20,23 b
RB975242	21,83 b	29,80 a
RB975201	14,43 c	17,07 b
RB015279	27,90 a	30,67 a
RB975952	21,87 b	28,13 a
RB005014	26,13 a	23,50 b
RB015935	23,27 b	22,00 b
RB985476	31,57 a	28,93 a
RB975375	27,57 a	29,30 a
RB015177	20,77 b	26,27 a
CV	18.70%	11.94%

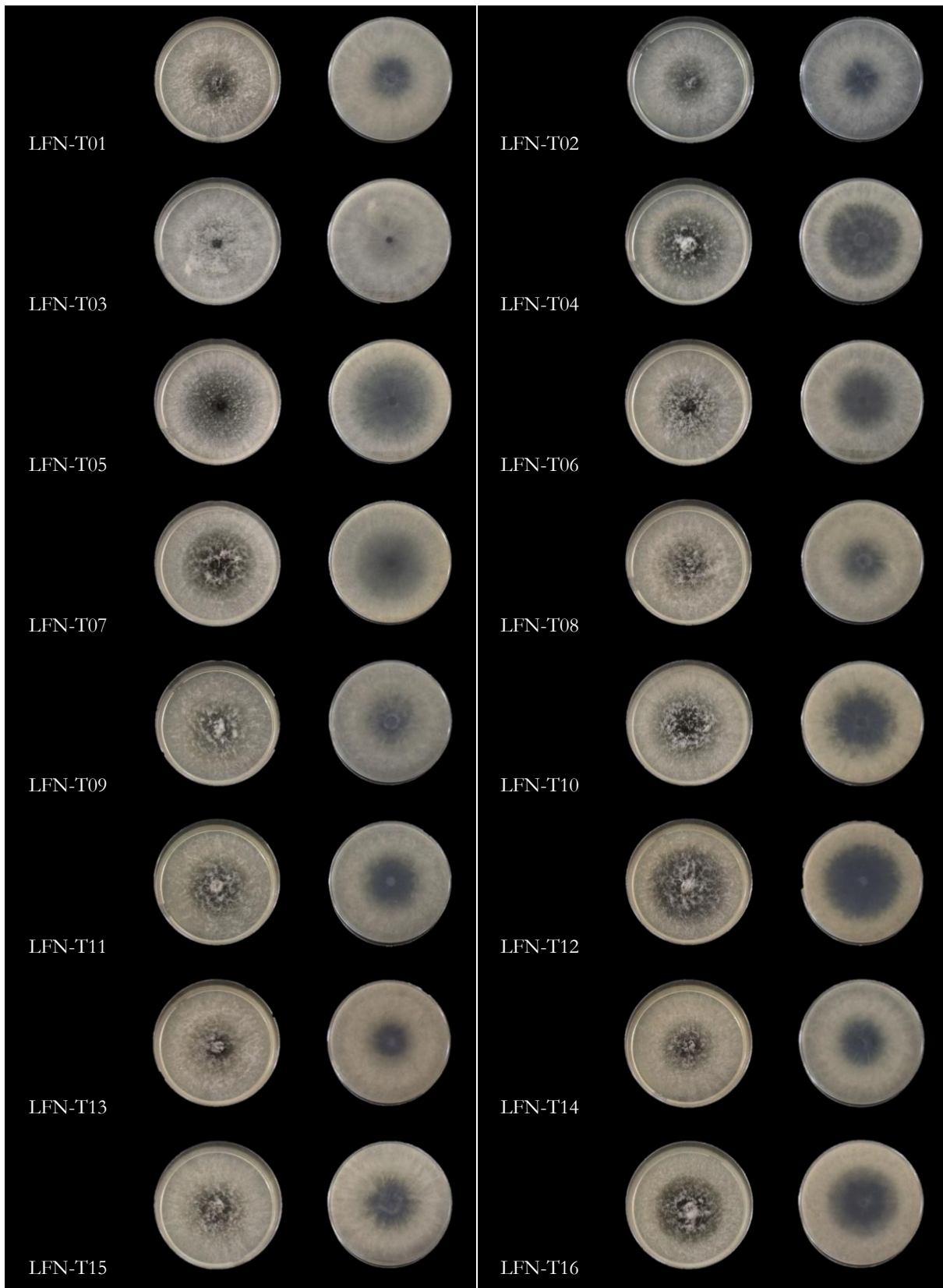
* Letras iguais indicam medias semelhantes segundo o teste de agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

4.4. Caracterização e filogenia dos isolados

Para a caracterização dos isolados, o crescimento das colônias, tamanho dos esporos, características das colônias e análise filogenética foram realizados. Como objetivo principal, a identificação dos isolados a nível de espécie foi realizada através de análise filogenética. Para tal análise, as regiões ITS, TEF-1 α e β -tubulina foram amplificadas e sequenciadas para cada isolado. Por problemas encontrados nos resultados da região ITS, esta não foi utilizada na composição da árvore filogenética final, porém, como mencionado por Mbnoum et al. (2014), esta região apresenta baixa resolução, sendo, por tanto, de menor importância.

4.4.1. Caracterização das colônias

As características observadas nas colônias e crescimento, não apresentaram variação entre os isolados. Todos os isolados apresentaram crescimento inicial rápido produzindo uma colônia jovem de micélio branco. O crescimento radial apresentou característica helicoidal na superfície do meio tomando as placas rapidamente. O crescimento foi seguido de esporulação abundante, que é responsável pela coloração escura das colônias. As colônias de todos os isolados podem ser observadas na Figura 5.



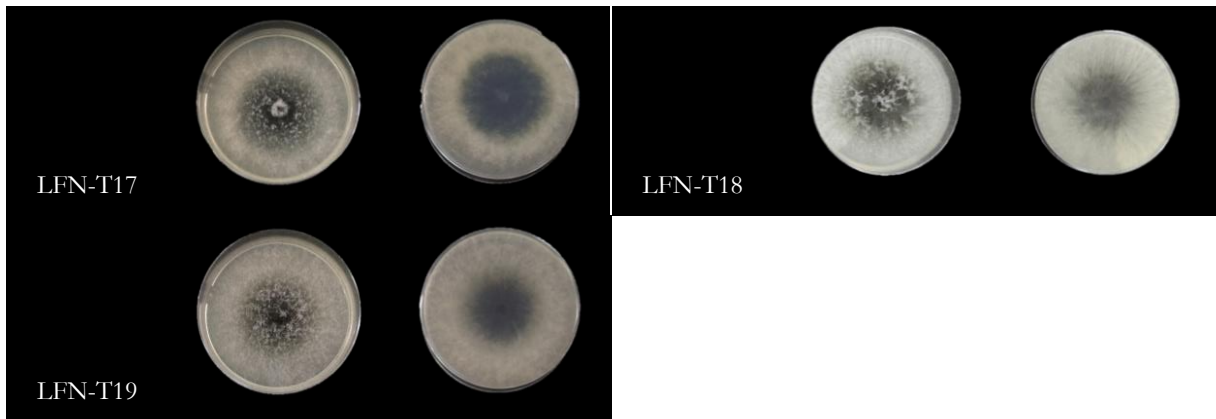


Figura 5. Colônias de todos os isolados dos experimentos em placas de Petri contendo meio BDA (frente e verso). Fotos tiradas dois dias após repicagem.

