



ANA KAROLINE VIEIRA DOS SANTOS

**FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO E À SÍNDROME
DA MURCHA EM CANA-DE-AÇÚCAR**

**LAVRAS-MG
2025**

ANA KAROLINE VIEIRA DOS SANTOS

**FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO E À SÍNDROME DA MURCHA EM
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.

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

LAVRAS-MG

2025

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

Vieira, Ana Karoline dos Santos.

Fungos associados à Podridão e a Síndrome da Murcha em Cana-de-açúcar / Ana Karoline Vieira dos Santos. - 2025.

53 p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025. Bibliografia.

1. *Saccharum spp.* 2. Filogenia molecular. 3. *Phaeocytostroma sacchari* . 4. *Colletotrichum falcatum* . 5. Complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*.
I. Heinrich Pfenning, Ludwig . II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

ANA KAROLINE VIEIRA DOS SANTOS

**FUNGOS ASSOCIADOS À PODRIDÃO E À SÍNDROME DA MURCHA EM
CANA-DE-AÇÚCAR
FUNGI ASSOCIATED WITH ROT AND WILTING SYNDROME IN
SUGARCANE**

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 27 de fevereiro de 2025.

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Dr. Guilherme Vieira Pimentel UFLA

Dr. Márcio Henrique Pereira Barbosa UFV

Dr. Ludwig H. Pfenning
Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

Dedico essa conquista a Deus pelas bênçãos concedidas em minha vida. À minha família: meus pais, Ana Lúcia dos Santos e Antônio Vieira do Nascimento, por sempre me incentivar, apoiar e aconselhar a lutar pelos meus objetivos, por todo amor e carinho e aos meus irmãos, Antônio Vitor, Paulo Ricardo, Carlos Daniel e Isla Kelly, por todos os momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia pela oportunidade e aos professores por contribuir na minha formação acadêmica.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu essa oportunidade e tornou possível essa conquista na minha vida, onde cada dia me deu forças para continuar, não me deixou desanimar diante das dificuldades, e me fez acreditar que sou capaz, pois com Ele ao meu lado nada é impossível.

Agradeço imensamente aos meus pais, meus heróis, minha mãe Ana Lúcia dos Santos e meu pai Antônio Vieira do Nascimento, que foram a minha base, sempre me apoiando e me incentivando em todos os momentos nessa caminhada árdua. Eles estavam sempre do meu lado, não tenho nem palavras para descrever tamanha gratidão. Agradeço aos meus irmãos, Antônio Vitor, Carlos Daniel, Paulo Ricardo e Isla Kelly por todo amor, momentos compartilhados e simplesmente por existirem na minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, por ter me acolhido, me acompanhado e orientado, pela paciência, dedicação constante, amizade e por todos os ensinamentos e oportunidades que serviram para minha formação profissional.

Agradeço em especial a Julianne Bezerra, pela amizade e companheirismo compartilhado durante esse período no mestrado. E a Vitória Cambuí e a Ana Galdino pela amizade compartilhada.

Agradeço ao técnico do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos (LSEF), Edson Luís Rezende (*in memoriam*), por todos os ensinamentos, a amizade e cuidado.

Agradeço aos demais membros do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos por todo suporte e ensinamentos fornecidos, contribuindo no êxito desse trabalho.

Agradeço em especial, a Fabíola Luna por todo ensinamento, companheirismo e a amizade que construímos nesse período.

Agradeço ao Prof. Dr. Guilherme Pimentel por toda ajuda na condução dos experimentos e ao Núcleo de Estudos em Cana-de-açúcar (NECANA).

Agradeço aos membros da banca Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende e Prof. Dr. Márcio Henrique Pereira Barbosa, por compor a banca avaliadora.

RESUMO

Com a proibição da queima, a cultura da cana-de-açúcar enfrenta novos desafios no controle e manejo de doenças fúngicas antes consideradas secundárias. Perdas crescentes foram registradas em períodos de déficit hídrico devido à maior incidência e severidade da Podridão Vermelha e da Podridão da Casca, levando à seca, à murcha e ao apodrecimento dos colmos, resultando na redução da produtividade e da qualidade do açúcar. No ano agrícola 2023/2024, foi observada ainda um fenômeno denominado Síndrome da Murcha da Cana-de-açúcar (SMC), que apresenta a associação concomitante de *Phaeocystostroma*, *Colletotrichum* e *Fusarium*. Ainda não se conhece o principal agente etiológico da SMC, mas sua ocorrência é atribuída a condições climáticas, como o período prolongado de seca, que exerce influência relevante sobre o progresso dessa síndrome. Os objetivos deste estudo foram: (i) identificar os fungos associados à Podridão da Casca e à Síndrome da Murcha (SMC) por avaliação da morfologia e análise de filogenia molecular; (ii) testar a patogenicidade de isolados representativos das espécies encontradas; (iii) descrever e documentar os sintomas observados em campo e nos testes de patogenicidade. Nos materiais coletados nos estados de MG, GO, PE e MS foram encontrados os fungos *Phaeocystostroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum* e espécies de *Fusarium* do complexo *fujikuroi* associados a sintomas da Podridão da Casca e Síndrome da Murcha. Por meio de marcadores morfológicos foram identificados *Phaeocystostroma* e *C. falcatum*. Com base em análise filogenética de sequências de DNA de ITS, LSU e EF-1 α , sete isolados foram identificados como *P. sacchari*. A patogenicidade de isolados de *P. sacchari* e *C. falcatum* foi testada individualmente e em combinação. Ambos os fungos induziram sintomas da Podridão Vermelha em colmos destacados, sendo que a inoculação com apenas *P. sacchari* resultou em menor severidade da doença em comparação aos outros tratamentos. Em testes realizados com folhas destacadas, apenas *C. falcatum* e a combinação dos dois fungos induziu sintomas de Podridão Vermelha. Com o método utilizado, não foi possível reproduzir sintomas de murcha e dessecação dos colmos. Outros testes devem ser conduzidos para esclarecer as causas do aparecimento da SMC. As informações geradas podem contribuir para o manejo fitossanitário e dar suporte a programas de seleção de variedades resistentes.

Palavras chave: *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium*, *Phaeocystostroma*, *Saccharum* spp., filogenia molecular.

ABSTRACT

With the ban on burning, sugarcane cultivation faces new challenges in the control and management of fungal diseases previously considered secondary. Increasing losses have been recorded during periods of water deficit due to the higher incidence and severity of Red Rot and Rind Rot, leading to stalk drying, wilting, and rotting, resulting in reduced productivity and sugar quality. In the 2023/2024 growing season, a phenomenon called Sugarcane Wilt Syndrome (SWS) was also observed, characterized by the simultaneous association of *Phaeocystroma*, *Colletotrichum*, and *Fusarium*. The main etiological agent of SWS remains unknown, but its occurrence is attributed to climatic conditions, such as prolonged drought, which significantly influence the progress of the syndrome. The objectives of this study were to: (i) identify the fungi associated with Rind Rot and Sugarcane Wilt Syndrome (SWS) through morphological evaluation and molecular phylogenetic analysis; (ii) test the pathogenicity of representative isolates of the species found; and (iii) describe and document the symptoms observed in the field and in pathogenicity tests. In samples collected from the states of MG, GO, PE, and MS, the fungi *Phaeocystroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum*, and species of *Fusarium* from the *F. fujikuroi* complex were found associated with symptoms of Rind Rot and Wilt Syndrome. Based on morphological markers, *Phaeocystroma* and *C. falcatum* were identified. Through phylogenetic analysis of DNA sequences from ITS, LSU, and EF-1 α regions, seven isolates were identified as *P. sacchari*. The pathogenicity of *P. sacchari* and *C. falcatum* isolates was tested individually and in combination. Both fungi induced Red Rot symptoms in detached stalks, with *P. sacchari* alone causing less severe symptoms compared to the other treatments. In tests using detached leaves, only *C. falcatum* and the combination of both fungi induced Red Rot symptoms. With the method used, it was not possible to reproduce symptoms of wilting and stalk desiccation. Further tests should be conducted to clarify the causes of SWS onset. The information generated may contribute to plant health management and support breeding programs for resistant varieties

Keywords: *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium*, *Phaeocystroma*, *Saccharum* spp., molecular phylogeny.

IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

Estudamos a diversidade de espécies de fungos do gênero *Fusarium*, *Colletotrichum* e eventualmente outros, que ocorrem em associação com plantas cultivadas e da vegetação natural. A identificação das espécies de acordo com conceitos modernos é um pré-requisito para o desenvolvimento de diversas tecnologias. Verificamos a distribuição em território nacional, identificamos seus hospedeiros e seu comportamento como patógeno, endófito ou produtor de micotoxinas. O fenômeno da patogenicidade é resultado da interação entre o fungo e a planta hospedeira, influenciado ainda por solo e clima. A prática de uma agricultura tropical altamente diversificada, tecnológica e inovadora no Brasil resulta em variações consideráveis e relevantes dessa interação. Os resultados gerados dão suporte à diagnose de doenças que ocorrem em plantas cultivadas, e ao monitoramento dos agentes etiológicos, à implementação de estratégias de controle, integrando uso de produtos químicos e biológicos, e ainda ao desenvolvimento de germoplasma vegetal com resistência genética. Representam prerequisite indispensável para o desenvolvimento de tecnologia de detecção por PCR, baseada em polimorfismo único de DNA do organismo alvo.

SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS

We are investigating the diversity of species of the genera *Fusarium*, *Colletotrichum* and eventually still others, which occur in association with cultivated plants and natural vegetation. Species identification according to modern concepts is a prerequisite for the development of various technologies. We verified its distribution throughout the country, identified its hosts and its behavior as a pathogen, endophyte or producer of mycotoxins. The phenomenon of pathogenicity is the result of the interaction between the fungus and the host plant, also influenced by soil and climate. The practice of highly diversified, technological and innovative tropical agriculture in Brazil results in considerable and relevant variations. The results generated support the diagnosis of plant diseases and the monitoring of its causal agents, the implementation of control strategies, integrating the use of chemical and biological products, but also the development of plant germplasm with genetic resistance. They represent an indispensable prerequisite for the development of PCR detection technology, based on unique DNA polymorphisms of the target organism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) dos isolados de <i>Phaeocytostroma</i> com outras espécies da família <i>Diaporthaceae</i> inferida a partir de um conjunto de dados combinados (ITS, LSU e EF-1 α)	36
Figura 2: Características morfológicas de <i>Phaeocytostroma sacchari</i>	37
Figura 3: Características morfológicas de espécies do Complexo <i>Fusarium fujikuroi</i> (FFSC).....	38
Figura 4: Características morfológicas de <i>Colletotrichum falcatum</i>	39
Figura 5: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> , após aplicação de suspensão de conídios em colmos seccionadas de cana-de-açúcar	40
Figura 6: Severidade da Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzida por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> e <i>P. sacchari</i> + <i>C. falcatum</i> , após a aplicação de suspensão de conídios em colmos seccionados de cana-de-açúcar	41
Figura 7: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> , após a deposição de suspensão de conídios em folhas destacadas de cana-de-açúcar.....	42
Figura 8: Severidade da Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzida por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> e <i>P. sacchari</i> + <i>C. falcatum</i> , após a deposição de suspensão de conídios sobre folhas destacadas de cana-de-açúcar	43
Figura 9: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> , após inserção de suspensão de conídios na bainha de plantas de cana-de-açúcar	44
Figura 10: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por <i>Phaeocytostroma sacchari</i> e <i>Colletotrichum falcatum</i> após inserção de disco de micélio com esporulação de fungos e suspensão de conídios na bainha de plantas de cana-de-açúcar.....	45
Figura 11: Sintomatologia da Podridão da Casca e Síndrome da Murcha observada em campo	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Phaeocytostroma sacchari</i> obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha da cana-de-açúcar	47
Tabela 2. Isolados de <i>Colletotrichum falcatum</i> obtidos de cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha da cana-de-açúcar	48
Tabela 3. Isolados do Complexo FFSC obtidos cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha da cana-de-açúcar	48
Tabela 4. Sequências de DNA de material de referência utilizado nas análises.....	49

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	ESTADO DA ARTE.....	14
2.1	A cultura da Cana-de-açúcar	14
2.2	Podridão Vermelha	15
2.3	Podridão da Casca	16
2.4	A Síndrome da Murcha da Cana, um fenômeno temporário?.....	17
	REFERÊNCIAS	19
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	23
1	INTRODUÇÃO.....	26
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1	Obtenção de isolados e preservação.....	27
2.2	Avaliação de marcadores morfológicos de <i>Phaeocytostroma sacchari</i>, <i>Colletotrichum falcatum</i> e espécies de <i>Fusarium</i>.....	28
2.3	Extração de DNA, PCR e sequenciamento de regiões gênicas barcode.....	28
2.4	Análise filogenética molecular.....	29
2.5	Testes de patogenicidade.....	30
3	RESULTADOS.....	32
3.1	Identificação de isolados por filogenia molecular.....	32
3.2	Avaliação dos marcadores morfológicos.....	32
3.3	Patogenicidade.....	33
3.4	Sintomas observados em Campo.....	34
4	DISCUSSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXOS.....	38

PRIMEIRA PARTE

1 Introdução Geral

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das principais culturas agrícolas nas regiões tropicais e subtropicais, fornecendo a matéria prima para o setor sucroenergético voltado à produção de açúcar e energia. O Brasil é o maior produtor mundial, com uma área plantada de 8,7 milhões de hectares e uma produção de 720 milhões de toneladas, seguido da Índia, com produção de 440 milhões de toneladas (FAO, 2022; CONAB, 2024). Doenças causadas por fungos, bactérias e vírus podem gerar perdas quantitativas e qualitativas relevantes, impactando o rendimento do setor produtivo (Rott, 2000). Por ser uma planta propagada de forma vegetativa, a atenção recai sobre a sanidade do material propagativo, já que algumas doenças podem ser disseminadas por meio do uso de colmos infectados (Nithya et al., 2012).

A proibição da queima e adoção da colheita mecânica na cultura da cana-de-açúcar, em especial no centro-sul, região que corresponde a 91% da produção nacional, resultou em um maior acúmulo de palhada no solo, protegendo-o contra erosão e contribuindo para o aumento da fertilidade e teor de matéria orgânica (Galdos et al., 2009; Valim et al., 2016). No entanto, a ausência do fogo e o acúmulo de palhada podem também favorecer a permanência de fungos e o aumento da pressão de inóculo de determinadas doenças, anteriormente consideradas secundárias (Costa et al., 2021; Nechet et al., 2021; Roese e Silva, 2021). Embora já exista literatura discutindo os efeitos dessa mudança de manejo sobre biomassa, população de nematoides e insetos-praga (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2013; Carvalho et al., 2017), o conhecimento dos impactos sobre doenças causadas por fungos ainda é incipiente.

A Podridão Vermelha, cujo principal agente etiológico é conhecido como *Colletotrichum falcatum*, tornou-se uma das doenças mais importantes no Brasil após a mudança no manejo. O patógeno induz podridão interna avermelhada nos colmos e pode causar a inversão da sacarose, reduzindo a quantidade total de açúcar recuperável (ATR) da planta. Também pode provocar coloração vermelha na nervura central das folhas. Espécies de *Fusarium*, *sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense*, podem ser frequentemente encontradas em associação com os sintomas da podridão vermelha (Dela Cueva et al., 2019; Viswanathan, 2020, 2021; Costa et al., 2021). Tais espécies já são relatadas como agentes causais da Pokkah Boeng no Brasil e pertencem ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Os principais sintomas dessa doença incluem a deformação no topo da planta, que pode evoluir para apodrecimento da parte apical do colmo e acarretar uma desordem no crescimento da planta (Costa et al., 2019).

Recentemente, a incidência da Podridão da Casca ou Podridão Azeda, causada por *Phaeocytostroma sacchari* e anteriormente considerada uma doença secundária, tornou-se uma

preocupação crescente. Sintomas severos dessa doença já foram observados na Índia e no México, em diversas variedades, levando à murcha, dessecação e morte das plantas afetadas (Viswanathan et al., 2003; Carabez et al., 2014). No Brasil, a doença foi registrada pela primeira vez em plantações de cana-de-açúcar no estado de Goiás (Melo et al., 2023).

No ano agrícola 2023/2024, foi observado nos canaviais brasileiros, além da Podridão da Casca, um fenômeno ao qual foi atribuído o nome de Síndrome da Murcha da Cana-de-açúcar (SMC). Esse fenômeno se deve à associação observada entre *C. falcatum*, *P. sacchari* e espécies de *Fusarium*, ocorrendo simultaneamente na planta. Ainda não se compreende bem a etiologia dessa síndrome, e atribui-se a ocorrência às condições climáticas, como, por exemplo, um período prolongado de seca, que exerce influência relevante sobre o seu progresso. Foram registradas perdas significativas por tais doenças no Brasil, em razão do apodrecimento, da seca dos colmos e da inversão da sacarose, reduzindo assim a quantidade total de açúcar recuperável da planta (Melo et al., 2023; CONAB, 2024). Não existe literatura primária disponível no Brasil sobre esse patossistema, mas avaliações estão sendo feitas por técnicos, usinas e empresas.

Os objetivos deste estudo foram (i.) coletar e analisar material vegetal com sintomas de Podridão da Casca e da Síndrome da Murcha (SMC); (ii.) identificar os agentes etiológicos da Podridão da Casca e da Síndrome da Murcha (SMC) por análise de marcadores morfológicos e filogenia molecular; (iii.) testar a patogenicidade de isolados representativos das espécies encontradas; (iv.) descrever e documentar os sintomas observados em campo e em testes de patogenicidade; (v.) investigar se ocorre interação ou sinergismo quando *Phaeocystroma sacchari* e *Colletotrichum falcatum* coinfectam as plantas, bem como a contribuição de cada agente etiológico na indução dos sintomas.

2 Estado da Arte

2.1 A cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea comercialmente significativa da família Poaceae, originária do sudeste da Ásia e cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Brumbley et al., 2009). Esta cultura foi introduzida inicialmente nos primeiros anos de descobrimento do Brasil no Estado de São Paulo, considerado o primeiro engenho. No entanto, foi na região nordeste, nos estados de Pernambuco e Bahia que o cultivo expandiu. A importância da cana-de-açúcar é resultante da sua múltipla utilidade, sendo empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, cachaça, açúcar, etanol e energia, gerando empregos e renda na área rural (Bordonal et al., 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial com uma área plantada em torno de 8,7 milhões de hectares e produção de 720 milhões de toneladas, seguido por Índia, com produção de 440 milhões de toneladas na safra 2024/25 (FAO, 2022; CONAB, 2024). Com a produção da cultura mais concentrada na região Sudeste, particularmente no estado de São Paulo, que contribui com 55% do total. Os demais Estados produtores são Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná (FAO, 2023; CONAB, 2024).

