



BÁRBARA APARECIDA ANTONIO DE SOUSA E SILVA

**ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E *Fusarium* ASSOCIADAS A
SINTOMAS DA PODRIDÃO VERMELHA DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

LAVRAS – MG

2023

BÁRBARA APARECIDA ANTONIO DE SOUSA E SILVA

**ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E *Fusarium* ASSOCIADAS A SINTOMAS DA
PODRIDÃO VERMELHA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Professor Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dra. Marileide M. Costa
Co-orientadora

LAVRAS – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Bárbara Aparecida Antonio de Sousa e.

Espécies de *Colletotrichum* e *Fusarium* associadas a sintomas da podridão vermelha da cana-de-açúcar / Bárbara Aparecida Antonio de Sousa e Silva. - 2023.

47 p. : il.

Orientador(a): Ludwig Heinrich Pfenning.

Coorientador(a): Marileide Moreira Costa.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*. 2. Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. 3. *Saccharum* spp. I. Pfenning, Ludwig Heinrich. II. Costa, Marileide Moreira. III. Título.

BÁRBARA APARECIDA ANTONIO DE SOUSA E SILVA

**ESPÉCIES DE *Colletotrichum* E *Fusarium* ASSOCIADAS A SINTOMAS DA
PODRIDÃO VERMELHA DA CANA-DE-AÇÚCAR**

***Colletotrichum* AND *Fusarium* SPECIES ASSOCIATED WITH SYMPTOMS OF
SUGARCANE RED ROT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de Janeiro de 2023.

Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dr. Guilherme Vieira Pimentel

UFLA

Professor Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

Dra. Marileide M. Costa
Co-orientadora

LAVRAS – MG

2023

Para você, Avô Agenor.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa.

Aos meus pais.

Ao Professor Dr. Ludwig e Dra. Marileide, pela orientação e ajuda.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, LSEF.

Ao Departamento de Fitopatologia, DFP.

E Universidade Federal de Lavras, UFLA.

Obrigada!

RESUMO

Entre as doenças fúngicas que podem trazer prejuízos ao setor canavieiro, observa-se a podridão vermelha, que tem como principal agente causal *Colletotrichum falcatum*, induzindo sintomas de podridão no interior do colmo e coloração vermelha na nervura central de folhas da cana-de-açúcar. Outra doença, conhecida como ‘*Pokkah boeng*’, é induzida por espécies do complexo *Fusarium fujikuroi*. Resultados publicados recentemente evidenciam que *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* estão associadas a plantas com sintomas da podridão vermelha e que os sintomas, às vezes, podem se sobrepor aos da ‘*Pokkah boeng*’. Os objetivos desse trabalho foram: (i.) esclarecer se ocorre mais de uma espécie de *Colletotrichum* em plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha; (ii.) qual é o efeito da coinfeção de *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* no desenvolvimento dos sintomas da podridão vermelha; e (iii.) se espécies de *Fusarium* podem causar coloração vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar. Foi coletado material vegetal sintomático das regiões canavieiras de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco em 2021, e os isolados obtidos foram identificados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análises de filogenia molecular utilizando sequências das regiões gênicas *barcode TEF*, *ITS*, *ACT* e *GAPDH* e testes de patogenicidade. Fazemos o primeiro registro no Brasil das espécies *F. madaense*, *F. sacchari* e *F. verticillioides*, causando sintomas de podridão vermelha em folhas de cana-de-açúcar. Foram identificadas ainda uma supostamente nova espécie de *Colletotrichum* e *F. fredkrugeri*, ocorrendo em associação com a cana-de-açúcar. Colmos inoculados com *F. sacchari*, *C. falcatum* e a combinação de ambos desenvolveram sintomas severos. Quando inoculados em folhas, *F. madaense* e *C. falcatum* induziram sintomas de maior comprimento na nervura central em comparação às demais espécies inoculadas. Em conclusão, ocorrem várias espécies causando podridão vermelha nos canaviais. Espécies de *Fusarium* também induzem sintomas de coloração vermelha na nervura central folhas de cana-de-açúcar, e a associação de *Fusarium* e *C. falcatum* resulta no desenvolvimento de sintomas mais severos em colmos. Estes resultados permitirão a diagnose correta dos agentes etiológicos da podridão vermelha e podem dar suporte a programas de melhoramento genético e de formulação de estratégias de manejo, como a recomendação de produtos biológicos e fungicidas adequados.

Palavras-chave: Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*. Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Doença de plantas. Filogenia molecular. *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Red rot of sugarcane is one of the important fungal diseases which can result in losses of yield and quality. The causal agent is known as *Colletotrichum falcatum*, inducing symptoms of rot inside the stem and reddish lesions along the central part of the leaves. Another fungal disease, “*Pokkah boeng*”, is caused by species of the *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC. Recently published results show that *C. falcatum* as well as *Fusarium* species are associated with symptoms of red rot and that symptoms sometimes overlap with those of “*Pokkah boeng*”. The objectives of this study were (i.) to verify if there is more than a single species of *Colletotrichum* associated with sugar cane plants with symptoms of red rot; (ii.) to evaluate the effect of coinfection with *C. falcatum* and *Fusarium* species on the evolution of symptoms of red rot; (iii.) to verify if also *Fusarium* species are able to induce reddish lesions along the central part of the leaves. Symptomatic plant material was collected in the states of Minas Gerais, São Paulo and Pernambuco in 2021, and the obtained isolates were identified by evaluation of morphological markers and molecular phylogenetic analyses of the barcode gene regions *TEF*, *ITS*, *ACT* and *GAPDH*. Pathogenicity of selected strains was tested by inoculation in stems and leaves. *Fusarium madaense*, *F. sacchari* and *F. verticillioides* are reported for the first time in Brazil inducing symptoms of red rot in leaves of sugarcane. A supposedly new species of *Colletotrichum* was identified in association with sugarcane, together with *F. fredkrugeri*, another member of the FFSC. Stems inoculated with *F. sacchari*, *C. falcatum*, and the combination of both, developed severe symptoms. When inoculated in leaves, *F. madaense* and *C. falcatum* induced longer lesions on the central part of the leaves compared with the other species. In conclusion, several species can cause red rot in sugarcane in Brazil. Also, *Fusarium* species induce symptoms of red lesions on the central part of the leaves and the association of *Fusarium* and *C. falcatum* result in the development of more severe symptoms on stems. These findings will permit the correct diagnosis of the causal agents of sugarcane red rot, and give support to breeding programs and the elaboration of adequate strategies for disease management, including the recommendation of biological and chemical products for disease control.

KeyWords: *Colletotrichum graminicola* species complex. *Fusarium fujikuroi* species complex. Plant disease. Molecular phylogeny. *Saccharum* spp.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	9
1	INTRODUÇÃO.....	9
2	ESTADO DA ARTE.....	11
2.1	Cultura da Cana-de-açúcar.....	11
2.2	Complexo de espécies <i>Colletotrichum graminicola</i>.....	12
2.3	Complexo de espécies <i>Fusarium fujikuroi</i>.....	13
2.4	Podridão Vermelha da Cana-de-açúcar.....	13
	REFERÊNCIAS.....	15
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	18
	INTRODUÇÃO.....	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1	Obtenção de isolados e preservação.....	24
2.2	Caracterização morfológica de isolados de <i>Colletotrichum</i>.....	25
2.3	Caracterização morfológica de isolados de <i>Fusarium</i>.....	25
2.4	Extração de DNA, PCR e sequenciamento.....	26
2.5	Análises filogenéticas.....	26
2.6	Testes de patogenicidade.....	27
3	RESULTADOS.....	29
3.1	Identificação de isolados por filogenia molecular e marcadores morfológicos.....	29
3.2	Testes de Patogenicidade.....	34
4	DISCUSSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	44

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos elementos de destaque do agronegócio Brasileiro, na produção de açúcar, etanol e bioenergia. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO (2019), o Brasil é o maior produtor da cultura, que é produzida em quase todo o território brasileiro, sendo o Estado de São Paulo o primeiro lugar em termos de área e produção, seguido dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (CONAB, 2022).

A doença chamada podridão vermelha, atualmente é observada com maior frequência nos canaviais do Brasil e tornou-se uma das principais doenças da cana-de-açúcar no país. Este cenário provavelmente ocorre em função da mudança de práticas de colheita da cultura, que é feita de maneira mecanizada e na ausência das queimadas (Lei da Queima da Cana nº 11.241/2002). A etiologia da doença é atribuída ao fungo *Colletotrichum falcatum*, que já pode estar presente em materiais propagativos, ou pode infectar a planta de cana-de-açúcar através de aberturas naturais, ferimentos ocasionados por mau manuseio dos toletes no momento do plantio, e também causados pela broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae), levando ao chamado complexo broca – podridão. Isso promove perdas diretas e indiretas na cultura, provocadas pela lagarta e pelo fungo, respectivamente (Peñaflor & Bento, 2019). Plantas com sintomas da podridão vermelha apresentam no colmo podridão interna avermelhada, com presença de bandas brancas transversais e coloração vermelha na nervura central das folhas. O fungo também promove a inversão da sacarose, diminuindo o açúcar total recuperável (ATR), contribuindo para perdas qualitativas e quantitativas na cultura (Crouch et al., 2009; Prihastuti et al., 2010; Viswanathan, 2021).

Resultados obtidos recentemente mostraram a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* em associação com sintomas de podridão vermelha, e filogenias geradas a partir de isolados de *Colletotrichum* obtidos de cana-de-açúcar mostraram que pelo menos uma outra espécie do Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC), além de *C. falcatum*, está associada à cana no Brasil e no Japão (Crouch et al., 2009a; 2009b; 2009c; Prihastuti et al., 2010). No Brasil, foram encontrados peritécios de *C. plurivorum* na superfície de folhas, mas essa espécie não foi patogênica quando inoculada em cana-de-açúcar (Costa et al., 2021). Entretanto, Marins et al. (2022) também encontraram *C. plurivorum*, além de *C. siamense*, em

associação com folhas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha, e ambas as espécies foram patogênicas nos testes de patogenicidade.

Nas Filipinas, também foi evidenciada a associação das espécies *Fusarium sacchari* e *Fusarium proliferatum* em plantas de cana-de-açúcar com sintomas da podridão vermelha (Dela Cueva et al., 2019). No Brasil, resultados obtidos por nosso grupo de estudo evidenciaram que *C. falcatum*, *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense* também estão associados a plantas de cana-de-açúcar com sintomas da doença nos estados de Minas Gerais e Paraná. Em testes de patogenicidade, estas mesmas espécies de *Fusarium* induziram sintomas da doença em colmos (Costa et al., 2021). No entanto, com a metodologia utilizada não foi possível reproduzir sintomas da doença nas folhas, e também não foi possível inferir sobre a interação de *C. falcatum* e *Fusarium* spp. na indução dos sintomas da podridão vermelha.

Outras duas doenças fúngicas que podem trazer prejuízos ao setor canavieiro são a “*Pokkah boeng*” e a “*wilt*”, que também diminuem a qualidade da matéria prima e o rendimento industrial (Siti et al., 2008; Costa et al., 2019; Viswanathan, 2020). No Brasil, a “*Pokkah boeng*” é causada por *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense*, membros do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (Costa et al., 2019). A doença conhecida como “*wilt*” é bem documentada na Índia e também causada por espécies de *Fusarium*. Aparentemente, os sintomas desta doença nem sempre podem ser claramente diferenciados dos sintomas da podridão vermelha, uma vez que *Fusarium* e *C. falcatum* induzem podridão no caule e podem ocorrer as duas doenças na mesma planta. Outro ponto a ser considerado é que a podridão do colmo, um dos sintomas da podridão vermelha e da “*wilt*”, pode também ser observada no patossistema “*Pokkah boeng*”, que está comumente presente em tecidos com atividade meristemática e geralmente associado ao sintoma chamado “corte de faca” (Viswanathan et al., 2012; Costa et al., 2019).

Devido à importância da cultura no território brasileiro, este trabalho se propôs a responder às seguintes questões: (i.) ocorre mais de uma espécie de *Colletotrichum* em plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha? (ii.) qual é o efeito da coinfeção de *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* no desenvolvimento dos sintomas da podridão vermelha? e (iii.) espécies de *Fusarium* podem causar coloração vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar?