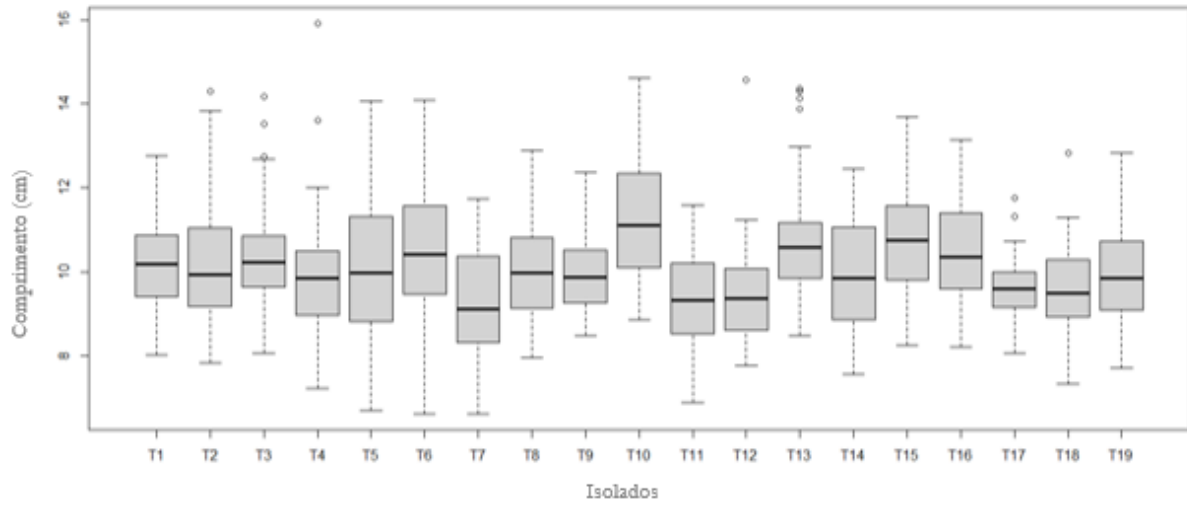
Os isolados apresentaram rápido crescimento em meio de cultura, levando apenas dois dias para que toda a placa de Petri fosse tomada pelo micélio. Sendo possível observar em concomitante ao crescimento, o início da esporulação ao redor do disco de micélio já no primeiro dia. O crescimento radial médio dos isolados foi de 2,25 cm/dia, com exceção dos isolados LFN-T14, com 2,21 cm/dia e do isolado LFN-T19 com 2,23 cm/dia. Não foram observadas nas colônias a presença de sinemas. Foram observados fiáldes solitárias em meio ao micélio.



Figura 6. Fiálide solitária observada nas lâminas das colônias dos isolados obtidos no experimento.

Além da velocidade de crescimento, foi também mensurado o comprimento de 50 conídios dos tipos primário, secundário e aleuroconídios de cada isolado. Os conídios primários observados apresentavam como característica serem hialinos, unicelulares e em formato cilíndrico, com largura média de 4-5 μm e comprimento médio de 9-11 μm entre os isolados. Os conídios secundários observados apresentavam como característica coloração inicial hialina, escurecendo com o amadurecimento, unicelular, forma ovalada com largura média de 5-7 μm e comprimento médio de 8-10 μm entre os isolados. Os aleuroconídios apresentavam coloração escura de marrom claro a marrom escuro, unicelulares de parede espessa, apresentando largura média de 7-10 μm , e comprimento médio de 13-16 μm entre os isolados. Os tamanhos dos esporos para cada isolado podem ser observados nas figuras abaixo.