O aumento da área cultivada e da produtividade dessa cultura é acompanhado do aumento de impactos ambientais. Uma das medidas adotadas na década passada para diminuir o impacto ambiental da cultura foi a proibição da queimada em canaviais no Estado de São Paulo, seguindo um esquema de restrições legais progressivas até o ano de 2021 em áreas com possibilidade de mecanização total da colheita, e até 2031 para as demais áreas segundo o Decreto no 47.700 de 11/3/2003, que regulamenta a Lei no 11.241 de 19/9/2002 (SÃO PAULO, 2002).

Esta transição ao longo dos últimos anos resultou na deposição de grande quantidade de palha nos campos de cana-de-açúcar, formando uma cobertura na superfície do solo (Fortes et al., 2012; Carvalho et al., 2013). Em consequência dessa mudança, ocorre uma interferência na epidemiologia das doenças, pois a palhada permite a manutenção dos fungos nas áreas de cultivo (Costa et al., 2021; Nechet et al., 2021; Roese e Silva, 2021). Os efeitos dessa mudança, afeta também a população de nematoides e insetos praga (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2013; Carvalho et al., 2017).

2.2 Podridão Vermelha

A podridão vermelha é uma das principais doenças da cana-de-açúcar, relatada pela primeira vez em Java na Indonésia no ano de 1893. Por ser uma doença amplamente distribuída, vêm causando sérios danos à cultura nos últimos anos em vários países produtores de cana-de-açúcar como Bangladesh, Brasil, Índia e EUA (Hossain et al., 2021; Costa et al., 2021; Marins et al., 2022; Silva et al., 2024). Os sintomas típicos da doença são lesões avermelhadas na nervura central das folhas, que se estendem por todo o comprimento da nervura foliar. No colmo é observada uma podridão interna avermelhada, intercalada com manchas brancas e a presença de odor levemente ácido. Essa doença também afeta negativamente a qualidade do açúcar pela inversão de sacarose que pode ocorrer em colmos infectados. A sacarose é transformada em frutose e glicose, limitando a disponibilidade de sacarose, reduzindo dessa forma a quantidade total de açúcar recuperável da planta e afetando a produção de açúcar (Sharma et al., 2017; Singh et al., 2017).

Colletotrichum falcatum é considerado o principal agente etiológico da Podridão Vermelha. Esse fungo pertence ao complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC), um grupo de espécies com afinidade com gramíneas (Crouch et al., 2006; 2009). Na fase assexuada produz acérvulos circundados de setas e conídios hialinos e curvados (Prihastuti et al., 2010). A fase sexuada é conhecida como *Glomerella tucumanensis*, onde se observa a formação de peritécios imersos em bainhas e lâminas foliares. Essa estrutura é raramente observada em campo. *Colletotrichum siamense* e *C. plurivorum* também ocorrem em associação com a cana-de-açúcar, entretanto sua patogenicidade não foi comprovada (Costa et al., 2021; Marins et al., 2022).

Espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* FFSC são frequentemente encontradas em colmos e folhas com sintomas da Podridão Vermelha. *Fusarium proliferatum*, *F. sacchari* e *F. madaense* foram confirmados como patógenos no Brasil e nas Filipinas (Dela Cueva et al., 2019; Costa et al., 2021;). Tais espécies são agentes causais da Pokkah boeng no Brasil, uma doença responsável por perdas severas em cana-de-açúcar. As plantas apresentam como sintomas deformação no topo e podridão do colmo. Como podem ser patógenos também em outras gramíneas como em milho e sorgo e também sobrevivem em restos de cultura, o seu manejo torna-se mais difícil (Costa et al., 2019; Siti Nordahliawate et al., 2008).

O FFSC foi estabelecido em substituição à antiga Seção Liseola para agrupar espécies caracterizadas pela produção de macroconídios em esporodóquios ou pionotos, microconídios em falsas cabeças e/ou cadeias e que não produzem clamidósporos (Leslie e Summerell, 2006). As espécies de *Fusarium* desse complexo são bem estudadas devido à sua capacidade de causar doença em plantas, além de causar infecções oportunistas em humanos (Nirenberg e O'Donnell 1998; Al-Hatmi et al. 2019).

2.3 Podridão da Casca

A Podridão da Casca ou Podridão Azeda foi relatada primeiramente na África do Sul no ano de 1998 (Goodall et al., 1999). Anteriormente considerada uma doença secundária, hoje tornou-se uma das mais importantes nos canaviais. Já foi relatada causando sérios danos à cultura na Índia, México e Brasil (Viswanathan et al., 2003; Carabez et al., 2014; Melo et al., 2023). Os sintomas iniciais da doença se apresentam com uma coloração marrom-avermelhada interna nos colmos. Com o avanço da doença, os colmos se tornam marrom-escuro, seguido de murchamento, dessecação e apodrecimento com emissão de um odor azedo característico, contribuindo para a inversão da sacarose. Na superfície da casca podem ser observados fios negros espiralados, consistindo de inúmeros esporos. A doença se manifesta principalmente ao

final do período de safra em época de colheita ou em períodos de escassez de chuva, comprometendo a qualidade do açúcar e reduzindo a produção (Viswanathan et al., 2003).

O agente etiológico dessa doença é conhecido como *Phaeocystroma sacchari*, citado na literatura também como *Pleocyta sacchari*. A fase assexuada é caracterizada pela formação de picnídios estromáticos uni a multiloculares, conidióforos filiformes, simples ou ramificados, paráfises filiformes e produção de conídios ovais unicelulares, de cor marrom claro. Não há registro da ocorrência de fase sexuada (Sutton 1964, Lamprecht et al., 2011).

O Gênero *Phaeocystroma* compreende endófitos, saprófitos e patógenos de várias plantas hospedeiras (Sutton 1964; Lamprecht et al., 2011; Boonmee et al., 2021). Anteriormente, esse gênero foi descrito como *Sphaeropsis*, um membro de *Botryosphaeriaceae*, devido aos seus conídios pigmentados e morfologia semelhante a *Diplodia* (Crouch et al., 2006). No entanto, com base em análise filogenética, confirmou-se a colocação taxonômica dentro de *Diaporthaceae*, uma família que compreende endófitos, saprófitas e fitopatógenos, com afinidade com gramíneas (Lamprecht et al., 2011; Udayanga et al., 2014). Espécies de *Phaeocystroma* ocorrem não somente em cana-de-açúcar, mais também outras gramíneas. *Phaeocystroma ambiguum* foi relatado em milho causando podridão do colmo no Brasil, Austrália, Bulgária, França, América do Norte, Tanzânia e África do Sul (Sutton, 1964; Kruger. 1965; Sivanesan e Waller, 1986; Lamprecht et al., 2011; Aguiar et al., 2016).

2.4 A Síndrome da Murcha da Cana, um fenômeno temporário? Uma tentativa de interpretação

Na safra de 2024/25 foi observado nos canaviais brasileiros um fenômeno ao qual foi atribuído o nome de Síndrome da Murcha (SMC) pois os principais fungos associados a plantas sintomáticas são *Phaeocystroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum* e espécies de *Fusarium*. Este fenômeno é caracterizado por sintomas como murcha, dessecação e apodrecimentos dos colmos, reduzindo de forma significativa a produtividade e afetando a qualidade da matéria prima, em consequência da redução do ATR (Açúcar Total Recuperável). Em relatos não oficiais associa-se o aumento desse fenômeno a eventos climáticos extremos como variações de temperatura e períodos prolongados de seca. A mudança para a colheita mecanizada, que deixa uma grande quantidade de palhada sobre o solo, também é apontada como causa do aumento da doença, uma vez que a entrada e permanência desses patógenos na área de cultivo é favorecida pela presença de palhada. Na tentativa de amenizar o problema, leva-se em consideração algumas medidas como a antecipação de colheita e o uso de controle químico.