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem como centro de origem o norte da Índia (Sharpe, 1998) enquanto o Brasil é um de seus centros de diversidade genética. A cultura foi introduzida no território brasileiro já no século XVI, sendo por muitos anos a principal planta cultivada. O país tornou-se o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FAO 2019), sendo a cultura plantada em quase todo o território nacional. O Estado de São Paulo é o maior produtor, seguido de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná (CONAB, 2022).

As lavouras de cana-de-açúcar brasileiras são destinadas a produção de bioenergia, etanol e açúcar, que são utilizados no mercado interno, e também destinados para a exportação. Para a safra 2022/2023, o açúcar está sendo destinado à China, seguido de Marrocos, Nigéria, Argélia, Canadá e Bangladesh, enquanto o etanol segue para a Holanda, Coreia do Sul, Estados Unidos, Reino Unido e Japão (CONAB, 2022). No ano de 2017 no Brasil, a Comissão de Assuntos Econômicos (CAE) aprovou o projeto de Lei chamado Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), que propôs a utilização de bagaço da cana-de-açúcar para produção de biocombustível, como também a redução de gases efeito estufa. O projeto é uma excelente alternativa ao uso de fonte de combustíveis fósseis, que prejudicam o meio ambiente durante sua queima, eliminando poluentes e contribuindo para o efeito estufa (Brasil, 2017).

Quanto ao manejo da cultura, estratégias como a incorporação da palhada para diminuir fonte de inóculo de fungos fitopatogênicos, utilização de controle biológico, como por exemplo a vespa parasitária *Cotesia flavipes* (Hymenoptera, Braconidae) para controlar a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*, e utilização de agroquímicos, visam controlar e/ou minimizar as perdas ocasionadas por pragas e doenças.

A cultura apresenta grande importância econômica para o Brasil, tanto na produção de energia e exportação de açúcar e etanol, quanto na geração de empregos e produtos, como a cachaça (FAO, 2019; CONAB, 2022). Com o desenvolvimento de tecnologias voltadas ao setor sucroalcooleiro, como máquinas, implementos e insumos, o aumento da base de conhecimento a respeito da cultura deve ser valorizado e continuamente ampliada abrangendo as diversas áreas e contextos do setor.

2.2 Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*

Considerado o oitavo gênero de fungo mais importante na área científica e responsável por elevados prejuízos econômicos, o gênero *Colletotrichum* apresenta uma grande diversidade de espécies que causam de doenças em plantas cultivadas, comumente conhecidas como antracnoses (Dean et al., 2012). Dessa forma, abrange desde doenças em gramíneas até leguminosas e frutíferas. Por exemplo, *C. truncatum* na cultura da soja (*Glycine max*), *C. lindemuthianum* na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), *C. gloeosporioides* e *C. musae* na cultura da banana (*Musa* spp.). Esses patógenos levam a perdas de produtividade das lavouras e afetam a qualidade dos produtos a serem comercializados (Bouffleur et al., 2021; Talhinhos & Baroncelli., 2021; Nabi et al., 2022).

O fenótipo da fase assexuada das espécies caracteriza-se pela produção de acérvulos, apressórios, setas e conídios de formato variável, enquanto na fase sexuada, conhecida com o nome *Glomerella*, há produção de peritécios de coloração azulada a preto (Politis, 1975; Vaillancourt & Hanau, 1992; Carvajal & Edgerton, 1993). Numa abordagem moderna, o gênero é dividido em 15 complexos de espécies baseado em características morfológicas e filogenia molecular, usando análises de sequências de regiões gênicas *barcode* como Actina (*ACT*), β -tubulina (*TUB2*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), Calmodulina (*CAL*), genes mat (*ApMAT*), glutamina sintetase (*GS*), quitina sintase (*CHS-1*), histona 3 (*HIS3*), manganês-superóxido dismutase (*SOD2*), DNA liase (*APN2*) e da região interna espaçadora (*ITS*) (Hyde et al., 2010; Cannon et al. 2012; Bhunjun et al. 2021; Talhinhos & Baroncelli, 2021).

O Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC) representa um grupo monofilético, que se caracterizam pela produção de conídios falcados, e cujas espécies mostram preferência para gramíneas onde causam doença, com destaque para os patógenos *C. graminicola* na cultura do milho (*Zea mays*), *C. sublineola* na cultura do sorgo (*Sorghum* spp.) e *C. falcatum* na cultura da cana-de-açúcar, que levam a perdas econômicas no campo (Crouch et al., 2009a; Cannon et al., 2012; Talhinhos & Baroncelli, 2021). Tal complexo é atualmente composto por 19 espécies, sendo três descritas recentemente no Irã, *C. sacchari*, *C. caspicum* e *C. persicum* (Alizadeh et al., 2022).

2.3 Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

O complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC) possui atualmente mais de 60 espécies filogenéticas, sendo algumas de grande relevância para a agricultura, como causadoras de doenças em plantas, quanto na área médica, como patógenos em humanos (Yilmaz et al.; 2021). Como características morfológicas são frequentemente compartilhadas entre as espécies, apenas a análise de filogenia molecular, baseada nos genes *barcode* como fator de alongação 1- α (*EF-1*), segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*Rpb2*), β -tubulina (*TUB2*) e Calmodulina (*CAL*), permitem a correta identificação (O'Donnell et al., 1998; Leslie & Summerell, 2006; Yilmaz et al., 2021). Muitas dessas espécies podem produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários altamente tóxicos a vertebrados (Janevska & Tudzynski, 2018).

As espécies do FFSC que causam doença na cultura da cana-de-açúcar são *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense*. Esses patógenos já foram isolados e identificados de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de “*Pokkah boeng*” no Brasil, e recentemente em colmos com sintomas de podridão vermelha (Costa et al., 2019; 2021; 2022; Ezekiel et al., 2020). A associação de *F. sacchari* e *F. proliferatum* em colmos e folhas de cana-de-açúcar com sintomas da podridão vermelha foi documentada também nas Filipinas (Dela Cueva et al., 2019).

2.4 Podridão Vermelha da Cana-de-açúcar

O agente etiológico da podridão vermelha é conhecido como *Colletotrichum falcatum* Went, fungo que foi descrito pela primeira vez em Java na Indonésia e posteriormente relatado nos Estados Unidos, Índia, Paquistão e, mais recentemente, no Brasil (Edgeton et al., 1910; Prihastuti et al., 2010; Costa et al., 2021; Marins et al., 2022). É membro do complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC), que reúne várias espécies com afinidade por gramíneas (Crouch et al., 2009a; Cannon et al., 2012; Talhinhos & Baroncelli, 2021). Na fase assexuada de *C. falcatum* há a produção de acérvulos, apressórios, setas e conídios de formatos falcados variáveis. A fase sexuada, que já foi observada em campo e recebe o nome *Glomerella tucumanensis*, é caracterizada pela produção de peritécios de coloração azulada a preto (Carvajal & Edgerton, 1943; Politis, 1975; Vaillancourt & Hanau, 1992). No entanto, não há evidências recentes da observação dessa fase sexuada ocorrendo no campo. Outras espécies estão associadas aos sintomas de podridão vermelha, como espécies do FFSC, *C. plurivorum* e *C. siamense*, que foram recentemente relatadas ocorrendo no Brasil (Costa et al., 2021; Marins

et.al., 2022). Nas Filipinas, foi documentado apenas espécies do FFSC (Dela Cueva et al., 2019).

O fungo pode estar presente em materiais propagativos, ou infectar a planta de cana através de aberturas naturais, ferimentos ocasionados por mau manuseio dos toletes no momento do plantio, como também os causados pela broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae), levando ao chamado complexo broca - podridão. Assim, perdas diretas e indiretas ocorrem na cultura, provocadas pela lagarta e pelo fungo, respectivamente (Peñaflor & Bento, 2019). As plantas com sintomas da podridão vermelha apresentam podridão interna avermelhada com presença de bandas brancas transversais e coloração vermelha na nervura central das folhas. O fungo também promove a inversão da sacarose, diminuindo a ATR e conseqüentemente contribuindo para perdas qualitativas e quantitativas na cultura (Crouch et al., 2009a; Prihastuti et al., 2010; Viswanathan, 2021).

REFERÊNCIAS

- Alizadeh A, Javan-Nikkhah, Nourmohammadi Nazarian R, Liu F, Zare R, Fotouhifar KB, Stukenbrock EH, Damm U (2022) New species of *Colletotrichum* from wild Poaceae and Cyperaceae plants in Iran. *Mycologia* 114: 89-113.
- BRASIL. Decreto nº 13.576, de 27 de dez de 2017. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e da outras providências, Brasília, DF, dez 2017.
- Bhunjun CS, Phukhamsakda C, Jayawardena RS, Jeewon R, Promputtha I, Hyde KD (2021) Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 107: 107-127.
- Bouffleur TR, Ciampi-Guillardi M, Tikami Í, Rogério F, Thon MR, Sukno SA, Júnior NSM, Baroncelli R (2021) Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. *Molecular Plant Pathology* 22: 393–409.
- Carvajal F, Edgerton CW (1943) The perfect state of *Colletotrichum falcatum*. *Phytopathology* 34: 206-214.
- Conab (2022) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar, v.9, Safra 2022/23, n.2, Segundo levantamento, Brasília, p.1-58.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Costa MM, Melo MP, Guimarães EA, Veiga CMO, Costa SS, Sandin FC, Moreira GM, Pfenning LH (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with pokkah boeng of sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 68: 1350-1360.
- Costa MM, Silva BAAS, Moreira GM, Pfenning LH (2021) *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 70:1807-1818.
- Costa MM, Saleh AA, Melo MP, Guimarães EA, Esole P, Zeller KA, Summerell BA, Pfenning LH, Leslie JF (2022) *Fusarium mirum* sp. nov, intertwining *Fusarium madaense* and *Fusarium andiyazi*, pathogens of tropical grasses. *Fungal Biology* 126: 250-266.
- Crouch JA, Beirn LA (2009) Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009a) Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm-season grasses. *Mycologia* 101: 717-732.
- Crouch JA, Tredway LP, Clarke BB, Hillman BI (2009b) Phylogenetic and population genetic divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. *Molecular Ecology* 18: 123–135.
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009c) What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101: 648-656.

Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430.

Dela Cueva F, De Torres R, De Castro A, Mendoza J, Belendres MA (2019) Susceptibility of sugarcane to red rot caused by two *Fusarium* species and its impact on stalk sugar level. *Journal Plant Pathology* 101: 639-646.

Edgerton CW (1910) *Colletotrichum falcatum* in the United States. *Science* 31: 717–718.

Ezekiel CN, Kraak B, Sandoval-Denis M, Sulyok M, Oyedele OA, Ayeni KI, Makinde OM, Akinyemi OM, Krska R, Crous PW, Houbraken J (2020) Diversity and toxigenicity of fungi and description of *Fusarium madaense* sp. nov. from cereals, legumes and soils in north-central Nigeria. *Mycology* 67: 95–124.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019.

Janevska S, Tudzynski B (2018) Secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*: strategies to unravel the function of biosynthetic pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 615-630.

Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U, Goodwin PH, Chen H, Johnston PR, Jones EBG, Liu ZY, McKenzie EHC, Moriwaki J, Noireung P, Pennycook SR, Pfenning LH, Prihastuti H, Sato T, Shivas RG, Tan YP, Taylor PWJ, Weir BS, Yang YL, Zhang JZ (2010) *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell Publishers.

Marins EFC, Da Silva MJDS, Da Silva JL, Silva-Cabral JRA, Jaqueline FDO, Feijó FM, Assunção IP, Gaus SDA (2022) *Colletotrichum* species associated with sugarcane red rot in Brazil. *Fungal Biology* 126:290-299.

Nabi A, Lateef L, Nisa Q, Banoo A, Rasool RS, Shah MD, Ahmad M, Padder BA (2022) *Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem in the post-genomic era: an update. *Current Microbiology* 79: 36.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy Science* 95:2044-2049.

Peñaflor MFGV, Bento JMS (2019) Red-rot infection in sugarcane attenuates the attractiveness of sugarcane borer-induced plant volatiles to parasitoid. *Arthropod-Plant Interactions* 13:117–125.

Politis DJ (1975) The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* 67: 56-62.