A



B

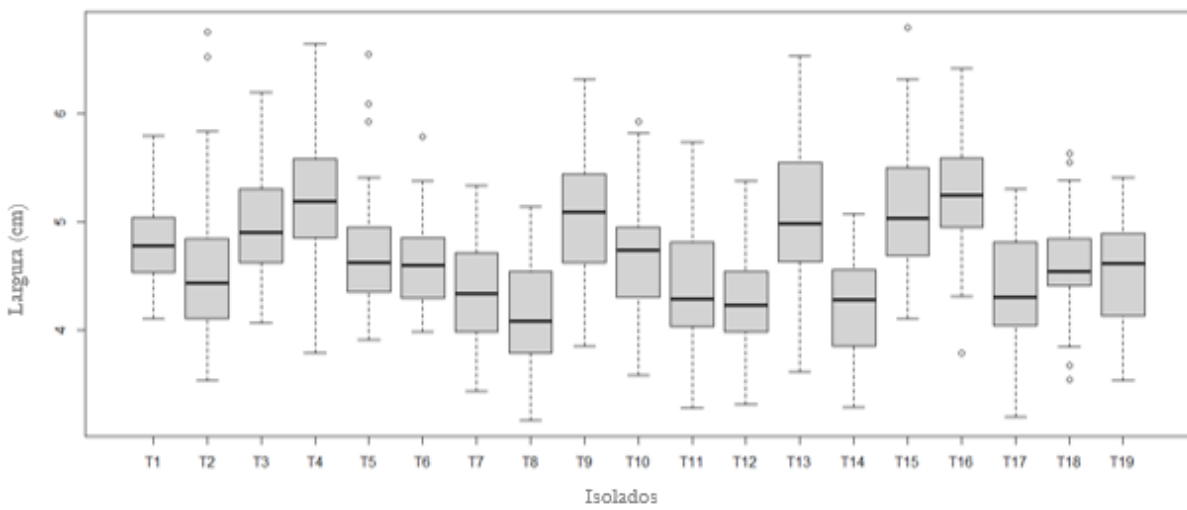
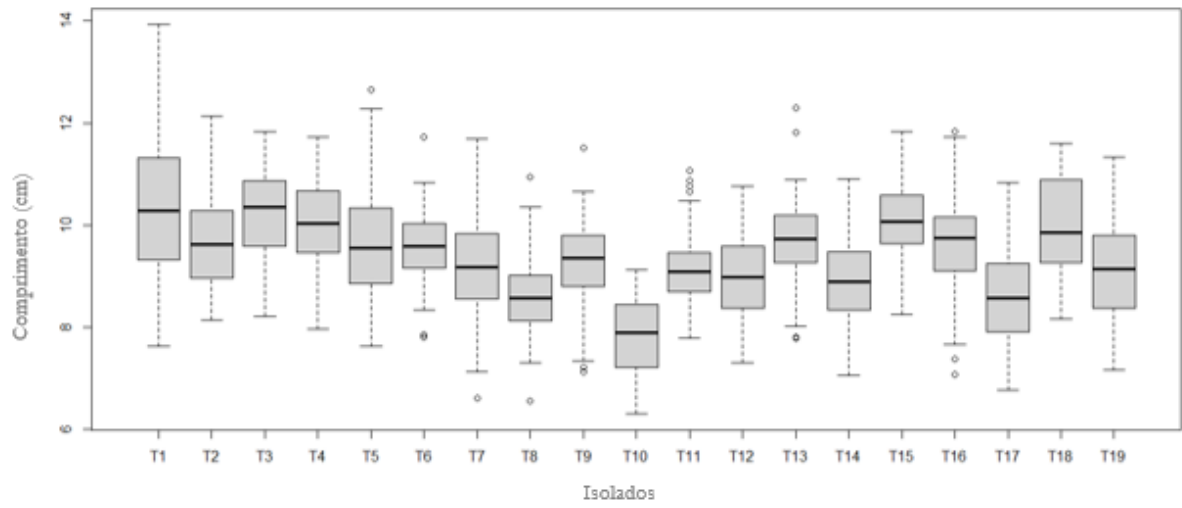


Figura 7. A. Comprimento médio de 50 conídios secundários de cada isolado; B. Largura média de 50 conídios secundários de cada isolado.

A



B

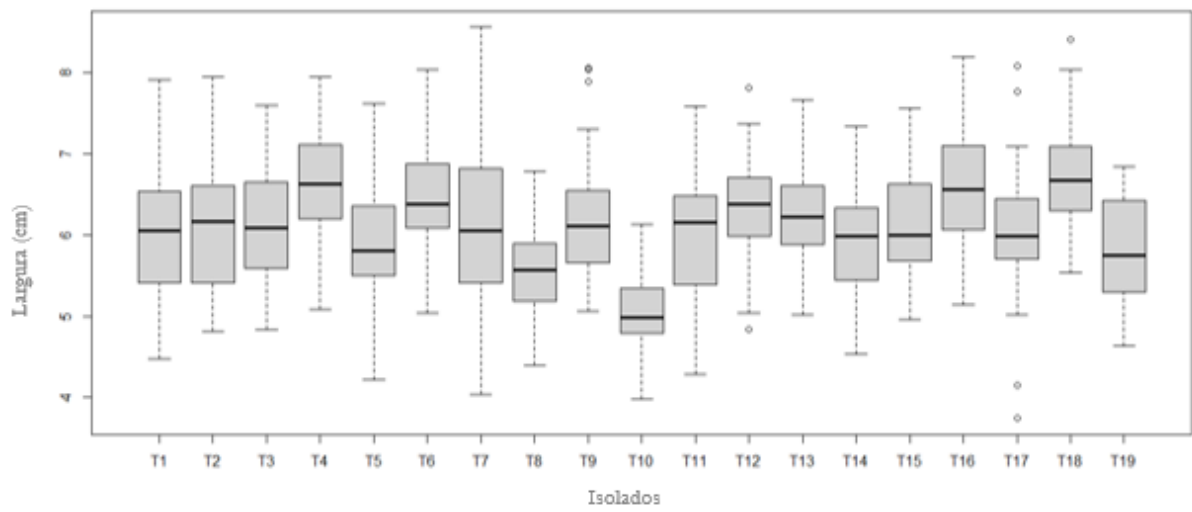
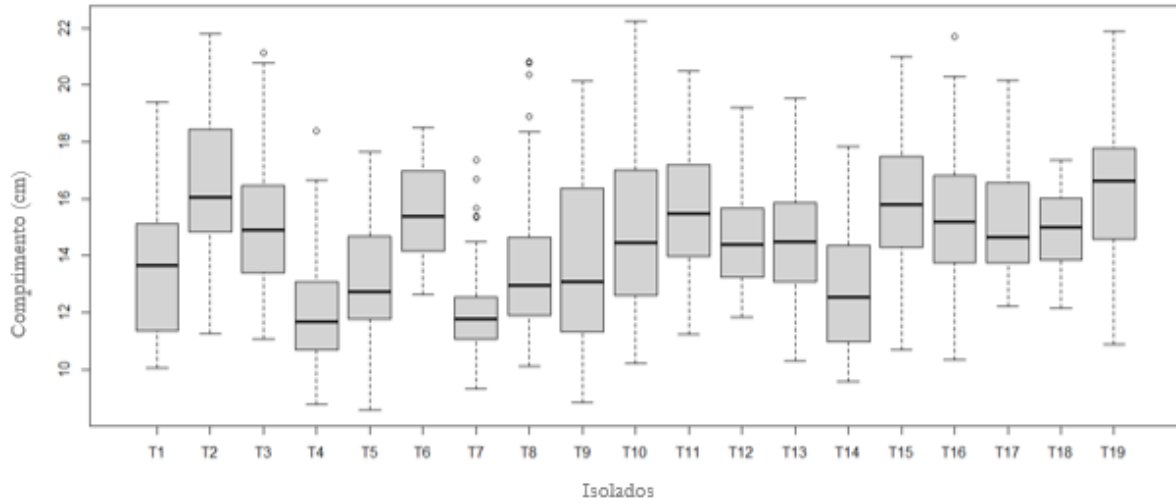


Figura 8. A. Comprimento médio de 50 conídios secundários de cada isolado; B. Largura média de 50 conídios secundários de cada isolado.