Considera-se também o desenvolvimento de variedades mais resistentes pois, até então, essa doença está afetando todas as variedades comerciais de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- Aguiar FM, Lanza FE, Costa R. V, Silva DD, Lana UGP, Guimarães EA, Cota LV (2016) First report of *Phaeocystrostroma ambiguum* causing maize stalk rot in Brazil. Plant Disease 100: 2528.
- Al-Hatmi AMS, Sandoval-Denis M, Nabet C, et al. (2019) *Fusarium volatile* a new potential pathogen from a human respiratory sample. Fungal Systematics and Evolution 4: 171–181.
- Boonmee S, Wanasinghe DN, Calabon MS, Huanraluek N, Chandrasiri SK, Jones GE, Hyde KD (2021) Fungal diversity notes 1387–1511: Taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. Fungal Diversity 111: 1-335.
- Bordonal RDO, Carvalho JLN, Lal R, Figueiredo EB, Oliveira BG, La Scala N (2018) Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. Agronomy for Sustainable Development 38: 1-23.
- Brumbley SM, Snyman SJ, Gnanasambandam A, Joyce P, Hermann SR, Silva JAG, McQualter RB, Wang ML, Egan B T, Paterson AH, Albert HH, Moore PH (2009) Sugarcane. In C. Kole & T. C. Hall (Eds.), Compendium of transgenic crop plants 1:58 <https://doi.org/10.1002/9781405181099.k0701>.
- Carabez JS, Ascencio SO, Pedraza JT (2014) First report of stalk rot disease of sugarcane caused by *Phaeocystrostroma sacchari* in Mexico. Plant Disease 98: 420.
- Conab (2024) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar, v.12, Safra 2024/25, n.3, terceiro levantamento, Brasília, p.1-55.
- Carvalho JLN, Nogueirol RC, Menandro LMS, Bordonal RDO, Borges CD, Cantarella H, Franco HCJ (2017). Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. GCB Bioenergy 9: 1181-1195.
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI. (2006) Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose disease in turfgrass and maize. Phytopathology 96: 46–60.
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009) 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.
- 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 BA, Moreira GM, Pfenning LH (2021) *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. *Plant Pathology* 70: 1807-1818.
- Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV (2013) Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. *Scientia Agricola*, 70: 305-310.
- 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 (2024) FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Nations. Statistics Division.
- Fortes C, Trivelin PCO, Vitti AC (2012) Long-term decomposition of sugarcane harvest residues in Sao Paulo state, Brazil. *Biomass and Bioenergy* 42: 189-198.
- Galdos MV, Cerri CC, Cerri CEP (2009) Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. *Geoderma* 153: 347-352.
- Goodall JL, McFarlane SA, Roux C (1999) An unusual stalk rot of sugarcane caused by *Phaeocystostroma sacchari* in the Kwazulu-Natal Midlands. *South African Sugar Technologists Association* 114: 117.
- Hossain MI, Ahmad K, Vadamalai G, Siddiqui Y, Saad N, Ahmed OH, Hata EM Adzmi F, Rashed O, Rahman MZ (2021) Phylogenetic Analysis and Genetic Diversity of *Colletotrichum falcatum* Isolates Causing Sugarcane Red Rot Disease in Bangladesh. *Biology* 10: 862.
- Kruger W (1965) *Phaeocystostroma ambiguum* (Mont.) Petr. A parasitic fungus of maize in South Africa-research note. *South African Journal of Agricultural Science* 8: 587–592.
- Lamprecht SC, Crous PW, Groenewald JZ, Tewoldemedhin YT, Marasas WF (2011) Diaporthaceae associated with root and crown rot of maize. *IMA Fungus* 2:13-24.
- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers.
- Melo JAS, Abreu VP, Teles TAS, Cunha MG (2023) Emergence of *Phaeocystostroma sacchari* in sugarcane plantations in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 105: 1163.
- Marins EFC, Silva MJS, Silva JL, Silva JRA, Costa JFO, Feijo FM, Assunção IP, Lima GSA (2022) *Colletotrichum* species associated with sugarcane Red Rot in Brazil. *Fungal Biology* 126: 290–299.

Nithya K, Bukhari KA, Valluvaparidasan V, Paranidharan V, Velazhahan R (2012) Molecular detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease of sugarcane (*Saccharum officinarum*) using a SCAR marker. *Annals of Applied Biology* 160: 168-173.

Nechet KL, Ramos NP, Halfeld-Vieira BA (2021) Impact of conservation practices on the severity of sugarcane foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 50: 487-494.

Nirenberg HI, O'Donnell K (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458.

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.

Roesse AD, Silva CJ (2021) Áreas preferenciais para recolhimento do palhço da cana-de-açúcar visando à redução de doenças. EMBRAPA Comunicado Técnico no. 264.

Rott P, Bailey RA, Comstock JC, Croft BJ, Saumtally AS (2000) A Guide to Sugarcane Diseases. CIRAD.

Siti Nordahliawate MS, 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 of Tropical Agricultural Science* 31:2.

Singh A, Singh P, Tiwari AK, Sharma BL (2017) Assessment of sugarcane germplasm (*Saccharum* spp. complex) against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 60: 1-5.

São Paulo, 2002. Lei Estadual no. 11.241/2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e das providências correlatas. Available at: <http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2002/lei-11241>

Sharma R, Tamta S (2015) A review on red rot: the “cancer” of sugarcane. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, S_1, 003. DOI 10.4172/2157-7471.S1-003

Silva FR, Resende MLV, Ferreira LC, Adesina O, Xavier KV (2024) Molecular characterization and pathogenicity of *Colletotrichum falcatum* causing red rot on sugarcane in Southern Florida. *Journal of Fungi* 10: 742.

Sutton BC (1964) Coelomycetes III. *Anellolacinia* gen. nov., *Aristastoma*, *Phaeocytostroma* *Seimatosporium* etc. *Mycological Papers* 97: 1-42.

Sivanesan A, Waller JM (1986) Sugarcane Diseases. CMI Phytopathological Papers No. 29. CAB International UK 88.

Udayanga D, Castlebury LA, Rossman AY, Chukeatirote E, Hyde KD (2014) Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity* 67: 203–229.

Valim WC, Panachuki E, Pavei DS, Sobrinho TA, Almeida WS (2016) Effect of sugarcane waste in the control of interrill erosion. *Semina: Ciências Agrárias* 37: 1155-1164.

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). *CABI Reviews* 16, no.023. 57p. DOI 10.1079/PAVSNNR202116023

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

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Fungos associados à Podridão da Casca e à Síndrome da Murcha em cana-de-açúcar

Ana Karoline V. Santos¹, Bárbara A. A. S. Silva¹, Marileide M. Costa², Ludwig H. Pfenning^{1*}

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

² Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, 3584, CT Utrecht, The Netherlands

Manuscrito preparado de acordo com normas da Tropical Plant Pathology

*Corresponding author: Ludwig H. Pfenning, e-mail: ludwig@ufla.br

Resumo

Com a proibição da queima, a cultura da cana-de-açúcar enfrenta novos desafios no controle e manejo de doenças fúngicas antes consideradas secundárias. Perdas crescentes foram registradas em períodos de déficit hídrico devido à maior incidência e severidade da Podridão Vermelha e da Podridão da Casca, levando à seca, à murcha e ao apodrecimento dos colmos, resultando na redução da produtividade e da qualidade do açúcar. No ano agrícola 2023/2024, foi observada ainda um fenômeno denominado Síndrome da Murcha da Cana-de-açúcar (SMC), que apresenta a associação concomitante de *Phaeocystroma*, *Colletotrichum* e *Fusarium*. Ainda não se conhece o principal agente etiológico da SMC, mas sua ocorrência é atribuída a condições climáticas, como o período prolongado de seca, que exerce influência relevante sobre o progresso dessa síndrome. Os objetivos deste estudo foram: (i) identificar os fungos associados à Podridão da Casca e à Síndrome da Murcha (SMC) por avaliação da morfologia e análise de filogenia molecular; (ii) testar a patogenicidade de isolados representativos das espécies encontradas; (iii) descrever e documentar os sintomas observados em campo e nos testes de patogenicidade. Nos materiais coletados nos estados de MG, GO, PE e MS foram encontrados os fungos *Phaeocystroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum* e espécies de *Fusarium* do complexo *fujikuroi* associados a sintomas da Podridão da Casca e Síndrome da Murcha. Por meio de marcadores morfológicos foram identificados *Phaeocystroma* e *C. falcatum*. Com base em análise filogenética de sequências de DNA de ITS, LSU e EF-1 α , sete isolados foram identificados como *P. sacchari*. A patogenicidade de isolados de *P. sacchari* e *C. falcatum* foi testada individualmente e em combinação. Ambos os fungos induziram sintomas da Podridão Vermelha em colmos destacados, sendo que a inoculação com apenas *P. sacchari* resultou em menor severidade da doença em comparação

aos outros tratamentos. Em testes realizados com folhas destacadas, apenas *C. falcatum* e a combinação dos dois fungos induziu sintomas de Podridão Vermelha. Com o método utilizado, não foi possível reproduzir sintomas de murcha e dessecação dos colmos. Outros testes devem ser conduzidos para esclarecer as causas do aparecimento da SMC. As informações geradas podem contribuir para o manejo fitossanitário e dar suporte a programas de seleção de variedades resistentes.

Palavras chave: *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium*, *Phaeocystostroma*, *Saccharum* spp., manejo e controle, filogenia molecular.