- Prihastuti H, Cai L, Crouch JA, Phoulivong S, Moslem MA, McKenzie EHC, Hyde KD (2010) Neotypification of *Colletotrichum falcatum*, the causative agent of red-rot disease in sugarcane. *Sydowia* 62: 283-293.
- Sharpe P (1998) Sugar Cane: Past and Present. *Ethnobotanical Leaflets*: Iss. 3.
- Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi AR, Salleh B (2008) Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Sciences* 31: 279-286.
- Talhinhas P, Baroncelli R (2021) *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity* 110:109-198.
- Vaillancourt LJ, Hanau RM (1992) Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology* 16: 219-229.
- Viswanathan R, Poongothai M, Malathi P, Sundar AR (2012) Sugarcane Wilt: New Insights into Pathogen Identity, Variability and Pathogenicity.
- Viswanathan R (2020) *Fusarium* diseases affecting sugarcane production in India. *Indian Phytopathology* 73: 415-424.
- Viswanathan R (2021) Red rot of sugarcane (*Colletotrichum falcatum* Went). *CAB Reviews* 16: 023.
- Yilmaz N, Sandoval-Denis M, Lombard L, Visagie CM, Wingfield BD, Crous PW (2021) Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia* 46: 129–162.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Espécies de *Colletotrichum* e *Fusarium* associadas a sintomas da podridão vermelha da cana-de-açúcar

Bárbara A. A. S. Silva ¹, Marileide M. Costa ^{1,2}, Ludwig H. Pfenning ^{1*}

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Lavras MG, Brasil.

²present address: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands.

* Autor para correspondência: Ludwig H. Pfenning, e-mail: ludwig@ufla.br

Manuscrito preparado de acordo com as normas da revista *Tropical Plant Pathology*.

RESUMO

Entre as doenças fúngicas que podem trazer prejuízos ao setor canavieiro, observa-se a podridão vermelha, que tem como principal agente causal *Colletotrichum falcatum*, induzindo sintomas de podridão no interior do colmo e coloração vermelha na nervura central de folhas da cana-de-açúcar. Outra doença, conhecida como ‘*Pokkah boeng*’, é induzida por espécies do complexo *Fusarium fujikuroi*. Resultados publicados recentemente evidenciam que *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* estão associadas a plantas com sintomas da podridão vermelha e que os sintomas, às vezes, podem se sobrepor aos da ‘*Pokkah boeng*’. Os objetivos desse trabalho foram: (i.) esclarecer se ocorre mais de uma espécie de *Colletotrichum* em plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha; (ii.) qual é o efeito da coinfeção de *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* no desenvolvimento dos sintomas da podridão vermelha; e (iii.) se espécies de *Fusarium* podem causar coloração vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar. Foi coletado material vegetal sintomático das regiões canavieiras de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco em 2021, e os isolados obtidos foram identificados por meio de avaliação de seus marcadores morfológicos, análises de filogenia molecular utilizando sequências das regiões gênicas *barcode TEF*, *ITS*, *ACT* e *GAPDH* e testes de patogenicidade. Fazemos o primeiro registro no Brasil das espécies *F. madaense*, *F. sacchari* e *F. verticillioides*, causando sintomas de podridão vermelha em folhas de cana-de-açúcar. Foram identificadas ainda uma supostamente nova espécie de *Colletotrichum* e *F. fredkrugeri*, ocorrendo em associação com a cana-de-açúcar. Colmos inoculados com *F. sacchari*, *C. falcatum* e a combinação de ambos desenvolveram sintomas severos. Quando inoculados em folhas, *F. madaense* e *C. falcatum* induziram sintomas de maior comprimento na nervura central em comparação às demais espécies inoculadas. Em conclusão, ocorrem várias espécies causando podridão vermelha nos canaviais. Espécies de *Fusarium* também induzem sintomas de

coloração vermelha na nervura central folhas de cana-de-açúcar, e a associação de *Fusarium* e *C. falcatum* resulta no desenvolvimento de sintomas mais severos em colmos. Estes resultados permitirão a diagnose correta dos agentes etiológicos da podridão vermelha e podem dar suporte a programas de melhoramento genético e de formulação de estratégias de manejo, como a recomendação de produtos biológicos e fungicidas adequados.

Palavras-chave: Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*. Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Doença de plantas. Filogenia molecular. *Saccharum* spp.

ABSTRACT

Red rot of sugarcane is one of the important fungal diseases which can result in losses of yield and quality. The causal agent is known as *Colletotrichum falcatum*, inducing symptoms of rot inside the stem and reddish lesions along the central part of the leaves. Another fungal disease, “*Pokkah boeng*”, is caused by species of the *Fusarium fujikuroi* species complex FFSC. Recently published results show that *C. falcatum* as well as *Fusarium* species are associated with symptoms of red rot and that symptoms sometimes overlap with those of “*Pokkah boeng*”. The objectives of this study were (i.) to verify if there is more than a single species of *Colletotrichum* associated with sugar cane plants with symptoms of red rot; (ii.) to evaluate the effect of coinfection with *C. falcatum* and *Fusarium* species on the evolution of symptoms of red rot; (iii.) to verify if also *Fusarium* species are able to induce reddish lesions along the central part of the leaves. Symptomatic plant material was collected in the states of Minas Gerais, São Paulo and Pernambuco in 2021, and the obtained isolates were identified by evaluation of morphological markers and molecular phylogenetic analyses of the barcode gene regions *TEF*, *ITS*, *ACT* and *GAPDH*. Pathogenicity of selected strains was tested by inoculation in stems and leaves. *Fusarium madaense*, *F. sacchari* and *F. verticillioides* are reported for the first time in Brazil inducing symptoms of red rot in leaves of sugarcane. A supposedly new species of *Colletotrichum* was identified in association with sugarcane, together with *F. fredkrugeri*, another member of the FFSC. Stems inoculated with *F. sacchari*, *C. falcatum*, and the combination of both, developed severe symptoms. When inoculated in leaves, *F. madaense* and *C. falcatum* induced longer lesions on the central part of the leaves compared with the other species. In conclusion, several species can cause red rot in sugarcane in Brazil. Also, *Fusarium* species induce symptoms of red lesions on the central part of the leaves and the association of *Fusarium* and *C. falcatum* result in the development of more severe symptoms on stems. These findings will permit the correct diagnosis of the causal agents of sugarcane red rot, and give support to breeding programs and the elaboration of adequate strategies for disease management, including the recommendation of biological and chemical products for disease control.

KeyWords: *Colletotrichum graminicola* species complex. *Fusarium fujikuroi* species complex. Plant disease. Molecular phylogeny. *Saccharum* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala Diagramática proposta por Giglioti & Canteri (1998), para avaliação da severidade do complexo broca-podridões em entrenós de cana-de-açúcar.

Figura 2. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP), inferida a partir de fragmentos do gene EF-1 α mostrando a relação filogenética de *Fusarium* associado à podridão vermelha da cana-de-açúcar com outras espécies dentro do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo são indicados com T.

Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos de genes ITS mostrando a relação filogenética de *Colletotrichum* associado à podridão vermelha em cana-de-açúcar com outras espécies do complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipos indicadas com T e ET, respectivamente.

Figura 4. Teste de patogenicidade de inserção de plugue de micélio em folhas seccionadas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. Folhas inoculadas com as seguintes espécies. **a**, testemunha; **b**, *F. madaense*; **c**, *F. sacchari*; **d**, *F. proliferatum*; **e**, *C. falcatum*; **f**, *Colletotrichum* sp.; **g**, *F. fredkrugeri*; **h**, acérvulos produzidos por *C. falcatum* na nervura central; **i**, micélio aéreo produzido por *F. madaense* na nervura central.

Figura 5. Histograma das médias de dimensão do sintoma (comprimento e largura) com as barras de desvio-padrão, do teste de patogenicidade de inoculação de disco de micélio com esporulação do fungo na nervura central de folhas seccionadas, inoculadas com as seguintes espécies: **1**, testemunha; **2**, *F. madaense*; **3**, *F. sacchari*; **4**, *F. proliferatum*; **5**, *C. falcatum*; **6**, *Colletotrichum* sp.; **7**, *F. fredkrugeri*.

Figura 6. Comparação de alguns tratamentos do teste de patogenicidade de inserção de plugue de micélio em colmos seccionados de cana-de-açúcar da variedade RB867515. Colmos inoculados com as seguintes espécies: **a**, testemunha; **b**, *F. sacchari*; **c**, *C. falcatum*; **d**, *F. sacchari* e *C. falcatum*; **e**, *F. proliferatum*; **f**, *Colletotrichum* sp.; **g**, *F. fredkrugeri*.

Figura 7. Histograma das médias de severidade com as barras de desvio-padrão, do teste de patogenicidade de inserção de plugue de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados e inoculados com as seguintes espécies: **1**, testemunha; **2**, *F. madaense*; **3**, *F. sacchari*; **4**, *F. proliferatum*; **5**, *C. falcatum*; **6**, *F. madaense* e *C. falcatum*; **7**, *F. sacchari* e *C. falcatum*; **8**, *F. proliferatum* e *C. falcatum*; **9**, *F. fredkrugeri*; **10**, *Colletotrichum* sp.

Figura 8. Material sintomático de cana-de-açúcar recebido dos Estados de MG, SP e PE. **a-b**, colmos seccionados de uma mesma planta de MG, no qual foi obtido *F. sacchari*; **c**, exsudação de coloração preta e formato espiralado contendo conídios de *Phaeocystostroma sacchari*, na superfície do colmo de MG; **d**, colmo de SP, no qual foi obtido *F. fredkrugeri*; **e**, placa de petri oriunda de isolamento do colmo de MG, contendo *P. sacchari* (lado esquerdo) e *C. falcatum* (lado direito); **f**, colmos de PE; **g**, folha sintomática com micélio aéreo de *Fusarium* spp.

Figura 9. *Fusarium fredkrugeri*. **a-b**, Fotografias de colônias em meio BDA; **c-d**, Fotomicrografia de fiálides formadas no micélio aéreo, Barra = 20 μ ; **e**, macroconídios, Barra = 20 μ ; **f**, macro e microconídios, Barra = 20 μ .

LISTA DE TABELAS E NOTAS DE RODAPÉ

Tabela 1. Isolados do complexo *Colletotrichum graminicola* CGSC obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco.

^a Código de trabalho: BS – Bárbara Silva.

^b CML: Coleção Micológica de Lavras.

^c Estados Brasileiros: SP - São Paulo, MG - Minas Gerais, PE – Pernambuco, PR – Paraná.

^d ITS =Região Espaçadora Transcrita Interna, ^eACT= Actina, ^f GAPDH= Gene da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase.

^gX= DNA extraído e mandado para sequenciar.

*Isolados usados nos testes de patogenicidade.

Tabela 2. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco.

^a Código de trabalho: BS – Bárbara Silva.

^b CML: Coleção Micológica de Lavras.

^c Estados Brasileiros: SP - São Paulo, MG - Minas Gerais, PE – Pernambuco, PR – Paraná.

^d*EF-1 α* = translation elongation factor 1- α gene.

*Isolados usados nos testes de patogenicidade.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar de acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO (2019). A cultura é destinada a produção de açúcar, etanol e bioenergia, que atendem tanto ao mercado interno quanto externo (CONAB, 2022). No território brasileiro estão presentes instituições públicas e privadas, como o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e Rede Interuniversitária Para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), que desenvolvem variedades de cana-de-açúcar, desde resistentes a pragas e doenças, a variedades que permitem maior potencial produtivo da cultura, trabalhando seus aspectos fisiológicos. Assim, os estudos relacionados às doenças de plantas que afetam a cultura se tornam uma grande necessidade para o setor.

A podridão vermelha da cana-de-açúcar, doença cujo agente etiológico conhecido é o fungo *Colletotrichum falcatum*, é responsável por perdas econômicas no setor sucroalcooleiro não só no Brasil, mas em outros países produtores da cultura, como por exemplo Índia e Estados Unidos (Abbott 1938; Siti et al., 2008; Viswanathan, 2020; Costa et al., 2021; Marins et al., 2022). O fungo pertence ao Complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC) e pode promover nos colmos de cana-de-açúcar a inversão da sacarose, que conseqüentemente diminui a qualidade do Açúcar Total Recuperável (ATR) (Cannon et al., 2012; Viswanathan, 2021; Talhinhos & Baroncelli, 2021).