A



B

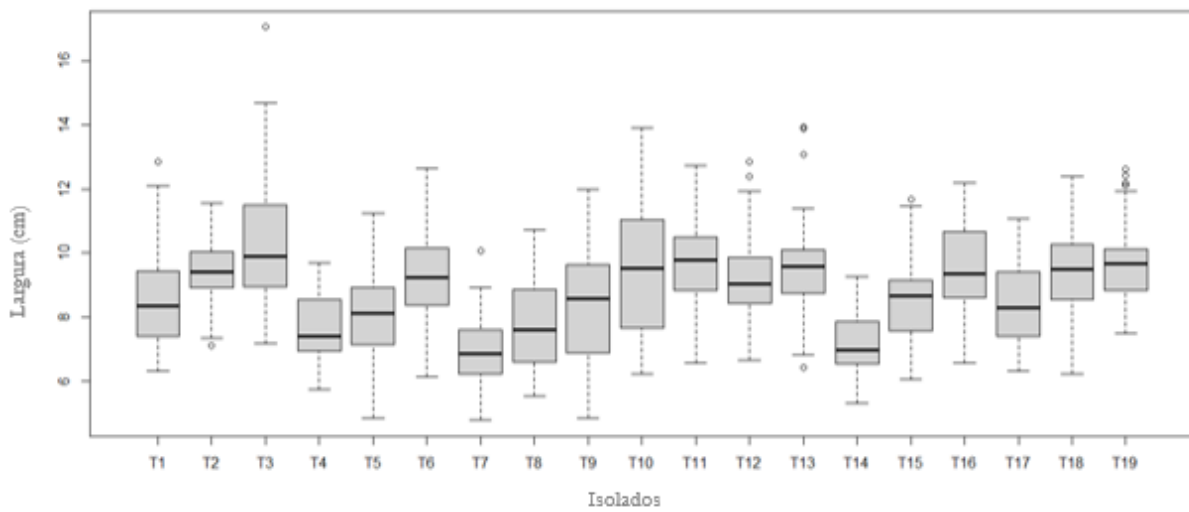


Figura 9. **A.** Comprimento médio de 50 aleuroconídios de cada isolado; **B.** Largura média de 50 aleuroconídios de cada isolado.

Apesar das colônias possuírem características visuais semelhantes e velocidade de crescimento semelhantes, as medidas dos esporos apresentaram certa variação para os esporos do tipo secundário e aleuroconídios. Alguns isolados apresentam medidas bastante inferiores aos demais, como é o caso dos conídios secundários para LFN-T10. Apesar disso, o tamanho dos esporos por si só não é suficiente para indicar que se trata de diferentes espécies.

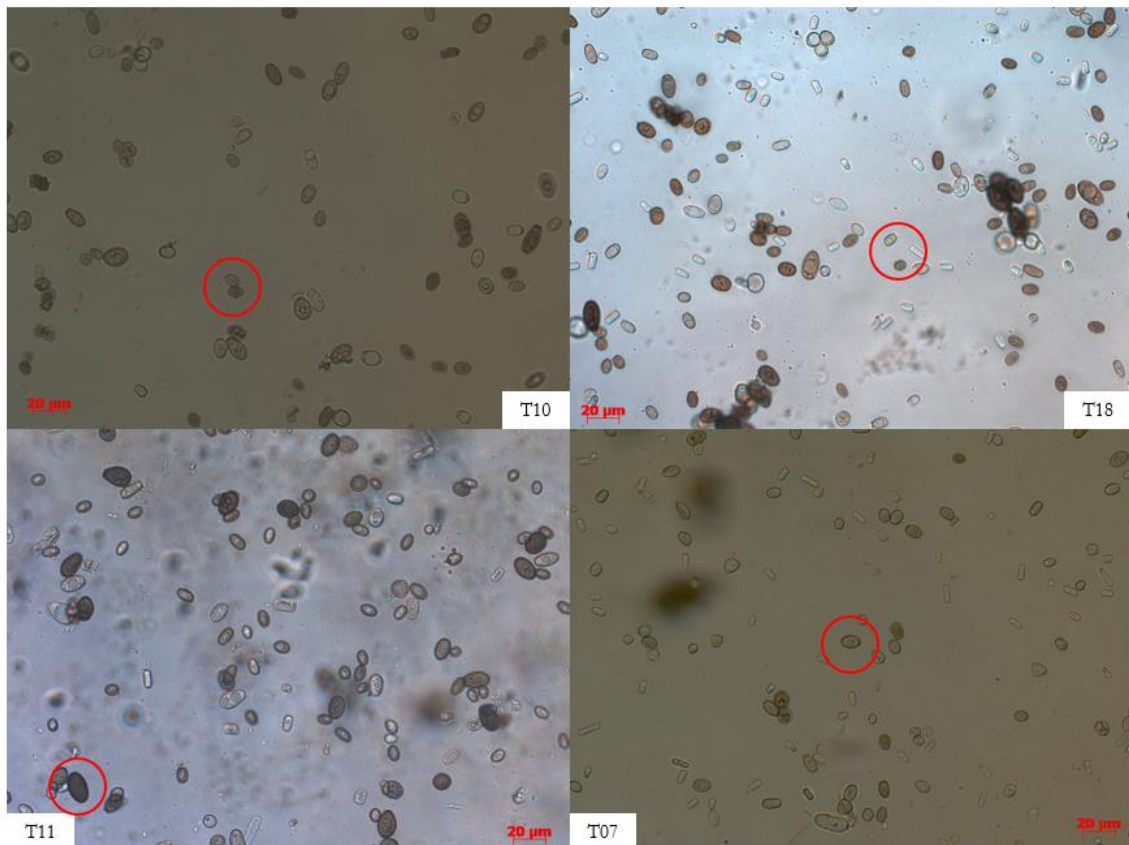


Figura 10. Imagens dos três tipos de conídios dos isolados LFN-T10, LFN-T18, LFN-T11 e LFN-T07. Círculos destacam a comparação entre conídios secundários dos isolados LFN-T10 e LFN-T18 e entre aleuroconídios dos isolados LFN-T11 e LFN-T07, cujas médias de tamanho se apresentaram em diferentes extremos.

4.4.2. Filogenia dos isolados

A comparação cuidadosa das regiões TEF-1 α e β -tubulina dos isolados obtidos no experimento com isolados já caracterizados pertencentes ao complexo *Ceratocystis paradoxa* permitiram identificar os mesmos como sendo da espécie *Thielaviopsis ethacetica*. Todos os isolados se agruparam no mesmo clado com os isolados de referência CBS 601.70, obtido de abacaxi no Brasil e IMI50506, obtido de abacaxi na Malásia. Outros isolados agrupados próximos foram IMI344082, obtido de coqueiro na Tanzânia, CBS 453.66, obtido em coqueiro na Nigéria e CMW36662, obtido de dendezeiro em Camarões.