ABSTRACT

With the ban on burning, sugarcane cultivation faces new challenges in the control and management of fungal diseases previously considered secondary. Increasing losses have been recorded during periods of water deficit due to the higher incidence and severity of Red Rot and Rind Rot, leading to stalk drying, wilting, and rotting, resulting in reduced productivity and sugar quality. In the 2023/2024 growing season, a phenomenon called Sugarcane Wilt Syndrome (SWS) was also observed, characterized by the simultaneous association of *Phaeocystroma*, *Colletotrichum*, and *Fusarium*. The main etiological agent of SWS remains unknown, but its occurrence is attributed to climatic conditions, such as prolonged drought, which significantly influence the progress of the syndrome. The objectives of this study were to: (i) identify the fungi associated with Rind Rot and Sugarcane Wilt Syndrome (SWS) through morphological evaluation and molecular phylogenetic analysis; (ii) test the pathogenicity of representative isolates of the species found; and (iii) describe and document the symptoms observed in the field and in pathogenicity tests. In samples collected from the states of MG, GO, PE, and MS, the fungi *Phaeocystroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum*, and species of *Fusarium* from the *F. fujikuroi* complex were found associated with symptoms of Rind Rot and Wilt Syndrome. Based on morphological markers, *Phaeocystroma* and *C. falcatum* were identified. Through phylogenetic analysis of DNA sequences from ITS, LSU, and EF-1 α regions, seven isolates were identified as *P. sacchari*. The pathogenicity of *P. sacchari* and *C. falcatum* isolates was tested individually and in combination. Both fungi induced Red Rot symptoms in detached stalks, with *P. sacchari* alone causing less severe symptoms compared to the other treatments. In tests using detached leaves, only *C. falcatum* and the combination of both fungi induced Red Rot symptoms. With the method used, it was not possible to reproduce symptoms of wilting and stalk desiccation. Further tests should be conducted to clarify the causes of SWS onset. The information generated may contribute to plant health management and support breeding programs for resistant varieties

Keywords: *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium*, *Phaeocystroma*, *Saccharum* spp., molecular phylogeny.

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com 9 milhões de hectares plantados, além de ser o maior exportador de açúcar e etanol (CONAB, 2024). Contudo, a presença de doenças na cultura gera perdas qualitativas e quantitativas relevantes, impactando assim os ganhos nos processos produtivos (Rott, 2000). Por ser uma planta propagada de forma vegetativa, algumas doenças podem ser disseminadas por meio do uso de colmos infectados (Nithya et al., 2012).

Em consequência da proibição da queima da palhada na região Centro sul do Brasil e adoção da colheita mecânica, doenças anteriormente consideradas secundárias, tiveram aumento significativo de sua pressão de inóculo. A palhada permite a permanência dos fungos nas áreas de cultivo, resultando na alteração da epidemiologia das doenças (Nechet et al., 2021; Roese e Silva, 2021). Enquanto já existe literatura discutindo os efeitos dessa mudança de manejo sobre biomassa, população de nematoides e insetos praga (Dinardo-Miranda e Fracasso, 2013; Carvalho et al., 2017) o conhecimento do efeito sobre as doenças causadas por fungos ainda é incipiente.

A Podridão Vermelha, cujo agente etiológico é *Colletotrichum falcatum*, tornou-se uma das doenças mais importantes no Brasil após a mudança no manejo. O patógeno induz podridão interna avermelhada, intercalada com manchas brancas, podendo levar a inversão da sacarose, reduzindo a quantidade total de açúcar recuperável da planta. Frequentemente, espécies de *Fusarium*, como *F. sacchari*, *F. proliferatum* e *F. madaense*, são encontradas em associação aos sintomas da Podridão Vermelha (Costa et al., 2021; Dela Cueva et al., 2019; Viswanathan, 2021).

Entretanto, perdas crescentes têm sido registradas devido a uma doença conhecida como Podridão da Casca ou Podridão Azeda, cujo agente etiológico é conhecido como *Phaeocystroma sacchari* (Sutton, 1964). Anteriormente considerada uma doença secundária, após a mudança no manejo, tornou-se uma doença importante nos canaviais. Há relatos da ocorrência desta doença na Índia, no México e no Brasil, onde foram observados sintomas severos que levaram à morte de plantas (Carabez et al., 2014; Melo et al., 2023). Os sintomas induzidos por esse patógeno apresentam-se no colmo como podridão interna com uma coloração marrom-avermelhada a marrom-escuro, seguida de murchamento, dessecação e apodrecimento, com emissão de um odor azedo característico. Na superfície da casca podem ser observados cirros, que são fios negros espiralados, formados por inúmeros esporos. A doença se manifesta principalmente ao final do período de safra ou em períodos de escassez de chuva (Viswanathan et al., 2003).

No ano agrícola 2023/2024 foi observado ainda um fenômeno que recebe o nome Síndrome da Murcha da Cana-de-açúcar (SMC), com associação concomitante de *Phaeocystroma*, *Colletotrichum* e *Fusarium* (Renato Rosa, comunicação pessoal). Ainda não se conhece o agente etiológico principal da SMC, mas atribui sua ocorrência às condições climáticas, como um período prolongado de seca, que é uma influência relevante sobre o progresso dessa síndrome. Também, a mecanização das colheitas deixa grande quantidade de palhada, que serve como fonte de inóculo na área de cultivo. Essa doença causa a redução significativa na produtividade e na qualidade da matéria prima, já que reduz o teor de ATR (Açúcares Totais Recuperáveis). Na tentativa de amenizar o problema tomam-se medidas como a antecipação de colheita, o uso de controle químico e o desenvolvimento de variedades mais resistentes. Até então, essa doença está afetando todas as variedades comerciais de cana-de-açúcar.

Os objetivos deste estudo foram (i.) coletar e analisar material vegetal com sintomas de Podridão da Casca e da Síndrome da Murcha (SMC); (ii.) identificar os agentes etiológicos da Podridão da Casca e da Síndrome da Murcha (SMC) por análise de marcadores morfológicos e filogenia molecular; (iii.) testar a patogenicidade de isolados representativos das espécies encontradas; (iv.) descrever e documentar os sintomas observados em campo e em testes de patogenicidade; (v.) investigar se ocorre interação ou sinergismo quando *Phaeocystroma sacchari* e *Colletotrichum falcatum* coinfectam as plantas e qual seria a contribuição de cada agente etiológico na indução dos sintomas.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção de isolados e preservação

Isolados foram obtidos a partir de amostras de colmos com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha, coletadas em diferentes regiões produtoras do Brasil (Tabelas 1, 2 e 3). As amostras foram examinadas com auxílio de lupa para verificar a presença de estruturas de *Phaeocystroma*, *Colletotrichum* e de espécies de *Fusarium*. Posteriormente, foram submetidas ao isolamento direto e transferidas para placas de Petri contendo meio de extrato de malte 2% ágar (MA2%). Na ausência de estruturas, foi realizado isolamento indireto, no qual fragmentos das amostras foram esterilizados superficialmente, através da imersão em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 2% por 1 min, seguido de duas lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Em seguida, os fragmentos foram secos em papel filtro autoclavado e transferidos para placas de Petri contendo MA2% com estreptomicina. Após quatro dias, as colônias foram avaliadas, e os isolados obtidos transferidos em meio

Aveia-Agar (OA). Os isolados estão depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil (<http://www.dfp.ufla.br/cml/>).

2.2 Avaliação de marcadores morfológicos de *Phaeocytostroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum* e espécies de *Fusarium*

A avaliação dos marcadores morfológicos de *Phaeocytostroma sacchari* foi realizada por comparação com a literatura (Sutton 1964). Os fungos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio malte 2% (MA2%) e incubados em câmara tipo BOD a 25°C por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas. As colônias obtidas foram usadas para a avaliação da pigmentação (superfície e reverso). As características micromorfológicas, como forma e tamanho dos conídios (25–30 medições por isolado), formação de estroma e cirros, conidióforos e paráfises, foram avaliadas em meio Aveia-ágar (OA) sob temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, crescidos por um período de 10 a 15 dias em câmara BOD.

Para avaliação dos morfotipos dos isolados de *Colletotrichum falcatum*, os isolados foram cultivados em BDA por 10 dias, a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas, para determinação da cor micelial da colônia (superfície e reverso). As características morfológicas, como formato e tamanho dos conídios (25–30 medições por isolado) e formação de conidiomas, foram avaliadas em meio MA2% (Crouch et al., 2009).

Para a avaliação dos morfotipos de espécies de *Fusarium*, características dos isolados foram comparadas com a literatura (Leslie e Summerell, 2006; Costa et al., 2021). Os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados em câmara tipo BOD sob temperatura de 25°C por 4 dias no escuro para avaliação da coloração das colônias. As características micromorfológicas foram avaliadas em meio Synthetic Nutrient-poor Agar (SNA), submetidos às mesmas condições utilizadas no meio BDA. As características avaliadas foram: tamanho, formato, origem de macroconídios e microconídios, tipos de fiálides, presença de clamidósporos e produção de microconídios em cadeias ou falsas cabeças.

2.3 Extração de DNA, PCR e sequenciamento de regiões gênicas barcode

De isolados representativos de *P. sacchari*, foram preparadas culturas monospóricas mantidas em meio OA a 25°C, e submetidas a um fotoperíodo de 12h. Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio líquido de extrato de malte 2% por três dias, sob agitação de 100 rpm em um agitador orbital, à temperatura ambiente. O micélio foi filtrado, macerado em nitrogênio líquido e o DNA foi extraído utilizando o método CTAB (O'Donnell, 1992). O

DNA extraído teve sua concentração e qualidade verificadas em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e o produto da extração visualizado em gel de agarose 1,2%.