Plantas com sintomas da podridão vermelha apresentam no colmo podridão interna avermelhada com presença de bandas brancas transversais e a nervura central das folhas com coloração vermelha. Durante a fase assexuada, o fungo é responsável pela produção de estruturas chamadas acérvulos, que podem ser encontradas nas superfícies das folhas e de colmos, como também de conídios falcados de formatos variáveis, setas e apressórios. A fase sexuada, que já foi relatada ocorrendo em campo, recebe o nome *Glomerella tucumanensis* e é caracterizada pela produção de peritécios de coloração azulada a preto (Carvajal & Edgerton, 1943; Politis, 1975; Vaillancourt & Hanau, 1992).

No Brasil, outros fungos foram relatados recentemente em associação aos sintomas da podridão vermelha nos estados de Minas Gerais e Paraná. As espécies identificadas por filogenia molecular pertencem ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), sendo elas *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense* (Costa et al., 2021). Em testes de patogenicidade, estas mesmas espécies induziram sintomas da doença em colmos de cana-de-açúcar, mas não

foi possível inferir a respeito da interação de *C. falcatum* e *Fusarium* spp. na indução dos sintomas da doença.

As espécies de *Fusarium* já citadas anteriormente são conhecidas por serem os agentes etiológicos da doença chamada ‘*Pokkah boeng*’, já identificada ocorrendo no Brasil e que traz perdas qualitativas e quantitativas para a cultura (Costa et al., 2019; 2022). Análises de filogenia molecular realizadas com isolados de *Colletotrichum* obtidos de cana-de-açúcar do Brasil e do Japão, mostraram que pelo menos uma outra espécie do CGSC, além de *C. falcatum*, está associada com sintomas de podridão vermelha (Crouch et al., 2009a; 2009b; 2009c; Prihastuti et al., 2010).

Tendo em vista a relevância do setor sucroalcooleiro e a carência de estudos a respeito destas doenças no Brasil, os objetivos deste trabalho foram responder às seguintes questões: (i.) ocorre mais de uma espécie de *Colletotrichum* em plantas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha? (ii.) Qual é o efeito da coinfeção de *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* no desenvolvimento dos sintomas da podridão vermelha? (iii.) espécies de *Fusarium* podem causar coloração vermelha na nervura central de folhas de cana-de-açúcar?

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de isolados e preservação

Amostras de colmo e folhas de cana-de-açúcar, com sintomas de podridão vermelha, foram coletadas em regiões produtoras dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco durante o ano de 2021 (Tabelas 1 e 2). As amostras foram examinadas para verificar a presença de estruturas de *Fusarium* e/ou *Colletotrichum* para isolamento direto, por meio de transferência de estruturas para placas de Petri contendo meio de extrato de malte 2% (MA 2%). Na ausência de estruturas, fragmentos das amostras foram desinfetados em Álcool 70% por 30 segundos, em Hipoclorito de Sódio 1% por 1 minuto e 30 segundos e enxaguados três vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente, os fragmentos foram secos em papel filtro autoclavado e plaqueados em meio MA 2% com estreptomicina. Após quatro dias, as colônias foram avaliadas e os isolados obtidos transferidos em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Culturas monospóricas dos isolados foram obtidas e preservadas em microtubos com água destilada autoclavada e armazenadas a 10°C no escuro, e criopreservadas em suspensão de esporos com 15% glicerina a -80 °C, na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia (LSEF), Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de

Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil. Folhas e colmos de plantas sintomáticas foram fotografados e os sintomas documentados, para fazer uma correlação dos sintomas observados com o fungo isolado. Foi tomada nota também da presença ou não dos orifícios provocados pela broca da cana-de-açúcar.

2.2 Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum*

A caracterização morfológica para os isolados de *Colletotrichum* foi realizada da seguinte maneira: isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em BOD a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12h. Após cinco dias de crescimento da colônia, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados da periferia da colônia e depositados no centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA e MA 2% e incubados em BOD a 25 °C por 10 dias. Foram utilizadas três repetições para cada isolado. As características avaliadas em meio BDA foram: taxa decrescimento micelial (TCM), cor da colônia, presença de esporodóquio, de setas e formação de micélio aéreo. A TCM foi avaliada medindo diariamente o diâmetro das colônias no eixo X e no eixo Y, com o auxílio de uma régua milimetrada durante o período de seis dias, e posteriormente realizado o cálculo das taxas médias de crescimento das colônias em mm/dia. A coloração das colônias foi avaliada no último dia de avaliação da TCM no meio MA 2%, as estruturas micromorfológicas avaliadas foram: tamanhos e formatos de conídios e fiálides. Foram tomadas 30 medições de cada estrutura para comparação com descrições na literatura (Cai et al., 2009; Crouch et al., 2009a).

2.3 Caracterização morfológica de isolados de *Fusarium*

A caracterização morfológica de isolados de *Fusarium* foi realizada seguindo o protocolo proposto por Leslie & Summerell (2006). Isolados monospóricos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubados em BOD a 25 °C no escuro, por 4 dias para avaliação da TCM, e após 10 dias para avaliação de coloração da colônia. Para avaliação micromorfológica, os isolados monospóricos foram cultivados em *Synthetic Nutrient-poor Ágar* (SNA) a 20 °C, sob fotoperíodo com luz branca fluorescente, por um período de 10 a 14 dias de incubação. As estruturas micromorfológicas avaliadas foram: tamanho, formato, origem de macroconídios e microconídios, tipos de fiálides, presença de clamidósporos e produção de microconídios em cadeias ou falsas cabeças. Para indução de esporulação dos isolados, folhas de cravo (*Dianthus caryophyllu* L.) estéreis foram colocadas junto ao meio

SNA plaqueado. Foram tomadas medições de 30 estruturas vegetativas e reprodutivas, para cada isolado, para comparação com descrições na literatura.

2.4 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Os fungos foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% por três dias em temperatura ambiente e sob agitação de 100 rpm em agitador de mesa orbital. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA extraído pelo método CTAB, de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído teve sua concentração determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Para os isolados de *Colletotrichum*, as sequências de DNA foram geradas para a região espaçadora transcrita interna (*ITS*), gene da actina (*ACT*) e gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). As condições de ciclo para a região *ITS* foram de 1 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 40 s a 94 °C, 55 s a 55 °C e 2 min a 72 °C, e uma etapa final de 5 min a 72 °C; para *ACT*, 95 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, e uma extensão a 72 °C por 7 min; e para a *GAPDH*, 94 °C por 4 min, seguido por 34 ciclos de 94 °C por 45 s, 60 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, e uma extensão a 72 °C por 10 min. As reações de PCR foram realizadas no termociclador My Cycler TM (BIO-RAD).

As reações para os isolados de *Fusarium* foram realizadas de acordo com O'Donnell et al. (1998) para fator de alongação *1α* (*EF-1α*). Os seguintes pares de *primers* foram utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento: *EF-1α*: Ef - 1 (5'- ATGGGTAAGGAGGACAAGAC - 3') e Ef - 2 (5'- GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa Psomagen, USA, utilizando os mesmos *primers* usados nas PCR_s.

2.5 Análises filogenéticas

Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa SeqAssem® (Hepperle, 2004) e as sequências editadas comparadas com a base de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information - NCBI, por meio da ferramenta BLAST. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando-se

a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994), implementada pelo programa MEGA X (Kumar et al., 2018). Sequências de referência previamente depositadas no GenBank foram adicionados aos alinhamentos. As análises filogenéticas foram realizadas no software MEGA X com 1000 replicações de bootstrap utilizando o método de máxima parcimônia (MP) para cada partição de gene e para conjunto de dados concatenados.

2.6 Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, da Universidade Federal de Lavras, UFLA, utilizando a variedade de cana-de-açúcar RB867515 com aproximadamente 12 meses de idade, oriunda do campo, no município de Lavras. Dois métodos de inoculação foram utilizados: 1- inoculação de disco de micélio com esporulação do fungo na nervura central de folhas seccionadas 0, 1, +1 e +2 (Sistema Kuijper); e 2 - inserção de disco de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados. Para obtenção do inóculo, o isolado de *C. falcatum* foi cultivado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com meio de cultura BDA, e os isolados das espécies de *Fusarium*, em placas de Petri de 90 mm de diâmetro em meio de cultura SNA. As placas foram mantidas por 15 dias sob temperatura de 25 °C no escuro.

O primeiro método foi utilizado para verificar os sintomas da podridão vermelha induzidos em folhas em laboratório, por espécies de *Fusarium* (responder à questão iii.). Foi feita inoculação em seis folhas seccionadas com 10 cm de comprimento, com dois ferimentos realizados na nervura central das folhas utilizando agulha esterilizada e posteriormente sendo depositados os discos de micélio sobre tais ferimentos. As folhas foram colocadas em placas de Petri de 150 mm forradas com papel filtro para garantir umidade e ficaram dispostas em bancadas. Foram utilizados dois discos de micélio para cada folha, e foi feita avaliação e medição da lesão utilizando uma régua milimetrada, 7 dias após inoculação. Os tratamentos utilizados foram: Tratamento 1: Testemunha; Tratamento 2: *F. madaense*; Tratamento 3: *F. sacchari*; Tratamento 4: *F. proliferatum*; Tratamento 5: *C. falcatum*, Tratamento 6: *Colletotrichum* sp.; e Tratamento 7: *F. fredkrugeri* (Dela Cueva et al., 2019; Marins et al., 2022).

E o segundo método foi utilizado para reproduzir o sintoma de podridão no colmo em laboratório, e avaliar se os sintomas são mais severos quando a interação entre as espécies dos dois gêneros, *Colletotrichum* e *Fusarium* (responder à questão ii). Foi feita a inserção de discos de micélio no interior de colmos de canas-de-açúcar com 30 cm de comprimento, a partir de

aberturas feitas com a ferramenta chamada furador de rolhas. Os colmos seccionados e inoculados em laboratório foram colocados em bandejas dispostas em banca das, e após 9 dias foram realizados cortes longitudinais dos colmos para observação de sintomas e comparados utilizado a escala de notas proposta por Giglioti & Canteri (1998) (Figura 1). Os tratamentos utilizados foram: Tratamento 1: Testemunha; Tratamento 2: *F. madaense*; Tratamento 3: *F. sacchari*; Tratamento 4: *F. proliferatum*; Tratamento 5: *C. falcatum*; Tratamento 6: *F. madaense* + *C. falcatum*; Tratamento 7: *F. sacchari* + *C. falcatum*; Tratamento 8: *F. proliferatum* + *C. falcatum*; Tratamento 9: *F. fredkrugeri*; e Tratamento 10: *Colletotrichum* sp. (Costa et al., 2021).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições por tratamento. Os resultados foram comparados com os documentados na literatura para as doenças podridão vermelha e “*Pokkah boeng*” (Abbott, 1938; Siti et al., 2008; Dela Cueva et al., 2019; Costa et al., 2019; 2021; Marins et al., 2022). Para cada método de inoculação, foi realizada a fotodocumentação dos sintomas observados. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio da utilização do Software R version 4.0.0 (Team, 2020). Para conclusão dos Postulados de Koch, foi feito reisolamento do material inoculado e identificação dos isolados através de seus marcadores morfológicos.