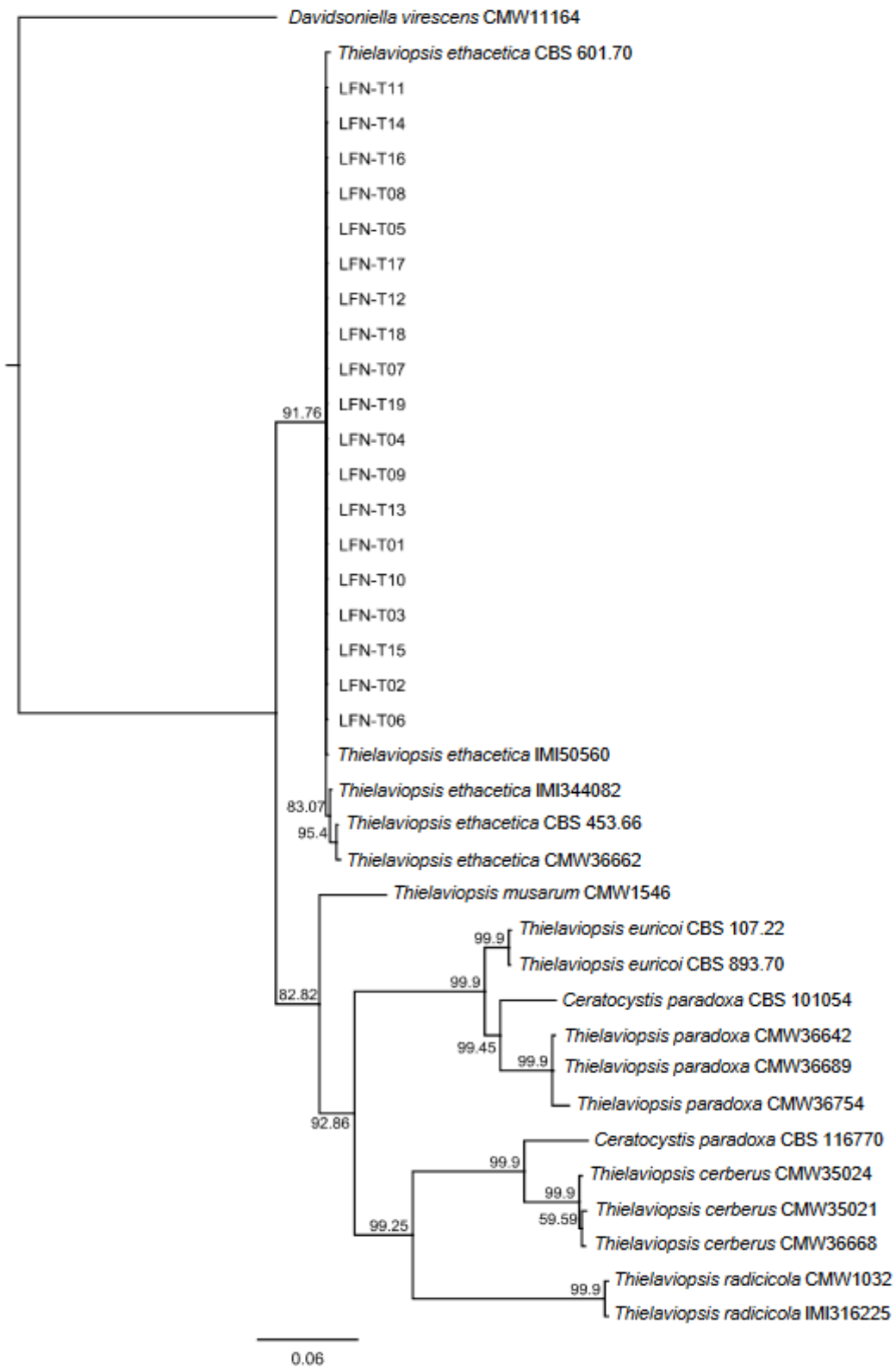


Figura 11. Árvore filogenética derivada de análise Bayesiana da combinação das sequências das regiões TEF-1 α e β -tubulina dos isolados obtidos no trabalho. Os valores de suporte (bootstraps) de 1000 repetições heurísticas encontram-se próximos a cada bifurcação.

5. DISCUSSÃO

Por muitos anos no Brasil, a podridão abacaxi tem sido associada ao patógeno *Thielaviopsis paradoxa* (ROSSETO et al., 1986). Após a intensa descrição e reclassificação das espécies pertencentes ao complexo *Ceratocystis paradoxa* feita por De Beer et al. (2014) e Mbnoum et al. (2014), demonstrando a grande variação e a separação entre as espécies, e o indicativo de que no Brasil, o agente causal da doença e, na verdade, *Thielaviopsis ethacetica* (BORGES et al., 2019), fazia-se necessária a confirmação da espécie encontrada em áreas produtoras da cultura no estado de São Paulo, um dos mais importantes produtores de cana-de-açúcar no Brasil. Observando os resultados obtidos a partir da análise filogenética, constatou-se que nesta região, a espécie associada a doença e *Thielaviopsis ethacetica*.

Assim como discutido por Hyde et al. (2014), existe grande dificuldade na identificação de fungos fitopatogênicos a partir de suas características morfológicas em função da grande variabilidade decorrente de diferentes fatores. No caso de *Thielaviopsis ethacetica* e *T. paradoxa*, características como tamanho de esporos e aspectos da colônia não são boas formas de distinção, uma vez que existe grande variação entre isolados, assim como corpos de frutificação, neste caso, peritécios, que não apresentam diferenças. Apesar disso, a diferenciação destas espécies pode ser realizada por um marcador morfológico da fase assexuada. Enquanto *T. ethacetica* produz majoritariamente fríalides solitárias, *T. paradoxa* pode produzir sinemas, estruturas onde diversos conidióforos alongados unem-se formando um aglomerado alongado que se assemelha ao formato de uma árvore.

Tabela 9. Comparação entre as variações encontradas para o tamanho (µm) de cada tipo de esporos entre artigos de referência e o observado nos isolados obtidos.