Para os isolados de *Phaeocytostroma sacchari*, foram amplificadas sequências de DNA correspondentes às regiões do espaçador interno transcrito (ITS), da subunidade grande (LSU) e do fator de elongação 1- α (EF1- α). Os pares de primers utilizados na amplificação da região ITS foram ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Para o gene LSU, foram utilizados os primers LROR (5'-ACCCGCTGAAGTTAAGC-3') e LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT-3') (Vilgalys e Hester, 1990). Para o gene Ef-1 α , utilizaram-se os primers Ef1-728F (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef1-986R (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'Donnell et al., 1998). As reações de PCR foram realizadas em termociclador MyCycler (BIO-RAD). As condições de ciclagem para a região ITS foram: 95°C, por 2 minutos, 30 ciclos: 95°C, por 15 segundos, 50°C, por 30 segundos, 72°C, por 50 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Para LSU as condições foram: 95°C, por 2 minutos, 45 ciclos: 95°C, por 15 segundos, 58 °C por 40 segundos, 72 °C, por 90 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Para EF-1 α as condições foram: 95°C, por 2 minutos; 45 ciclos: 95°C, por 15 segundos; 58 °C, por 40s, 72 °C, por 1 minuto, e 72°C, por 5 minutos (O'Donnell et al., 1998).

Ao final, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com GelRed (Biotium), e posterior visualização em um transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems MiniBis Pro®). Os fragmentos gênicos foram purificados e sequenciados nas direções senso e antisenso, em um sequenciador automático da empresa Psomagen, EUA, utilizando os mesmos primers usados nas reações de PCR.

2.4 Análise filogenética molecular

Os eletroferogramas gerados foram analisados usando SeqAssem (Hepperle, 2004) e depois comparadas com sequências das espécies-tipo dos fungos estudados, presentes no banco de dados GenBank, do National Center for Biotechnological Information (NCBI), por meio da ferramenta BLAST. Os alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados utilizando a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al., 1994) e implementados no software MEGA X (Kumar et al., 2018). Sequências de referência previamente obtidas do GenBank foram incluídas nos alinhamentos (Tabela 4). As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o método de máxima parcimônia (MP), com o uso do software MEGA X.

2.5 Teste de patogenicidade

Para os testes de patogenicidade, foi selecionado um isolado representativo de *P. sacchari* e *C. falcatum* (Tabela 1 e 2). Foi utilizada a variedade RB867515 de cana-de-açúcar para todos os testes realizados. Para a preparação do inóculo, *P. sacchari* foi cultivado em placas de Petri contendo meio OA, enquanto *C. falcatum* em placas de Petri contendo meio MA2%. As culturas foram incubadas em câmara BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por cerca de 15 dias. Foram realizados quatro ensaios: 1- suspensão de conídios aplicada em colmos seccionados, 2- suspensão de conídios aplicada em folhas destacadas, 3- suspensão de conídios aplicada na bainha de plantas estabelecidas em vasos, 4- inserção de disco de micélio com esporulação do fungo e suspensão de conídios na bainha de plantas estabelecidas em campo experimental. Para todos os testes, os isolados selecionados de *P. sacchari* e *C. falcatum* foram inoculados individualmente e em combinação. Os tratamentos utilizados foram: T-1 Controle; T-2 *C. falcatum*; T-3 *P. sacchari*; T-4 *C. falcatum* + *P. sacchari*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições por tratamento para todos os testes. O experimento foi realizado duas vezes, em momentos diferentes. As etapas dos postulados de Koch foram concluídas por meio do reisolamento dos patógenos a partir do tecido vegetal doente. A análise estatística foi realizada utilizando o software R, versão 4.0.0 (R core team, 2020). Após a verificação da normalidade e homocedasticidade das variâncias dos conjuntos de dados, por meio dos testes Shapiro Wilk e Bartlett. Em seguida, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Teste em colmos seccionados

O primeiro método foi utilizado com o objetivo de avaliar os sintomas induzidos internamente nos colmos e verificar se existe interação entre as espécies *P. sacchari* e *C. falcatum*. A inoculação foi realizada em seis colmos destacados, medindo 30 cm de comprimento, previamente desinfestados com álcool 70%. Ferimentos foram feitos em cada extremidade do colmo com um prego flambado, a uma profundidade de 1 cm. Foram inseridos 50 µL de suspensão de conídios na concentração de 2×10^6 conídios mL⁻¹, nos furos, que foram selados com parafilme. No tratamento controle, foi inserida apenas água destilada esterilizada. Os colmos inoculados foram acondicionados em bandejas e mantidas a 25 ± 2 °C e. Após 15 dias, foram realizados cortes longitudinais nos colmos para observação dos sintomas, e a lesão mensurada utilizando o programa ImageJ (adaptado de Costa et al., 2021).

Teste em folhas destacadas

O segundo método foi realizado para verificar os sintomas induzidos por *P. sacchari* e *C. falcatum* em folhas e avaliar se há interação entre as espécies. A inoculação foi realizada em seis folhas seccionadas, medindo 10 cm de comprimento. Foram feitos dois ferimentos na nervura central das folhas com uma agulha esterilizada, nos quais foram depositados 50 µL de suspensão de conídios, na concentração de 2×10^6 conídios mL⁻¹. As folhas foram sobre papel filtro umedecido com água destilada esterilizada, em placas de Petri de 150 mm, e incubadas a 25 ± 2 °C. A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação, e o diâmetro da lesão induzida foi mensurado com um paquímetro digital (adaptado de Dela Cueva et al., 2019; Marins et al., 2022).

Teste em plantas estabelecidas em vasos

O terceiro método foi realizado para avaliar se a bainha poderia servir como uma porta de entrada para os patógenos. Para a preparação das plantas, gemas pré-brotadas de cana-de-açúcar foram cultivadas em vasos de 10 L contendo solo, areia e substrato, na proporção de 2:1:1.

O inóculo foi preparado como uma suspensão de conídios em água destilada esterilizada, com concentração ajustada para 2×10^6 conídios mL⁻¹. A inoculação foi realizada em seis plantas, aplicando-se 2 mL da suspensão de conídios na bainha, dois meses após o plantio. Plantas inoculadas com água serviram como controle negativo. A avaliação foi realizada após 30 e 90 dias após a inoculação (DAI), quando foram feitos cortes longitudinais nos colmos para observação dos sintomas, os quais foram comparados com as descrições de Podridão da Casca e Podridão Vermelha (adaptado de Costa et al., 2021; Siti Nordahliawate et al., 2008; Viswanathan et al., 2003).

Teste em plantas estabelecidas em campo experimental

O quarto método foi realizado para verificar se o fungo é capaz de induzir sintomas da Podridão da Casca, com ou sem a ocorrência de ferimentos na planta, em condições de campo, utilizando plantas no período de colheita. A inoculação foi realizada por meio da inserção de disco micélio com esporulação do fungo nos colmos e da aplicação de 2 mL de suspensão de conídios na bainha, da mesma forma que nos ensaios anteriores. A avaliação foi realizada aos 30 e 90 dias após a inoculação (DAI), quando foram feitos cortes longitudinais nos colmos para observação dos sintomas, os quais foram comparados com as descrições de Podridão da Casca e Podridão Vermelha. Os tratamentos utilizados foram: Tratamento 1: Controle; Tratamento 2:

Inserção de disco de micélio; Tratamento 3: aplicação de suspensão de conídios (adaptado de Viswanathan et al., 2003).

3 RESULTADOS

3.1 Identificação de isolados por filogenia molecular

A análise filogenética obtida pelo método de Máxima Parcimônia para as regiões genômicas ITS, LSU e EF-1 α mostrou que os isolados obtidos neste trabalho pertencem a *Phaeocytostroma sacchari*, família Diaporthaceae. As topologias das árvores filogenéticas geradas para os genes individuais e concatenados foram congruentes, comprovando que os isolados obtidos pertencem ao gênero *Phaeocytostroma*, agrupando-se com sequências de isolados de referência de *P. sacchari* (Fig. 1).

3.2 Avaliação dos marcadores morfológicos

Os caracteres micromorfológicos dos isolados de *Phaeocytostroma sacchari* foram observados em meio OA. Foram identificados estromas imersos, e alguns apresentaram cirros pretos claramente definidos, estendendo-se acima do estroma. Foi possível observar conidióforos e células conidiogênicas formados dentro das cavidades do estroma, misturando-se com paráfises hialinas. Os conídios produzidos em meio OA apresentaram formato variando de elipsoidal a ovoidel, parede lisa, asseptados, marrom-claros, e tamanho variando de 11-14,5 x 3,5-5 μm . Em meio malte 2%, os isolados apresentaram uma coloração variando de branca a amarelada, com a formação de estromas (Fig. 2).

Na avaliação dos marcadores morfológicos de *Colletotrichum falcatum*, os isolados apresentaram características semelhantes às descritas na literatura. Em meio malte 2%, os isolados apresentaram uma coloração variando de cinza-claro a branco, com produção de esporodóquios de coloração alaranjada. Os conídios produzidos apresentaram formato falcado, eram hialinos e aseptados, com tamanho variando de 15-32,5 e 2,5-5 μm (Fig. 4).

Na avaliação dos marcadores morfológicos das espécies de *Fusarium* pertencente ao complexo FFSC, em meio SNA, os isolados apresentaram características semelhantes às descritas na literatura. Os isolados de *F. sacchari* apresentaram microconídios produzidos a partir de polifiálides, formando falsas cabeças, enquanto os isolados de *F. madaense* apresentaram longas cadeias de microconídios produzidos a partir de monofiálides (Fig. 3).