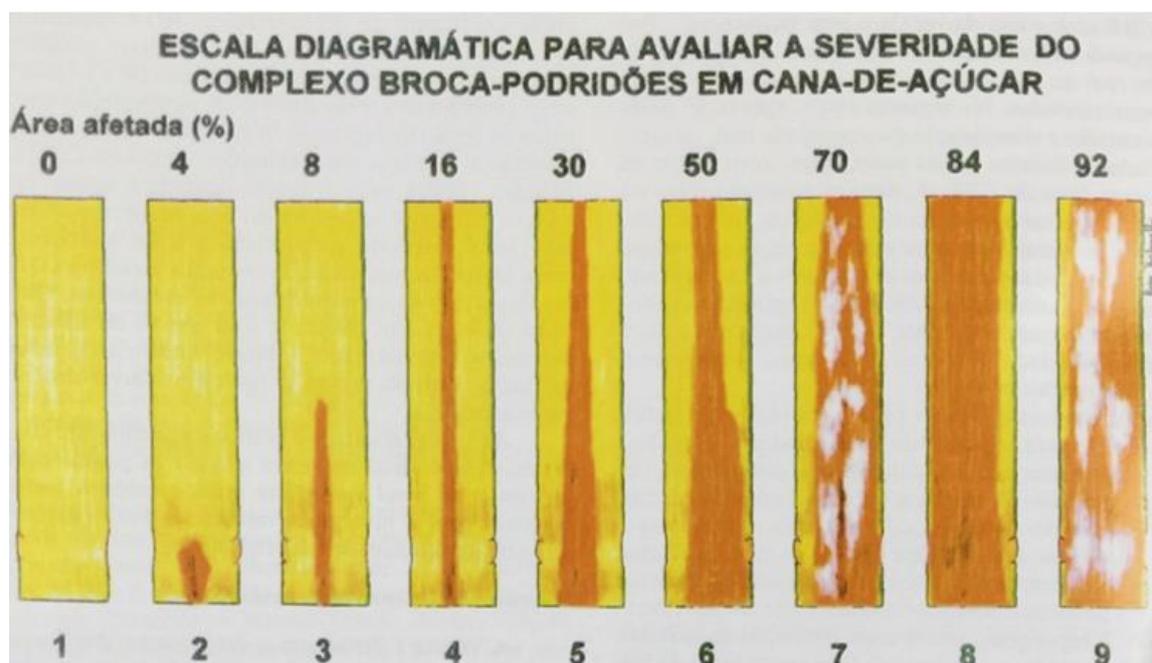


Figura 1. Escala Diagramática proposta por Giglioti & Canteri (1998), para avaliação da severidade do complexo broca-podridões em entrenós de cana-de-açúcar.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação de isolados por filogenia molecular e marcadores morfológicos

Os isolados obtidos de plantas de cana-de-açúcar sintomáticas dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco, foram inicialmente agrupados através da identificação de seus marcadores morfológicos, e posteriormente por filogenia molecular. As espécies identificadas foram: *Colletotrichum falcatum* (n=6), *Colletotrichum* sp. (n=1), *Fusarium madaense* (n=4), *F. sacchari* (n=4), *F. proliferatum* (n=2), *F. verticillioides* (n=1) e *F. fredkrugeri* (n=1). Isolados obtidos nos anos de 2017 e 2018 dos estados do Paraná e Minas Gerais, foram adicionados nas tabelas 1 e 2.

Nas análises filogenéticas para as espécies de *Fusarium* a partir do gene barcode *TEF*, os 12 isolados obtidos se agruparam no mesmo clado que as espécies de referência do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*, sendo *F. andiazi*, *F. sacchari*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides* e *F. fredkrugeri* (Figura 2). Na caracterização morfológica, os isolados apresentaram características semelhantes às descritas na literatura, sendo marcadores morfológicos de *F. madaense* longas cadeias de microconídios produzidos a partir de monofiálides, de *F. sacchari* microconídios produzidos a partir de polifiálides, de *F. proliferatum* cadeias curtas e médias de microconídios produzidas em mono e polifiálides e de *F. fredkrugeri* a produção de conídios em falsas cabeças a partir de monofiálides.

Nas análises filogenéticas para as espécies de *Colletotrichum* a partir do gene barcode *ITS*, seis isolados se agruparam junto com isolados de referência de *Colletotrichum falcatum* e um isolado no mesmo clado que *Colletotrichum* sp. (Figura 3). E na caracterização morfológica em meio BDA, os isolados de *C. falcatum* apresentaram coloração variando em creme, cinza claro e branco. A taxa de crescimento das culturas foi de 1,0 a 1,8 cm por dia, colonizando todo diâmetro da placa em uma semana de incubação. Os conídios apresentaram formato falcado, hialinos e sem septos, com comprimento médio e largura variando de 12,5-35 e 2,5-5 μm , respectivamente. Em meio malte 2% os isolados de *C. falcatum* apresentaram coloração variando de cinza claro a branco. A taxa de crescimento das culturas foi de 0,8 a 1,4 cm por dia e houve a produção de esporodóquio de coloração alaranjada. Os conídios apresentaram formato falcado, hialinos e sem septos, com comprimento médio e largura variando de 15-32,5 e 2,5-5 μm , respectivamente.

Tabela 1. Isolados do complexo *Colletotrichum graminicola* CGSC obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco.

Código de trabalho	Espécie	Origem Geográfica	Substrato	Variedade	Nº de Acesso ao GenBank		
					ITS ^d	ACT ^e	GAPDH ^f
CML 3861* ^b	<i>C. falcatum</i>	Paranavaí PR ^c	Colmo	-	MW471108	MW455489	X ^g
CML 3855	<i>C. falcatum</i>	Paranavaí PR	Colmo	-	MW471107	MW455488	X
BS 19 ^a	<i>C. falcatum</i>	Taquaritinga SP	Folha	RB867515		X	X
BS 22	<i>C. falcatum</i>	Ijaci MG	Folha	RB002504		X	X
BS 28	<i>C. falcatum</i>	Carpina PE	Folha	RB92579		X	X
BS 48	<i>C. falcatum</i>	Amarají PE	Folha	SP78-4764		X	X
BS 65	<i>C. falcatum</i>	Nova Ponte MG	Colmo	CTC 2		X	X
BS 34	<i>C. falcatum</i>	Amarají PE	Folha	SP78-4764		X	X
BS 31*	<i>Colletotrichum</i> sp.	Carpina PE	Folha	RB92579		X	X

^a Código de trabalho: BS – Bárbara Silva.

^b CML: Coleção Micológica de Lavras.

^c Estados Brasileiros: SP - São Paulo, MG - Minas Gerais, PE – Pernambuco, PR – Paraná.

^d ITS =Região Espaçadora Transcrita Interna, ^eACT= Actina, ^fGAPDH= Gene da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase.

^gX= DNA extraído e mandado para sequenciar.

*Isolados usados nos testes de patogenicidade.

Tabela 2. Isolados do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco.

Código de trabalho	Espécie	Origem Geográfica	Substrato	Variedade	Nº de Acesso ao GenBank
					<i>EF-1α</i> ^d
BS 29 ^a	<i>F. verticillioides</i>	Carpina PE ^c	Folha	RB92579	
BS 9	<i>F. madaense</i>	Estado de São Paulo	Colmo	RB985476	
BS 8	<i>F. madaense</i>	Estado de São Paulo	Colmo	RB867515	
BS 42	<i>F. madaense</i>	Amarají PE	Folha	SP78-4764	
BS 51	<i>F. madaense</i>	Amarají PE	Colmo	SP78-4764	
CML 4118 ^{b*}	<i>F. madaense</i>	Delta, MG	Colmo	-	MW455467
BS 6	<i>F. proliferatum</i>	Estado de São Paulo	Colmo	RB855536	
BS 2*	<i>F. proliferatum</i>	Palmares Paulista SP	Colmo	CTC 2	
BS 4	<i>F. sacchari</i>	Palmares Paulista SP	Colmo	CTC 2	
BS 47	<i>F. sacchari</i>	Amarají PE	Folha	SP78-4764	
BS 55	<i>F. sacchari</i>	Capinópolis MG	Colmo	CTC 4	
BS 13	<i>F. sacchari</i>	Estado de São Paulo	Colmo	RB985476	
CML 4125*	<i>F. sacchari</i>	Paranavaí PR	Colmo	-	MW455479
BS 7*	<i>F. fredkrugeri</i>	Estado de São Paulo	Colmo	RB855536	

^a Código de trabalho: BS – Bárbara Silva.

^b CML: Coleção Micológica de Lavras.

^c Estados Brasileiros: SP - São Paulo, MG - Minas Gerais, PE – Pernambuco, PR – Paraná.

^d*EF-1 α* = translation elongation factor 1- α gene.

*Isolados usados nos testes de patogenicidade.

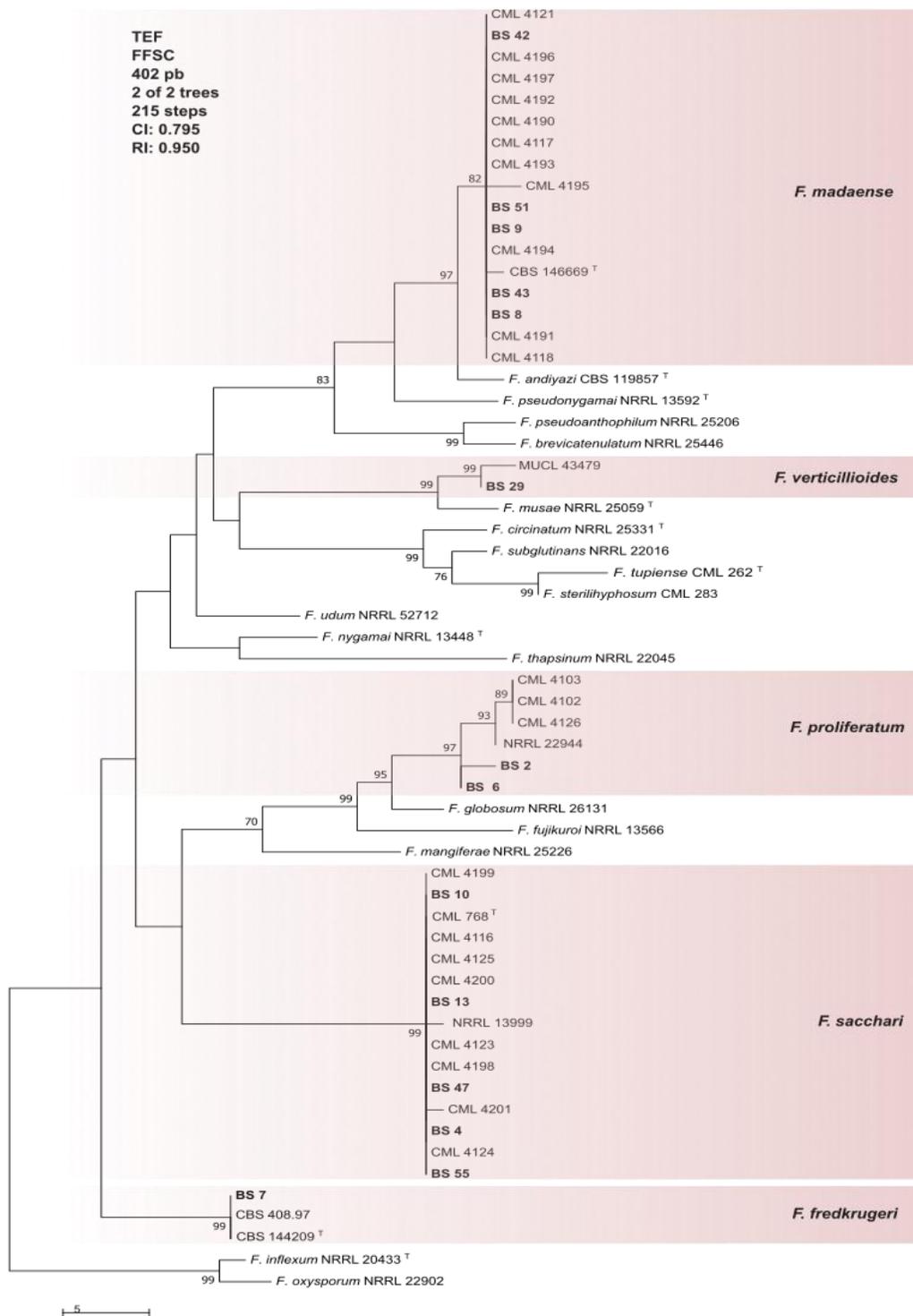


Figura 2. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP), inferida a partir de fragmentos do gene *EF-1a* mostrando a relação filogenética de *Fusarium* associado à podridão vermelha da cana-de-açúcar com outras espécies dentro do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo são indicados com T.