Tipo	Mbnoum et al. 2014				LFN - T01 - T19		Borges et al. 2019	
	<i>T. paradoxa</i>		<i>T. ethacetica</i>		<i>T. ethacetica</i>		<i>T. ethacetica</i>	
	Comp.	Largura	Comp.	Largura	Comp.	Largura	Comp.	Largura
Primário	10-14	4-5	7-8	4-5	9-11	4-5	6-7	4-5
Secundário	9-13	6-7	8-11	6-7	8-10	5-7	7-10	5-7
Aleuroconídio	10-16	8-12	14-18	8-11	13-16	7-10	13-16	7-9

A correta identificação da espécie é de grande importância por impactar diretamente no manejo da doença, principalmente quando se pensam em características quarentenárias e desenvolvimento de materiais resistentes, como comentado por Borges et al. (2019).

Todos os isolados obtidos no estado de São Paulo foram posicionados, na análise filogenética, no mesmo clado dos isolados de *T. ethacetica* CBS 601.70 e IMI 50560, que foram obtidos, respectivamente, de abacaxi no Brasil, e de abacaxi na Malásia. No estudo de Mbnoum et al. (2015), estes isolados fazem parte do grupo populacional “PINEAPPLE”, um grupo de isolados de baixa diversidade genética, e que provavelmente foi disseminado por diferentes países junto ao cultivo do abacaxi. Outros isolados foram posicionados com alguma variação dentro deste mesmo clado, sendo eles IMI 50560, CBS 453.66 e CMW 36662. O primeiro, pertence ao mesmo grupo populacional “PINEAPPLE” e foi isolado de coqueiro na Tanzânia. O segundo e terceiro isolados, pertencem, respectivamente, aos grupos “PALM1” e “PALM2”, que são grupos populacionais correlacionados e de alta diversidade genética, compostos por isolados de palmeiras. Mbnoum et al. (2015) apresenta indícios de que os grupos “PALM1” e “PALM2” sejam compostos por isolados nativos de países do continente africano, ou cujo processo de introdução ocorreu a muito tempo, explicando a alta variação encontrada. Os resultados encontrados na análise filogenética corroboram com os encontrados por Borges et al. (2019), onde os isolados utilizados foram associados aos mesmos isolados de

referência do presente estudo, com adição do isolado CMW 16691, pertencente ao grupo populacional “CACAO”, que no estudo de Mbnoum et al. (2015) está intimamente relacionado ao grupo “PINEAPPLE” e também apresenta baixa diversidade genética. Isolados de diferentes grupos são capazes de cruzarem entre si, o que pode facilitar a transferência de genes (MBNOUM et al., 2015), porém, a observação de fase sexuada no campo ainda e uma questão em discussão. Estudos como os de Borges et al. (2019) e Mbnoum et al. (2014) fizeram isolamentos de ascósporos de peritécios encontrados em palmeiras e abacaxi em condições de campo. Borges et al. (2019) e Mbnoum et al. (2015) foram capazes de obter peritécios em meio de cultura, porém, no presente estudo, não foram observados peritécios nos rebolos de cana-de-açúcar. Como demonstrado por Mbnoum et al. (2015), os grupos “PINEAPPLE” e “CACAO” apresentam baixa diversidade genética indicando pouca ocorrência de reprodução sexuada. Alvarez et al. (2015) em seu estudo com isolados do Brasil, Equador e Colômbia, levanta a hipótese de que a população do patógeno é majoritariamente clonal, com reprodução sexual esporádica, com base nos resultados encontrados em seu estudo populacional. Apesar do pequeno grupo de isolados utilizado no presente trabalho, os resultados encontrados corroboram com esta hipótese de uma população em sua maioria, clonal, de baixa diversidade genética.

Em se tratando do comportamento de genótipos do hospedeiro, notou-se nos experimentos em casa de vegetação que a cultivar RB005014 em interação com o patógeno, apresentou bons resultados de massa seca das plântulas, estande final de plantas e índice de velocidade de emergência. As cultivares RB015935, RB975033 e RB015177 apresentaram bons resultados quanto a massa seca, sendo que esta última, também apresentou bons resultados relação a estande final junto com RB005014, porém, o mesmo não ocorreu para o índice de velocidade de emergência. A cultivar RB975201 apresentou bons resultados para massa seca, nos rebolos inoculados produziram, inclusive, resultados superiores a rebolos não inoculados, o mesmo foi observado para o IVE. O índice de velocidade de emergência pode ser um bom indicador dos efeitos posteriores desta doença no campo, uma vez que, quanto mais rápido as gemas brotarem e as plântulas emergirem, menos expostas estas ficarão ao ataque do patógeno. Kuo et al. (1969) comentam sobre o efeito do acetado de etila induzindo a produção de etileno nas gemas, impedindo a brotação das mesmas, somado a isso, Tokeshi & Rago (2016) discutem a importância de que o manejo da cultura deve ser realizado de modo a favorecer a rápida brotação dos rebolos, reduzindo assim os impactos da doença. Não existem variedades resistentes a podridão abacaxi da cana-de-açúcar sendo considerado, inclusive, que variedades resistentes são aquelas capazes de rápida brotação em ambientes desfavoráveis (YADAHALLI, 2006; CHANQUINIE, 2015; BEGUM et al., 2008). Desta forma, o índice de velocidade de emergência se coloca como um dos principais indicadores sobre a capacidade de uma cultivar ser mais ou menos resistente a esta doença em condições desfavoráveis a brotação. Ainda assim, grupo de cultivares formado por RB005014, RB015177, RB015935, RB975201, RB975033 e RB015177 pode ser considerado como propenso a resistência em certo nível, uma vez que a massa seca das plântulas não foi tao afetada, significando que a produção não sofreria grandes reduções.

Quando comparado aos resultados observados dos experimentos em condições controladas, as cultivares RB015935, RB975201 e RB975033, que apresentaram bons resultados de massa seca, apresentaram também lesões menores nos rebolos de cinco gemas, enquanto as cultivares RB005014 e RB015177 não foram constantes, sendo agrupadas no grupo de maior lesão na repetição um e menor lesão na repetição dois no caso da primeira, e nos grupos intermediário na repetição um e maior lesão na repetição dois para a segunda, indicando a falta de relação entre menor lesão e melhores resultados, exceto com o índice de massa seca. No caso de RB005014 pode-se dizer que o fator diferencial foi a velocidade de emergência que garantiu a esta cultivar os melhores resultados em todos os índices avaliados. A cultivar RB975201 merece atenção devido aos resultados observados, esta cultivar não só apresentou menores lesões de forma consistente entre as repetições 1 e 2 em condições controladas, como também apresentou

resultados de massa seca e IVE muito bons em relação a rebolos inoculados e não inoculados, sendo, inclusive, resultados superiores nos inoculados. Apesar de não ter apresentado um bom resultado em estande final, com certa redução no número de plantas, o resultado observado na massa seca indica que esta cultivar foi capaz de suprir esta diferença.