3.3 Patogenicidade

No primeiro teste, os colmos destacados inoculados com *Phaeocystostroma sacchari*, bem como na combinação das duas espécies, apresentaram uma podridão interna avermelhada, sem diferenciação dos sintomas. Os colmos inoculados com *Colletotrichum falcatum* apresentaram uma podridão interna avermelhada, intercalada com manchas brancas, diferenciando-se ligeiramente do sintoma induzido por *P. sacchari* e na combinação (Fig. 5). Em todos os tratamentos, os colmos inoculados produziram um odor azedo característico. Os sintomas induzidos por *P. sacchari* apresentaram menor severidade, enquanto no tratamento com *C. falcatum* e a combinação das duas espécies, não houve diferença estatisticamente significativa. (Fig. 6).

No segundo teste, com a inserção da suspensão de conídios na nervura central de folhas de cana-de-açúcar seccionadas, os isolados de *C. falcatum* induziram sintomas de vermelhidão na nervura central das folhas, com a formação de acérvulos, circundados por setas no local da inoculação (Fig. 7). As folhas inoculadas com *P. sacchari* apresentaram coloração avermelhada no ponto de inoculação, mas não na nervura central (Fig. 7). Na inoculação conjunta das duas espécies, observou-se também vermelhidão na nervura central, além da colonização por *C. falcatum* no ponto de inoculação (Fig. 7). Os sintomas induzidos por *P. sacchari* apresentaram menor severidade, enquanto *C. falcatum* não diferiu estatisticamente da combinação das duas espécies. (Fig. 8).

No terceiro teste, com a inserção da suspensão de conídios na bainha de plantas estabelecidas em vasos, os isolados de *C. falcatum* e *P. sacchari* não induziram os sintomas característicos da doença em colmos e folhas. Todas as plantas inoculadas apresentaram apenas uma lesão avermelhada no ponto de inoculação. Os sintomas não se manifestaram, mesmo quando as duas espécies foram combinadas (Fig. 9).

No quarto teste, foram inseridos discos de micélio de *P. sacchari* em plantas estabelecidas em campo experimental. Observou-se podridão interna de coloração avermelhada nos colmos, restrita ao ponto de inoculação localizado na região do entrenó. Não houve manifestação de sintomas ou sinais visíveis externamente. As plantas inoculadas com suspensão de conídios, aplicada na bainha, não apresentaram sintomas internos ou externos nos colmos (Fig. 9).

3. 4 Sintomas observados em Campo

Foi possível observar nos colmos uma podridão interna com coloração variando de marrom-avermelhada a marrom-escura, acompanhada de um odor azedo característico. Com a progressão da doença, os colmos murcharam, apresentando coloração marrom-clara bem acentuada no nó e, posteriormente, tornaram-se totalmente secos. Na superfície da casca, observou-se um escurecimento em comparação com plantas saudáveis. Fios negros espiralados foram facilmente visualizados na superfície da casca, estruturas que se disseminam com facilidade no campo (Fig. 11f). Nas áreas visitadas, foram encontrados colmos com estruturas do patógeno, confirmando a hipótese de que a palhada pode servir como fonte de inóculo e manutenção desse patógeno nas áreas de cultivo (Fig. 11 g).

4 DISCUSSÃO

Os resultados das análises filogenéticas, da avaliação dos marcadores morfológicos e dos testes de patogenicidade indicam que *Phaeocystostroma sacchari*, *Colletotrichum falcatum* e espécies de *Fusarium* estão associadas à doença da Podridão da Casca e à Síndrome da Murcha nos estados de MG, GO, MS e PE. Neste estudo, foram obtidos 31 isolados, com predominância de *P. sacchari* (n = 20), seguido por *C. falcatum* (n = 6), *F. madaense* (n = 3) e *F. sacchari* (n = 2).

No estado de Minas Gerais, os isolados de *P. sacchari* e *C. falcatum* foram obtidos de colmos ainda senescentes, e não foram observados fios negros espiralados. Esse achado sugere que o patógeno não está restrito apenas a colmos secos, mas também pode ser encontrado em colmos assintomáticos, o que indica que *P. sacchari* pode apresentar um comportamento endófito, vivendo dentro da planta sem causar sintomas imediatos. No entanto, essa hipótese precisa ser confirmada, pois foi levantada com base apenas em observações de amostras recebidas do campo. Não foi possível determinar o momento exato em que o patógeno penetra a planta, mas, com base em estudos de outros patossistemas que relataram a presença de *C. falcatum* no material de propagação levado ao campo, pode-se especular sobre uma dinâmica semelhante (Nithia et al., 2012).

No estado de Goiás, observou-se um cenário mais grave da doença, possivelmente influenciado por um período de estiagem mais severo. As amostras recebidas apresentaram sintomas intensos, com colmos completamente murchos e secos, nos quais *P. sacchari* predominou. Nessas mesmas amostras, foram encontradas as espécies *F. madaense*, *F. sacchari* e *F. proliferatum*, além de *C. falcatum*, agentes etiológicos da Podridão Vermelha no Brasil (Costa et al., 2021).

Observou-se a presença de acérvulos, estruturas assexuadas de *C. falcatum*, em colmos ainda senescentes, e sinais de *P. sacchari*, como fios negros espiralados na superfície da casca de colmos secos em campo. Esses sinais também foram observados em colmos remanescentes deixados sobre o solo após a colheita mecânica (Fig. 11, G). Essas estruturas são importantes como fonte de inóculo para esses patógenos, pois produzem conídios que podem ser disseminados no campo por gotículas de água provenientes de chuva ou irrigação, facilitando a permanência desses patógenos nas áreas de cultivo (Crouch et al., 2006; Sutton, 1964).

Os caracteres morfológicos da fase assexuada observados para os isolados de *P. sacchari* estavam de acordo com as descrições da literatura (Sutton 1964; Silvanesan e Waller 1986). Neste estudo, *P. sacchari* também foi identificado, por meio de filogenia molecular, como membro da família *Diaporthaceae*, a qual engloba patógenos comuns em associação com gramíneas, inclusive em cana-de-açúcar e milho. Um exemplo é a espécie *P. ambiguum*, patógeno importante do milho, causador de podridão das raízes e dos colmos (Kruger, 1965; Lamprecht et al., 2011; Aguiar et al., 2016). Espécies como *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis* são bem conhecidas como agentes causais da podridão da espiga, da podridão do colmo e da queima das folhas no milho (Crous et al., 2006; Marasas et al., 1979).

As características morfológicas dos isolados de *C. falcatum* estavam de acordo com a descrição da literatura. A espécie pertencente ao complexo de espécies *Colletotrichum graminicola* (CGSC), apresenta produção de conídios falcados, um marcador morfológico que a diferencia de outras espécies do mesmo gênero (Crouch et al., 2006; 2009).

As espécies de *Fusarium* encontradas neste estudo foram identificadas por marcadores morfológicos, pertencente ao Complexo FFSC, o qual já havia sido encontrado em cana-de-açúcar no Brasil (Costa et al., 2019). *Fusarium sacchari*, *F. madaense* e *F. proliferatum* são considerados agentes causais da Pokkah boeng da cana-de-açúcar no Brasil, doença caracterizada pela torção das folhas jovens e alterações morfológicas do topo da planta. No entanto, essas espécies não são específicas para a cana-de-açúcar, pois também causam doenças em milho, sorgo e milheto (Costa et al., 2019). A capacidade dessas espécies de infectar diferentes plantas hospedeiras podem ser importante para a entrada e permanência desses patógenos em novas áreas cultivadas, bem como para sua disseminação na cultura seguinte.

Nos testes realizados com colmos e folhas destacadas, *P. sacchari* apresentou a menor severidade em ambos, em comparação a *C. falcatum* e à combinação das duas espécies. Existem estudos ressaltando que *P. sacchari* é considerado um patógeno menos virulento, pois não consegue causar a doença sozinho, aproveitando-se da seca prolongada no final da colheita e

de canas já debilitadas para causar danos mais severos à cultura (Sutton 1964; Viswanathan et al., 2003).

Os sintomas induzidos no teste realizado em colmos destacados caracterizam-se por uma podridão interna avermelhada, induzida tanto por *C. falcatum*, por *P. sacchari*, e a combinação de ambos. No Brasil, testes realizados com *C. falcatum* e espécies de *Fusarium* induziram a podridão interna avermelhada no colmo, quando inoculados individualmente e em combinação (Costa et al., 2022). Enquanto, no teste realizado em folhas, apenas *C. falcatum* e a combinação induziram o sintoma de vermelhidão na nervura central da folha. Nas Filipinas, foi relatado que não somente *C. falcatum* pode induzir esse sintoma, mas também espécies de *Fusarium* (Dela Cueva et al., 2019). Contudo, a sintomatologia semelhante induzida em colmos e folhas destacadas pelos os três gêneros pode representar um grande desafio na identificação dos patógenos em campo, especialmente considerando que espécies de *Fusarium* também foram encontradas neste estudo.