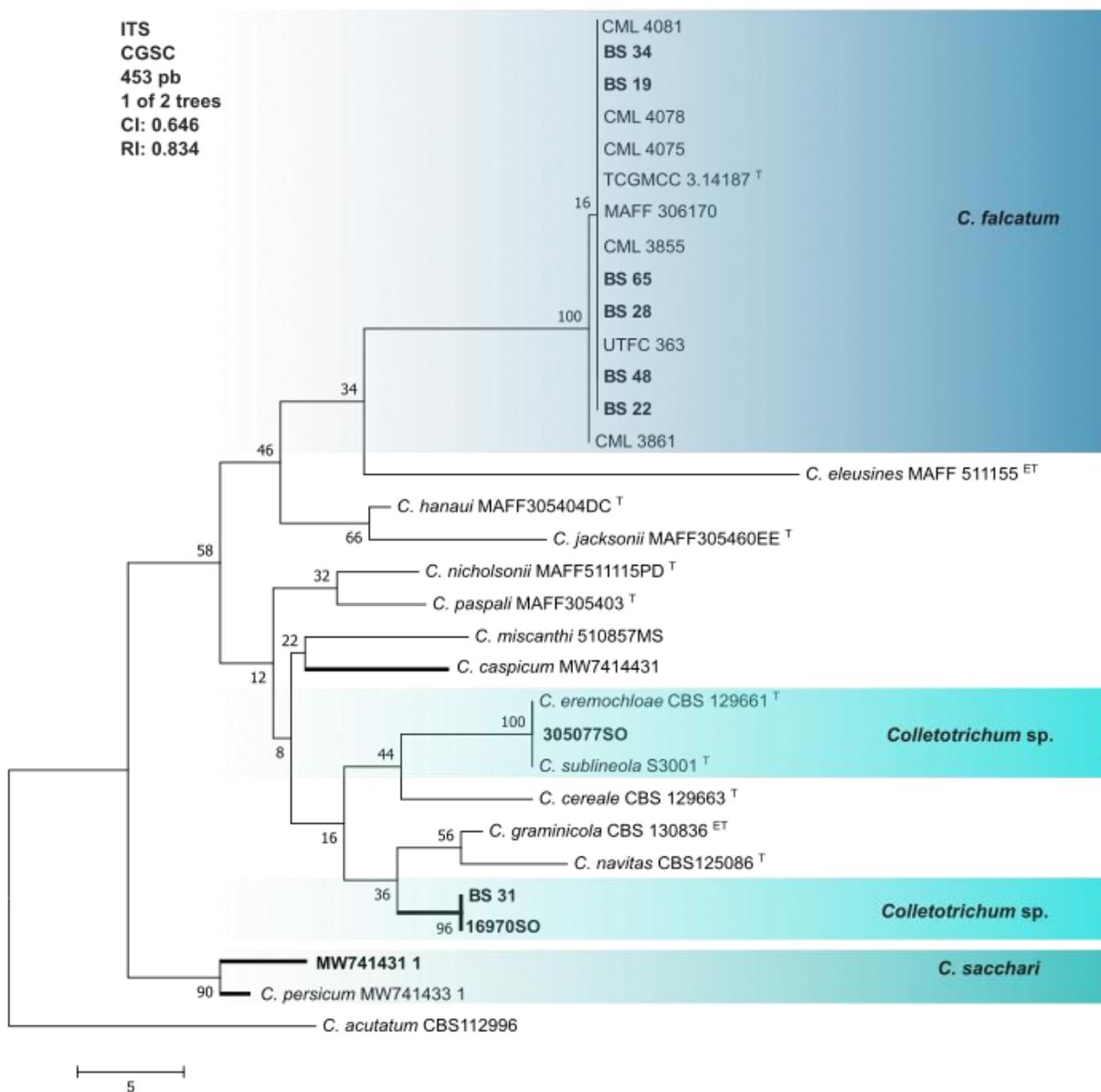


Figura 3. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos de genes *ITS* mostrando a relação filogenética de *Colletotrichum* associado à podridão vermelha em cana-de-açúcar com outras espécies do complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-ítipo são indicadas com T e ET, respectivamente.

3.2 Testes de Patogenicidade

No primeiro método de inoculação, no qual discos de micélio com esporulação do fungo foram inoculados na nervura central de folhas de cana-de-açúcar seccionadas, *C. falcatum* (tratamento 5) e os isolados de *Fusarium* (tratamentos 2, 3, 4 e 7) induziram sintoma de vermelhidão na nervura central das folhas (Figura 4), sendo *C. falcatum* (tratamento 5) e *F. madaense* (tratamento 2) as espécies que induziram lesões de maior comprimento, como pode ser visualizado no histograma da Figura 5. As folhas inoculadas com *Colletotrichum* sp. (tratamento 6) apresentaram coloração avermelhada no ponto do ferimento feito com a agulha esterilizada, não havendo desenvolvimento do sintoma como nas espécies citadas anteriormente, sendo possível visualizar a dimensão do sintoma no histograma da Figuras 5. Para concluir os postulados de Koch, fragmentos das folhas inoculadas foram desinfetados em Álcool 70% por 30 segundos, em Hipoclorito de Sódio 1% por 1 minuto e 30 segundos, enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada, e posteriormente dispostas em placas de Petri contendo meio MA 2% com antibiótico. A avaliação foi realizada após quatro dias, observando os marcadores morfológicos de cada espécie inoculada. Apenas *Colletotrichum* sp. não concluiu os postulados de Koch, pois não houve crescimento do fungo nos fragmentos reisolados.

No segundo método de inoculação, que consistiu na inserção de discos de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados, quando inoculados com *F. sacchari* (tratamento 3), *C. falcatum* (tratamento 5) e a combinação de ambos (tratamento 7), os mesmos apresentaram sintomas mais severos em relação aos colmos inoculados apenas com *F. madaense* (tratamento 2), combinação de *F. madaense* e *C. falcatum* (tratamento 6) e a combinação de *F. proliferatum* e *C. falcatum* (tratamento 8) (Figura 6). Os colmos inoculados com *F. proliferatum* (tratamento 4), *F. fredkrugeri* (tratamento 9) e *Colletotrichum* sp. (tratamento 10), não desenvolveram sintomas severos comparados as demais espécies citadas anteriormente, como pode ser visualizado no histograma da figura 7. Para concluir os postulados de Koch, fragmentos dos colmos inoculados foram desinfetados em Álcool 70% por 30 segundos, em Hipoclorito de Sódio 1% por 1 minuto e 30 segundos, enxaguadas três vezes em água destilada autoclavada, e posteriormente dispostos em placas de Petri contendo meio MA 2% com antibiótico. A avaliação foi realizada após quatro dias, observando os marcadores morfológicos de cada espécie inoculada.

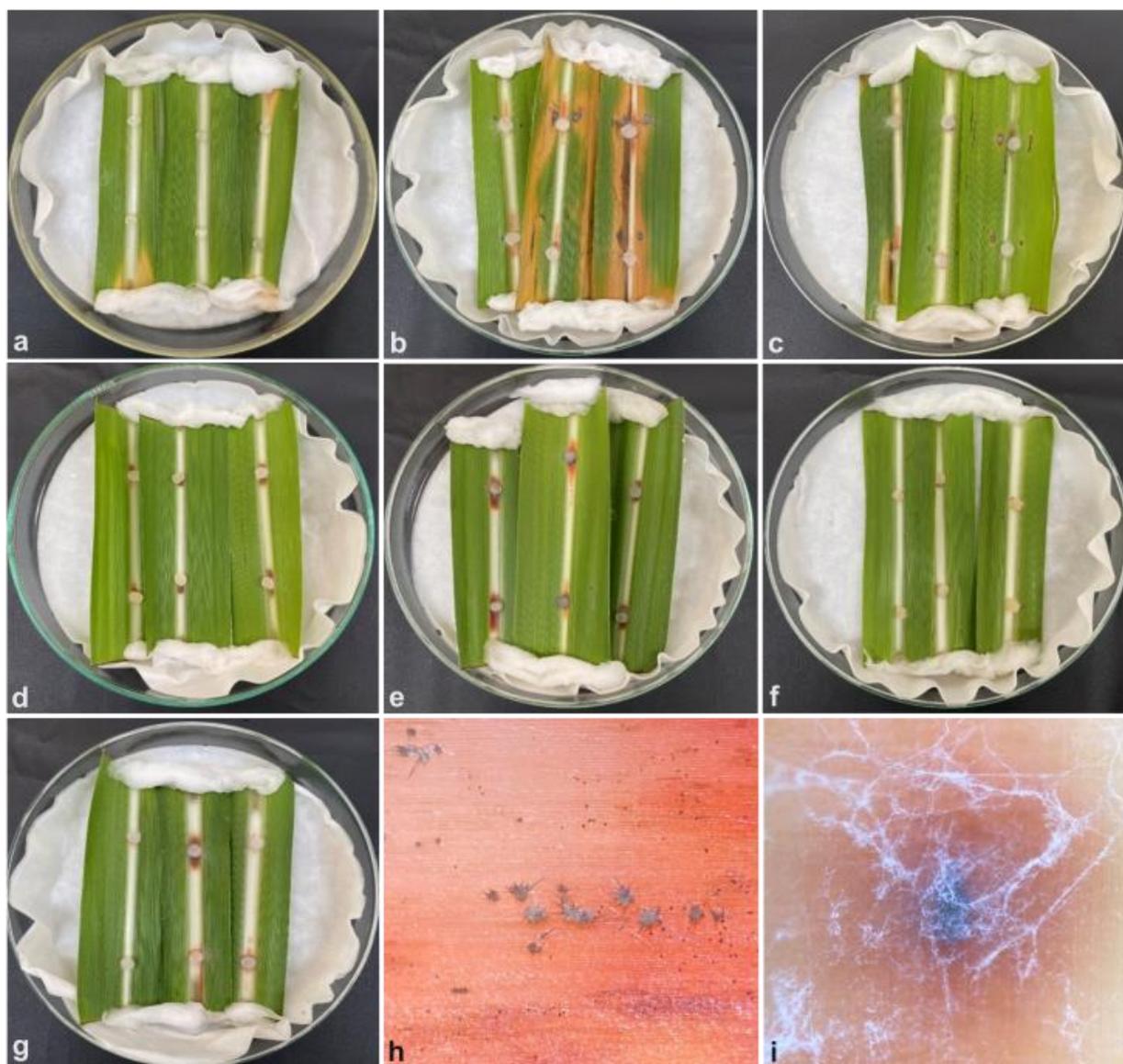


Figura 4. Fotografias mostrando o teste de patogenicidade de inserção de plugue de micélio com esporulação do fungo em folhas seccionadas de cana-de-açúcar da variedade RB867515. Folhas inoculadas com as seguintes espécies. **a**, testemunha; **b**, *F. madaense*; **c**, *F. sacchari*; **d**, *F. proliferatum*; **e**, *C. falcatum*; **f**, *Colletotrichum* sp.; **g**, *F. fredkrugeri*; **h**, acérvulos produzidos por *C. falcatum* na nervura central; **i**, micélio aéreo produzido por *F. madaense* na nervura central.