Em projetos futuros, passos interessantes como a avaliação de quais compostos presentes nas cultivares RB015935, RB975201 e RB975033 levam a produção de lesões menores, uma vez que isso reflete em melhores resultados de massa seca nas plântulas, indicando que de alguma forma, mesmo não sendo as de mais rápida brotação, estas cultivares conseguem produzir plântulas de peso final semelhantes às de rápida brotação. O investimento em cultivares de rápida brotação também é justificável, uma vez que se observa os bons resultados obtidos para RB005014. Outro passo interessante seria a tentativa de cruzar os diferentes isolados do estado de São Paulo obtidos no trabalho em busca de produção de corpos de frutificação, permitindo identificar diferentes matyng types que possam estar presentes na região, o que somado a estudos populacionais permitiria estabelecer a região de origem deste patógeno, complementando o trabalho realizado por Mbnoum et al. (2015).

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 23 Marco 2023.
- AL ADAWI, A.O.; BARNES I.; KHAN I.A. et al. *Ceratocystis manginecans* associated with a serious wilt disease of two native legume trees in Oman and Pakistan. **Australasian Plant Pathology**, [S. l.], v. 42, p. 179-193, 2013.
- ALFENAS, A.C. et al. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016. p. 55-91.
- ALVES, A. et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- ARCOVERDE, S.N.S.; DE SOUZA, C.M.A.; ORLANDO, R.C.; DA SILVA, M.M.; DO NASCIMENTO, J. M. Crescimento inicial de cultivares de cana-de-açúcar em plantio de inverno sob preparos conservacionistas do solo. **Revista Engenharia na Agricultura - REVENG**, [S. l.], v. 27, n. 2, 2019. DOI: 10.13083/reveng.v27i2.803.
- Álvarez, E.; Llano, G.A.; Loke, J.B.; Chacon, M.I. Characterization of *Thielaviopsis paradoxa* Isolates from Oil Palms in Colombia, Ecuador and Brazil. **J Phytopathol**, 160: 690-700, 2012. <https://doi.org/10.1111/jph.12012>
- BAKSHI, B.K. et al. Studies on four species of *Ceratocystis*, with a discussion on fungi causing sap-stain in Britain. **Commonwealth Mycological Institute**, 35: 1-16p. 1951.
- BEGUM, F.; TALUDKER, M.I.; HOQUE, M. Z. Effect of pineapple disease on germination and yield contributing parameters of some promising varieties of sugarcane. *Sugar tech*, Pabna, Bangladesh, v. 10, n. 2, p. 171-173, 2008.
- BORGES, A.F.; DE ALCÂNTARA, F.N.; DA SILVA, K.M.; BESERRA Jr., J.E.A.B.; MASSOLA Jr., N.S.; MOREIRA, S.I.; DE MELO, M.P. *Thielaviopsis ethacetica* the etiological agent of sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [S. l.], v. 44, n. 5, 2019. DOI: 10.1007/s40858-019-00298-9.
- BOUFLEUR, T. R. et al. First report of *Colletotrichum musicola* causing soybean anthracnose in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 6, p. 1858, 2020.
- BRANDI, F. Formulações Comerciais de *Bacillus* spp. no Controle de Podridão Abacaxi da Cana-de-açúcar. 2015. **Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Campus de Botucatu**, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142324/1/2015TS12.pdf>>.
- BRINKMAN, Fiona SL; LEIPE, Detlef D. Phylogenetic analysis. In: **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**, v. 2, p. 349, 2001.
- BYTHER, R. S.; MOORE, P. H. Inhibition of sugarcane rooting by *Ceratocystis paradoxa*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, n. 4, p. 761-766, 1974.
- CAMARGO, L.E.A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia - Vol. 1: Princípios e Conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018. p. 229-238.
- CHANQUINIE, D. M. Diversidade Patogênica em Isolados de *Thielaviopsis paradoxa* Provenientes de Diferentes Áreas Produtoras de Cana-de-açúcar. 2015. ix, 45 p. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2015.
- CHAPOLA, R.G.; OGASAWARA, G.A.; JANS, B.; MASSOLA Jr., N.S. Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. **Ciencia Rural**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 197–202, 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782014000200001.

- CONAB. Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: 17 Março 2023.
- COOPERCITRUS. Podridão Abacaxi da Cana-de-açúcar. **Revista Agropecuária**. nº413. Março, 2021. Disponível em: <<http://www.coopercitrus.com.br/index.php?pag=revista&p=materia&codigo=6365>>. Acesso em: 01 Março 2023.
- CLEMENTS, H.F. Factors affecting the germination of sugarcane. **Hawaiian Planter's Record**, Honolulu, v. 44, p. 117-146, 1940.
- DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 187–219, 2014. DOI: 10.1016/j.simyco.2014.10.001.
- DOS SANTOS, H.O.; SILVA BOTELHO, F.B.; AMORIM FONSECA, A.C. De; KENJI UENOJO, R.; PEDROSO MENDES, M. RESENDE VON PINHO, E.V.De. Quality of Seeds of Upland Rice Lines Adapted to the State of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Plant Sciences**, [S. l.], v. 06, n. 12, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.612193.
- ESPÍNDOLA, G. M. et al. Promoção de crescimento na cana-de-açúcar infectada por *Ceratocystis paradoxa* com fungo e bactérias antagonistas. 2017. **Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia**, Monte Carmelo, 2017.
- GHELLER, A.C.A. Técnica cultural para o controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar e modelo para estimativa de perdas. 1995. 115p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 1995.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.
- HALSTED B.D. Some fungous diseases of the sweet potato. **Bulletin of the New Jersey Agricultural Experiment Station** 76: 3–32p., 1890.
- HARRINGTON, T.C.; WINGFIELD, M.J. The *Ceratocystis* species on conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, n. 8, p. 1446-1457, 1998.
- HAUSNER, G.; REID, J.; KLASSEN, G. R. On the phylogeny of *Ophiostoma*, *Ceratocystis* ss, and *Microascus*, and relationships within *Ophiostoma* based on partial ribosomal DNA sequences. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, n. 9, p. 1249-1265, 1993.
- HEATH, T.A.; HEDTKE, S.M.; HILLIS, D.M. Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. **Journal of systematics and evolution**, v. 46, n. 3, p. 239-257, 2008.
- HUBERT, J. et al. First report of pineapple black rot caused by *Ceratocystis paradoxa* on *Ananas comosus* in French Guiana. **Plant disease**, v. 98, n. 11, p. 1584-1584, 2014.
- HYDE, K.D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, p. 21-125, 2014.
- IBGE. **Sidra**. 2021. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Acesso em: 31 mar. 2021.
- JACOBS, K. et al. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. **Mycological research**, v. 108, n. 4, p. 411-418, 2004.
- KUO, T. T.; CHIEN, M. M.; LI, H. W. Ethyl acetate produced by *Ceratocystis paradoxa* and *C. adiposum* and its role in inhibition of germination of sugarcane buds. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa - Canada, v. 47, n. 9, p. 1459, 1969.