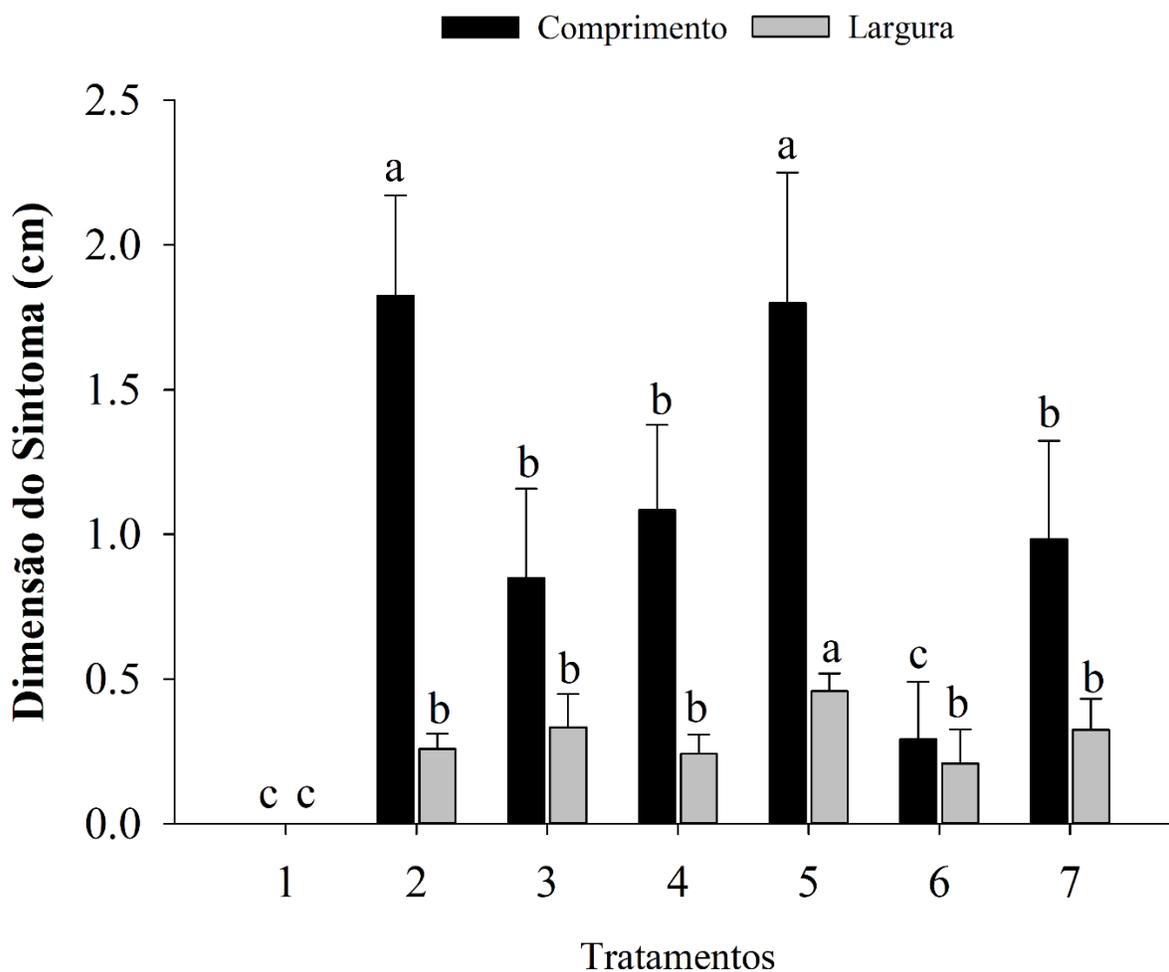


Figura 5. Histograma das médias de dimensão do sintoma (comprimento e largura) com as barras de desvio-padrão, do teste de patogenicidade de inoculação de disco de micélio com esporulação do fungo na nervura central de folhas seccionadas, inoculadas com as seguintes espécies: **1**, testemunha; **2**, *F. madaense*; **3**, *F. sacchari*; **4**, *F. proliferatum*; **5**, *C. falcatum*; **6**, *Colletotrichum* sp.; **7**, *F. fredkrugeri*.



Figura 6. Fotografias mostrando a comparação de alguns testes de patogenicidade de inserção de plugue de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados de cana-de-açúcar da variedade RB867515. Colmos inoculados com as seguintes espécies: **a**, testemunha; **b**, *F. sacchari*; **c**, *C. falcatum*; **d**, *F. sacchari* e *C. falcatum*; **e**, *F. proliferatum*; **f**, *Colletotrichum* sp.; **g**, *F. fredkrugeri*.

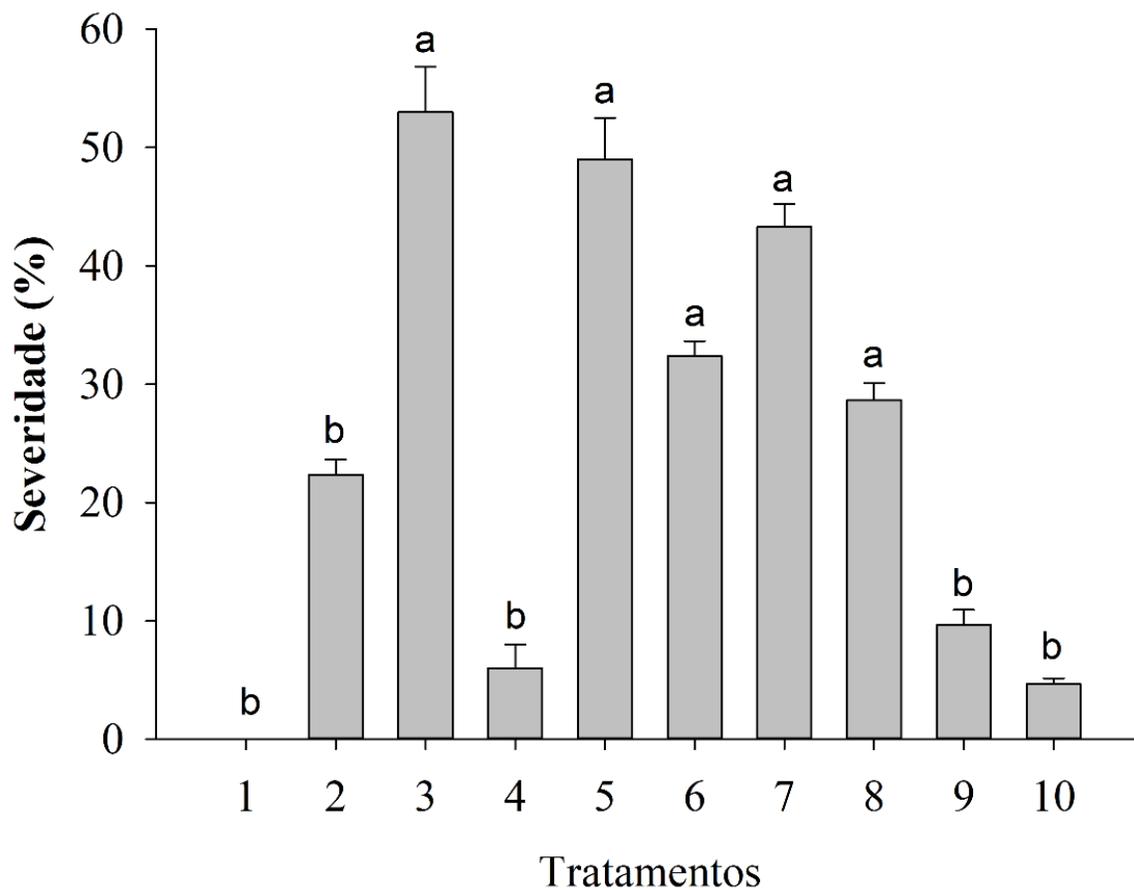


Figura 7. Histograma das médias de severidade com as barras de desvio-padrão, do teste de patogenicidade de inserção de plugue de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados e inoculados com as seguintes espécies: **1**, testemunha; **2**, *F. madaense*; **3**, *F. sacchari*; **4**, *F. proliferatum*; **5**, *C. falcatum*; **6**, *F. madaense* e *C. falcatum*; **7**, *F. sacchari* e *C. falcatum*; **8**, *F. proliferatum* e *C. falcatum*; **9**, *F. fredkrugeri*; **10**, *Colletotrichum* sp.

4. DISCUSSÃO

Isolados de *C. falcatum*, *F. madaense*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. verticillioides*, *F. fredkrugeri* e uma nova espécie de *Colletotrichum*, foram obtidos de colmos e folhas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha dos Estados de MG, SP e PE. Houve o predomínio de *C. falcatum* nas folhas coletadas para isolamento, enquanto espécies de *Fusarium* em colmos. Dos 19 novos isolados, 31,6% representam *C. falcatum*, 5,3% *Colletotrichum* sp., 21% para cada uma das espécies de *F. madaense* e *F. sacchari*, 10,5% *F. proliferatum*, 5,3% para *F. fredkrugeri* e 5,3% para *F. verticillioides*.

No Estado de SP, os colmos apresentavam sintomas iniciais de podridão vermelha, enquanto na única amostra de colmo de PE, o sintoma já era avançado. Em MG, algumas amostras de colmos e folhas estavam secas, pois as áreas das quais foram obtidas, passaram por período de falta de chuvas, e outro fungo estava associado à cultura, *Phaeocytostroma sacchari*, agente etiológico da doença chamada podridão da casca (Figura 8, letra c). Esse fungo foi relatado ocorrendo na Índia e é capaz de infectar colmos de cana-de-açúcar e induzir sintomas de murcha, principalmente em períodos de seca (Sivanesa et al., 1986; Viswanathan et al., 2003). Em uma mesma amostra de colmo, foi possível isolar *C. falcatum* e *P. sacchari*, o que demonstra que os produtores e usinas precisam ficar em alerta, pois a produtividade do canavial pode ser ainda mais afetada (Figura 8, letra e).

Algumas amostras de colmos sintomáticos não apresentaram orifícios ocasionados pela broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), ou seja, a ocorrência de podridão vermelha no campo não deve se limitar apenas a ocorrência deste inseto formando o complexo broca-podridão, mas também por materiais propagativos já contaminados e fonte de inóculo na palhada (Crouch, 2009). Na condução deste projeto, houve dificuldade na busca de material propagativo sadio para plantio e condução dos experimentos, e verificamos que mudas micropropagadas podem estar contaminadas com *C. falcatum* e espécies de *Fusarium*.



Figura 8. Fotografias de material sintomático de cana-de-açúcar recebido dos Estados de MG, SP e PE. **a-b**, colmos seccionados de uma mesma planta de MG, no qual foi obtido *F. sacchari*; **c**, exsudação de coloração preta e formato espiralado contendo conídios de *Phaeocystroma sacchari*, na superfície do colmo de MG; **d**, colmo de SP, no qual foi obtido *F. fredkrugeri*; **e**, placa de Petri oriunda de isolamento do colmo de MG, contendo *P. sacchari* (lado esquerdo) e *C. falcatum* (lado direito); **f**, colmos de PE; **g**, folha sintomática com micélio aéreo de *Fusarium* spp.

Este é o primeiro relato das espécies *F. madaense*, *F. sacchari* e *F. verticillioides*, encontradas em folhas de cana-de-açúcar com sintomas de podridão vermelha no Brasil (Figura 8, letra g). Foi obtido um representante de cada uma dessas espécies no material recebido do Estado de Pernambuco. Nas Filipinas, *F. sacchari* e *F. proliferatum* foram isoladas de folhas e colmos com sintomas de podridão vermelha (Dela Cueva et al., 2019). Diante disto, não se deve associar apenas *C. falcatum* ao sintoma nas folhas, pois espécies de *Fusarium* também podem induzir a coloração vermelha na nervura central. No teste de patogenicidade de folhas seccionadas com plugue de micélio com esporulação do fungo, todas espécies de *Fusarium* inoculadas foram patogênicas. As folhas inoculadas com *F. madaense* e *C. falcatum*, obtiveram sintomas de maior comprimento. Também foi observada a produção de acérvulos por *C. falcatum* nos pontos de

inoculação, e esta estrutura é uma importante fonte de inóculo para o fungo, devido a produção de conídios que vão ser dispersos no campo através de gotículas de água por meio de irrigação e/ou chuva (Crouch, 2009).

No teste de patogenicidade de plugue de micélio com esporulação do fungo em colmos seccionados, quando inoculados com *F. sacchari*, *C. falcatum* e a combinação destes dois, os colmos apresentaram sintomas mais severos. Os colmos inoculados com *F. sacchari*, apresentaram o sintoma de podridão vermelha na mesma severidade que *C. falcatum*. Houve um aumento na severidade da doença quando *F. madaense* e *F. proliferatum* foram inoculados em combinação com *C. falcatum*. Devido a utilização de colmos seccionados, os resultados em relação a severidade podem ser diferentes se forem utilizadas plantas no campo para fazer inoculação, uma vez que as plantas vivas terão a produção de moléculas para combater o patógeno que a infecta. Assim, a severidade pode vir a ser menor quando inoculado diretamente em plantas vivas no campo. Um dos atributos de comercialização da cana-de-açúcar nas usinas é a qualidade da ATR e *C. falcatum* pode promover a inversão da sacarose, diminuindo sua qualidade. Como espécies de *Fusarium* estão associadas aos sintomas de podridão vermelha, estariam elas também afetando o teor de açúcar nos colmos?

Fusarium sacchari é agente etiológico da “*Pokkah boeng*” e “*wilt*”, doenças que afetam o desenvolvimento da cana-de-açúcar e consequentemente sua produtividade. Até o presente estudo, apenas “*Pokkah boeng*” ocorre no Brasil e é causada também pelas espécies *F. madaense* e *F. proliferatum*, membros do FFSC (Costa et al., 2019). Na Índia, é relatado que *F. sacchari* pode induzir em uma mesma planta as duas doenças, iniciando os sintomas com “*wilt*”, que posteriormente progridem para “*Pokkah boeng*”. E enquanto na “*wilt*” a podridão no colmo varia de coloração marrom, rosada e roxa, na podridão vermelha causada por *C. falcatum*, a coloração varia de marrom a avermelhada (Viswanathan, 2013; Viswanathan et al., 2017). Nas análises visuais das amostras de colmo sintomáticas dos Estados de SP, MG e PE, não foi observado “*wilt*” em associação com a podridão vermelha. Todavia, entre o período de envio e recebimento destas amostras, a ocorrência de deterioração dos colmos pode afetar sua coloração, consequentemente a análise visual dos sintomas.

Nas análises filogenéticas, a nova espécie de *Colletotrichum* pertence ao complexo de espécies *Colletotrichum graminicola*, e se agrupou no mesmo clado com um isolado obtido de cana-de-açúcar também do Brasil (Crouch et al., 2009a; 2009b; 2009c). No entanto, nos testes de

patogenicidade feitos neste trabalho, *Colletotrichum* sp. não foi patogênica nas folhas inoculadas e pouco virulenta nos colmos inoculados. Coletas complementares são necessárias para obtenção de novos isolados, pois foi obtido apenas um representante desta nova espécie. Assim, novas repetições dos testes de patogenicidade são necessárias para comparar a virulência entre novos isolados, e assim inferir a respeito da patogenicidade de *Colletotrichum* sp. Recentemente no Irã, foi feita a descrição de três novas espécies de *Colletotrichum* pertencentes ao CGSC, de amostras com sintomas de antracnose e/ou manchas foliares. As espécies são: *C. caspicum* e *C. persicum*, isoladas de poaceae e ciperaceae e *C. sacchari*, oriunda de *Saccharum spontaneum*, poaceae utilizada no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar (Alizadeh et al., 2022). E no Brasil, foi isolado *C. siamense* (Complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*) e *C. plurivorum* (Complexo de espécies *Colletotrichum orchidearum*) de folhas com sintomas de podridão vermelha, que nos testes de patogenicidade conduzidos, as espécies foram patogênicas (Marins et al., 2022). É interessante observar, que a fase sexuada de *C. plurivorum* havia sido isolada de folhas de cana-de-açúcar anteriormente, mas tal espécie não foi patogênica nos testes de patogenicidade (Costa et al., 2021). Nenhuma destas espécies relatadas em associação com a podridão vermelhada da cana-de-açúcar, se agruparam filogeneticamente com *Colletotrichum* sp.

Este é o primeiro relato de *F. fredkrugeri* ocorrendo em associação à cana-de-açúcar. Essa espécie foi inicialmente isolada de solo rizosférico na África e pertence ao FFSC (Sandoval-Denis et al., 2018) (Figura 8, letra d; Figura 9). No teste de patogenicidade em folha, *F. fredkrugeri* induziu sintomas de vermelhidão na nervura central, mas nos colmos inoculados os sintomas não foram severos, comparado as espécies de *F. sacchari* e *F. madaense*. Também são necessárias coletas complementares para obtenção de novos isolados e a repetição dos testes de patogenicidade, para associar essa espécie como um novo agente etiológico da podridão vermelha.

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de energia renovável não só para o Brasil, como para o mundo, e a sua utilização frente aos combustíveis fósseis, a torna altamente rentável. Diminuir os impactos presentes no campo, como ataque de pragas e doenças que diminuem seu rendimento energético, é de suma importância para o alto aproveitamento nas usinas. Este estudo contribui no esclarecimento dos principais agentes etiológicos da podridão vermelha da cana-de-açúcar no Brasil, como na base de conhecimento para estudos futuros. São necessários testes de patogenicidade em campo e estudos complementares para *Colletotrichum* sp e *F. fredkrugeri* serem consideradas agentes etiológicos da doença, devido ao baixo número de isolados obtidos. Também

é preciso observar se ocorre a fase sexuada de *C. falcatum* em campo, pois a mesma já foi descrita na literatura e não a nada publicado recentemente.

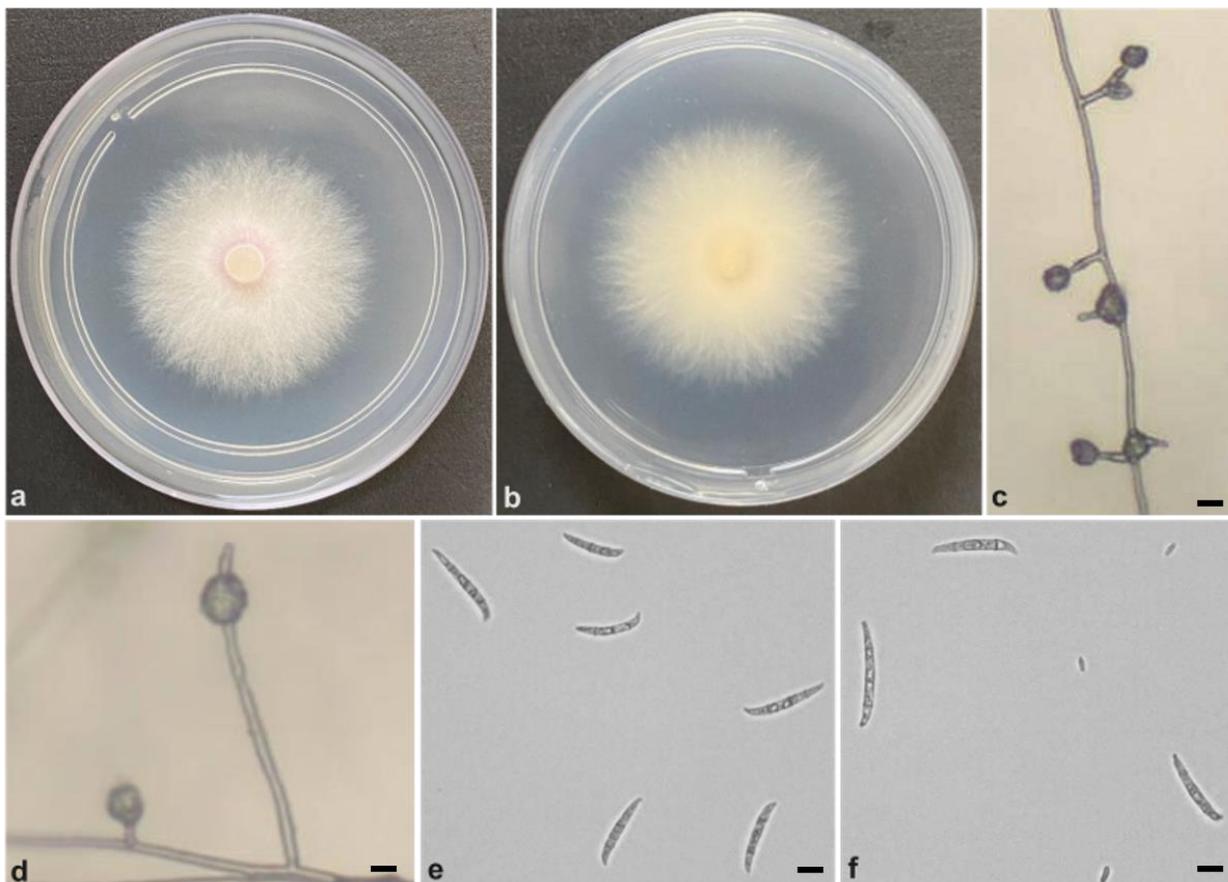


Figura 9. *Fusarium fredkrugeri*. **a-b**, Fotografias de colônias em meio BDA; **c-d**, Fotomicrografia de fiálides formadas no micélio aéreo, Barra = 20 μ ; **e**, macroconídios, Barra = 20 μ ; **f**, macro e microconídios, Barra = 20 μ .

REFERÊNCIAS

- Abbott EV (1938) Red rot of sugarcane. United States Department of Agriculture, Washington, DC, US Technical Bulletin 641:96.
- Alizadeh A, Javan-Nikkhah M, Nourmohammadi Nazarian R, Liu F, Zare R, Fotouhifar KB, Stukenbrock EH, Damm U (2022) New species of *Colletotrichum* from wild Poaceae and Cyperaceae plants in Iran. *Mycologia* 114: 89-113.
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller J, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR (2009) A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.
- Carvajal F, Edgerton CW (1943) The perfect state of *Colletotrichum falcatum*. *Phytopathology* 34: 206-214.
- Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012) *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Conab (2022) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar, v.9, Safra 2022/23, n.2, Segundo levantamento, Brasília, p.1-58.
- Costa MM, Melo MP, Guimarães EA, Veiga CMO, Costa SS, Sandin FC, Moreira GM, Pfenning LH (2019) Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with pokkah boeng of sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 68: 1350-1360.
- Costa MM, Silva BAAS, Moreira GM, Pfenning LH (2021) *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 70:1807-1818.
- Costa MM, Saleh AA, Melo MP, Guimarães EA, Esele P, Zeller KA, Summerell BA, Pfenning LH, Leslie JF (2022) *Fusarium mirum* sp. nov, intertwining *Fusarium madaense* and *Fusarium andiyazi*, pathogens of tropical grasses. *Fungal Biology* 126: 250-266.
- Crouch JA, Beirn LA (2009) Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009a) Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm-season grasses. *Mycologia* 101: 717-732.
- Crouch JA, Tredway LP, Clarke BB, Hillman BI (2009b) Phylogenetic and population genetic divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. *Molecular Ecology* 18: 123–135.
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009c) What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101: 648-656.

Dela Cueva F, De Torres R, De Castro A, Mendoza J, Belendres MA (2019) Susceptibility of sugarcane to red rot caused by two *Fusarium* species and its impact on stalk sugar level. *Journal Plant Pathology* 101: 639-646.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019.

Giglioti EA, Canteri MG (1998) Desenvolvimento de software e escala diagramática para seleção e treinamento de avaliadores da severidade do complexo broca-podridão em cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira* 23: 359-363.

Hepperle D. (2004). SeqAssem©: a sequence analysis tool contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Klein Raden: Sequantix. Disponível em: <<http://www.sequentix.de>>.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.

Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Malden: Blackwell Publishers.

Marins EFC, Silva MJDS, Silva JL, Silva Cabral JRA, Jaqueline FDO, Costa JFO, Feijó FM, Assunção IP, Lima GSA (2022) *Colletotrichum* species associated with sugarcane red rot in Brazil. *Fungal Biology* 126: 290-299.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings National Academy Science* 95:2044-2049.

Politis DJ (1975) The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* 67: 56-62.

Prihastuti H, Cai L, Crouch JA, Phoulivong S, Moslem MA, McKenzie EHC, Hyde KD (2010) Neotypification of *Colletotrichum falcatum*, the causative agent of red-rot disease in sugarcane. *Sydowia* 62: 283-293.

Sandoval-Denis M, Swart WJ, Crous PW (2018) New *Fusarium* species from the Kruger NationalPark, South Africa. *MycKeys* 34: 63–92.

Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi R, Salleh B (2008) Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with pokkah boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal Tropical Agricultural Sciences* 31: 279-286.

Sivanesan A, Waller JM (1986) Sugarcane Diseases. *Phytopathological Paper CMI* 9:88.
 Talhinhos P, Baroncelli R (2021) *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity* 110: 109-198.

Team RC (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundations for Statistical Computing, Vienna, Austria: Available at: <https://www.r-project.org/>.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Vaillancourt LJ, Hanau RM (1992) Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology* 16: 219-229.

Viswanathan R, Premachandran MN, Balamuralikrishnan M, Jothi R (2003) A New stalk rot disease of sugarcane caused by *Phaeocytostroma sacchari* in India. *Sugar Technology* 5: 61-64.

Viswanathan R (2013) Status of sugarcane wilt: one hundred years after its occurrence in India. *Journal of Sugarcane Research* 3: 86–106.

Viswanathan R, Balaji CG, Selvakumar R, Malathi P, Ramesh Sundar A, Prasanth CN, Chhabra ML, Parameswari B (2017) Epidemiology of *Fusarium* diseases in sugarcane: a new discovery of same *Fusarium sacchari* causing two distinct diseases, wilt and pokkah boeng. *Sugar Technology* 19: 638–646.

Viswanathan R (2020) *Fusarium* diseases affecting sugarcane production in India. *Indian Phytopathology* 73: 415-424.

Viswanathan R (2021) Red rot of sugarcane (*Colletotrichum falcatum* Went). *CAB Reviews* 16: 023.