- LUCENA, E.H.L. et al. Efeito da aplicação de vinhaça e torta de filtro sobre o crescimento inicial da cultura do sorgo sacarino. In: **Jornada de ensino, pesquisa e extensão**, .XIII, Recife, 09 - 13 dez. 2013. Anais... Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0823-3.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2022.
- MANHÃES, C.M.C.; GARCIA, R.F.; FRANCELINO, F.M.A.; FRANCELINO, H.O. De; COELHO, F.C. Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Revista Vértices**, [S. l.], v. 17, n. 1, 2015.
- MARCHIORI, L.F.S. Influência da época de plantio e corte na produtividade de cana-de-açúcar. 2004. 273 p. **Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2004.
- MATSUOKA, S. et al. Bioenergia da cana. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool**. 2 ed. Viçosa: Mecenas, 2012. p. 548-576.
- MBENOUN, M.; DE BEER, Z.W.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D.; ROUX, J. Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. **Mycologia**, [S. l.], v. 106, n. 4, 2014. DOI: 10.3852/13-298.
- MELIN E.; NANNFELDT, J.A. Researches into the blueing of ground wood-pulp. **Svenska Skogsvårdsföreningens Tidskrift** 32: 397–616p., 1934.
- MOREAU, C. Coexistence des formes Thielaviopsis et Graphium chez une souche de *Ceratocystis major* (van Beyma) nov. comb. **Revue de Mycologie** (Paris), v. 17, p. 17-25, 1952.
- MOUTIA, Y.; SAUMTALLY, S. DETECTION FROM SOIL AND DISTRIBUTION OF *Ceratocystis paradoxa* MOREAU, CAUSAL AGENT OF THE PINEAPPLE DISEASE OF SUGARCANE. **Food and Agricultural Research Council**, p. 75, 2001.
- NOCELLI, R. C.F. et al. Histórico da cana-de-açúcar no Brasil: Contribuições e importância. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs.). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. 1 ed. Bauru: Canal 6, 2017. p. 13-30.
- PARDINHO, A.P. Plantio mecanizado da cana-de-açúcar. **Revista Opiniões**. 2013. Disponível em: <<https://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/16-plantio-mecanizado-da-cana-de-acucar/>>. Acesso em: 1 Marco 2023.
- RAID, R. N. Pineapple Disease of Sugarcane. In: RICE, W. R. (Ed.). **Sugarcane Handbook**. Gainesville, FL: Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. p. 1-2. 2012.
- R Core Team (2016). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.
- RIDESA. **Variedades RB**. 2023. Disponível em: < <https://www.ridesaufscar.com.br/variedades>>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- ROBERTSON, J. S. Dry basal rot, a new disease of oil palms caused by *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 45, n. 4, p. 475-IN3, 1962.
- ROSSETTO, C.J. et al. Ocorrência do complexo *Carpophilus humeralis* (Fabricius)-*Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Moreau em cana-de-açúcar no Estado de São Paulo. **Bragantia**, v. 45, p. 171-178, 1986.
- ROSSETO, R.; SANTIAGO, A.D. Plantio da cana-de-açúcar. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. 2008. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_33_711200516717.html>. Acesso em: 1 Marco 2023.

- SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R.M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G.J. In vitro antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 163, n. 1, 2007. DOI: 10.1007/s11046-006-0085-y.
- SCHOCH, C.L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J.C.M. (Ed.). **Atualizacao da producao de cana-de-acucar**. Piracicaba: CP 2, 415 p., 2006.
- SPATAFORA, J. W.; BLACKWELL, Meredith. The polyphyletic origins of ophiostomatoid fungi. **Mycological Research**, v. 98, n. 1, p. 1-9, 1994.
- SYDOW, V.H.; SYDOW, P. Mycologische Mitteilungen. **Annales Mycologici** 17: 33-47p, 1919.
- TALUKDER, M.I.; BEGUM, F.; AZAD, M.M.K. Management of pineapple disease of sugarcane through biological means. **Journal of Agriculture and Rural Development**, Gazipur, v.5, n.1, p.79-83, 2007.
- TOKESHI, H.; RAGO, A.M. Doenças da cana-de-açúcar. In: AMORIM, L. et al. (ed.). **Manual de fitopatologia, volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 5ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 185-196.
- UNICA - União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo. Setor Sucroenergético. 2021. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 04 Marco 2023.
- VEEN, K. H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n. 2, p. 276-278, 1967.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 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. **New York: Academic Press**. p 315-322, 1990.
- WINGFIELD, M.J. et al. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 191-202, 1996.
- WINGFIELD, B. D. et al. *Ceratocystis*: emerging evidence for discrete generic boundaries. **CBS Biodiversity Series**, v. 12, p. 57-64, 2013.
- WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J., et al. Monophyly of the conifer species in the *Ceratocystis coerulea* complex based on DNA sequence data. **Mycologia** 90: 96-101p, 1998.
- YADAHALLI, K. B.; ADIVER, S. S.; KULKARNI, S. Effect of pH, Temperature, and Relative Humidity on Growth and Development of *Ceratocystis paradoxa* – A Causal Organism of Pineapple Disease of Sugarcane. **Karnataka Journal of Agricultural Science**, Karnataka, v. 20, n.1, p. 159-161. 2007.
- YU, F.Y. et al. First report of stem bleeding in coconut caused by *Ceratocystis paradoxa* in Hainan, China. **Plant disease**, v. 96, n. 2, p. 290-290, 2012.