Surge, portanto, um desafio nos canaviais brasileiros, onde esses três gêneros distintos estão sendo encontrados associados simultaneamente em plantas de cana-de-açúcar. Para tentar compreender esse fenômeno, foi nomeado como Síndrome da Murcha (SMC). Até o momento, não se tem a informação sobre qual é o agente causal responsável por induzir os sintomas de murcha e dessecação dos colmos, nem se pode inferir qual é a contribuição de cada um dos patógenos envolvidos na indução desses sintomas. No teste realizado em casa de vegetação, utilizando o método de aplicação da suspensão de conídios na bainha, nenhum sintoma interno foi observado nos colmos inoculados com as espécies testadas. No entanto, esse resultado pode estar relacionado s condições desfavoráveis para o desenvolvimento do fungo na planta, levando em consideração a temperatura, um estresse hídrico não foi fornecido para as plantas, ou até mesmo as plantas não terem chegado a um estágio fenológico adequado para ocorrer a doença. Existe um estudo, onde relata que a Podridão da Casca ocorre principalmente em período seco e final de colheita (Viswanathan et al., 2003). No teste, plantas inoculadas somente *P. sacchari*, utilizando o método do furo no entrenó, foi induzido uma podridão interna avermelhada, mais para o método de suspensão de conídios na bainha, não foi observado nenhum sintoma. Portanto, é necessário a realização de mais testes, para conseguir compreender esse patossistema e a contribuição de cada fungo encontrado no desenvolvimento dos sintomas induzidos.

Neste estudo, foram obtidos *Phaeocystostroma sacchari*, *Colletotricum falcatum* e espécies de *Fusarium* do complexo *fujikuroi* associados aos sintomas da Podridão da Casca e Síndrome da Murcha. Nos testes em colmos, tanto *C. falcatum*, quanto *P. sacchari* induziram

sintomas de podridão interna avermelhada. As informações obtidas representam relevante contribuição para o manejo fitossanitário e podem dar suporte a programas de seleção de variedades resistentes.

REFERÊNCIAS

- Aguiar FM, Lanza FE, Costa R. V, Silva DD, Lana UGP, Guimarães EA, Cota LV (2016) First report of *Phaeocystrostroma ambiguum* causing maize stalk rot in Brazil. Plant Disease 100: 2528.
- Conab (2024) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar, v.11, Safra 2023/24, n.3, terceiro levantamento, Brasília, p.1-56.
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553–556.
- Crouch JA, Clarke BB, Hillman BI (2009) 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.
- Carabez JS, Ascencio SO, & Pedraza JT (2014) First report of stalk rot disease of sugarcane caused by *Phaeocystrostroma sacchari* in Mexico. Plant Disease 98: 420-420.
- Costa MM, Silva BA, Moreira GM, Pfenning, LH (2021) *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. Plant Pathology 70: 1807-1818.
- Dai DQ, Wijayawardene NN, Bhat DJ, Chukeatirote E, Bahkali AH, Zhao RL, Xu JC, Hyde KD (2014) *Pustulomyces* gen. nov. accommodated in Diaporthaceae, Diaporthales, as revealed by morphology and molecular analyses. Cryptogamie Mycologie 35: 63–72.
- 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.
- O'Donnell K (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). Current Genetics 22: 213-220.
- 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.
- 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>>.

- Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Malden: Blackwell Publishers
- Lamprecht SC, Crous PW, Groenewald JZ, Tewoldemedhin YT, Marasas WF (2011) Diaporthaceae associated with root and crown rot of maize. IMA Fungus 2: 13-24.
- Melo JAS, Abreu VP, Teles TAS, Cunha MG (2023) Emergence of *Phaeocystostroma sacchari* in sugarcane plantations in Brazil. Journal of Plant Pathology 105: 1163.
- Marasas WFO, Westhuizen GCA van der (1979) *Diplodia macrospora*: the cause of leaf blight and cob rot of maize (*Zea mays*) in South Africa. Phytophylactica 11: 61–64.
- Monkai J, Phookamsak R, Xu S, Xu J, Mortimer PE, Karunarathna SC, Lumyong S (2022) *Pseudophaeocystostroma bambusicola* gen. et sp. nov. (Diaporthaceae) from bamboo in Yunnan, PR China. Phytotaxa 571: 39-51.
- Nithya K, Bukhari KA, Valluvaparidasan V, Paranidharan V, Velazhahan R (2012) Molecular detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease of sugarcane (*Saccharum officinarum*) using a SCAR marker. Annals of Applied Biology 160: 168-173.
- Nechet KL, Ramos NP, Halfeld-Vieira BA (2021) Impact of conservation practices on the severity of sugarcane foliar diseases. Australasian Plant Pathology 50: 487-494.
- Roese AD, Silva CJ (2021) Áreas preferenciais para recolhimento do palhico da cana-de-açúcar visando à redução de doenças. EMBRAPA Comunicado Técnico no. 264.
- Sutton BC (1964) Coelomycetes III. *Anellolacinia* gen. nov., *Aristastoma*, *Phaeocystostroma* *Seimatosporium* etc. Mycological Papers 97: 1–42.
- Sivanesan A, Waller JM (1986) Sugarcane Diseases. CMI Phytopathological Papers No. 29. CAB International UK. 88 pp.
- Stovold GE, Newfield A, Priest MJ (1996) Root and stalk rot of maize caused by *Phaeocystostroma ambiguum* recorded for the first time in New South Wales. Australasian Plant Pathology 25: 50-54.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W 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.
- Viswanathan R, Premachandran MN, Balamuralikrishnan M, Jothi R (2003) A new stalk rot disease of sugarcane caused by *Phaeocystostroma sacchari* in India. Sugar Tech 5: 61-64.
- Viswanathan R (2021). Red rot of sugarcane (*Colletotrichum falcatum* Went). CABI Reviews.

ANEXOS – FIGURAS E TABELAS

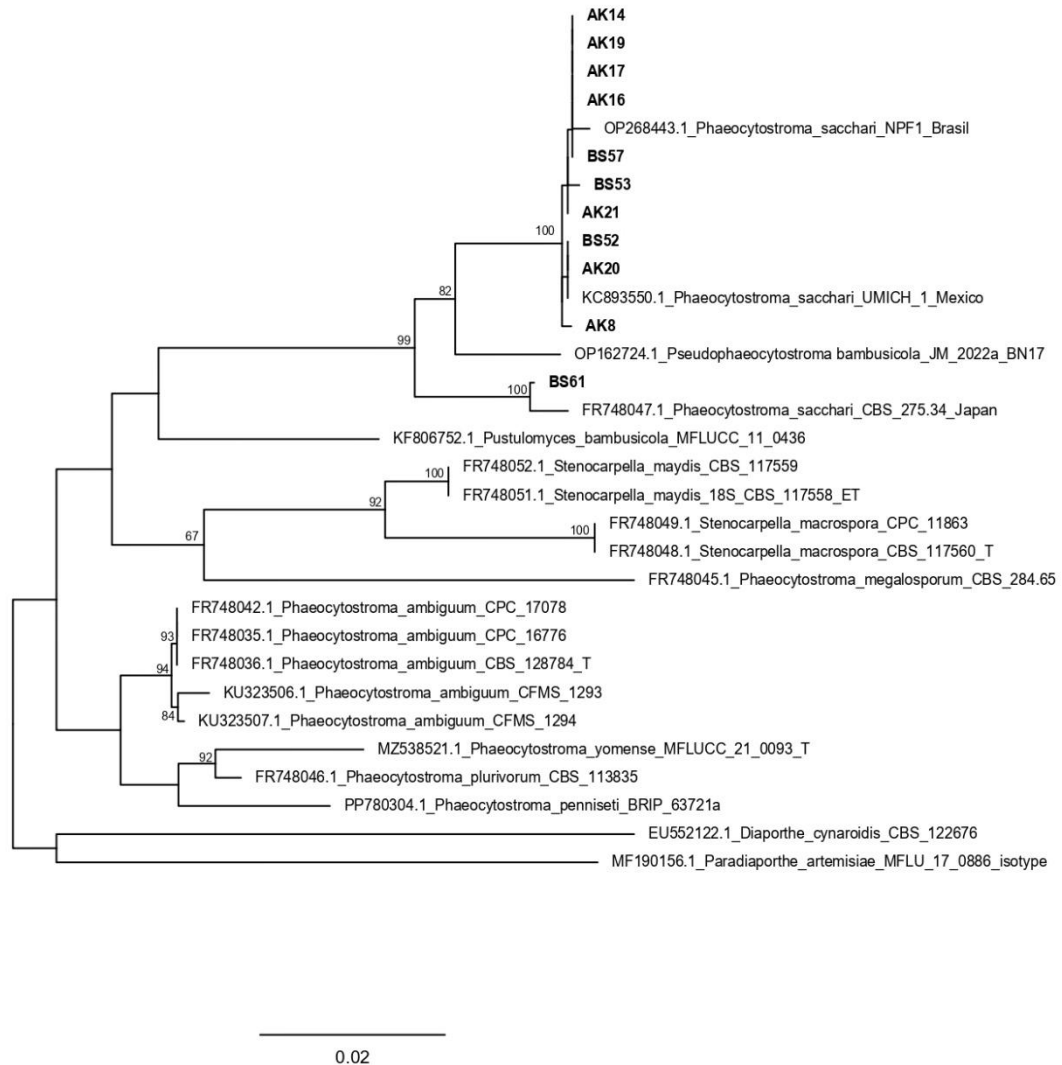


Figura 1. Árvore filogenética de Máxima Parcimônia (MP) inferida a partir de fragmentos do gene ITS, LSU e EF-1 α mostrando a relação filogenética de *Phaeocytostroma* com outras espécies da família *Diaporthaceae*. Codes BS e AK indicam isolados obtidos neste estudo. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) de MP $\geq 70\%$ são mostrados nos entrenós. Isolados ex-tipo e ex-epítipo são indicadas com T e ET, respectivamente.

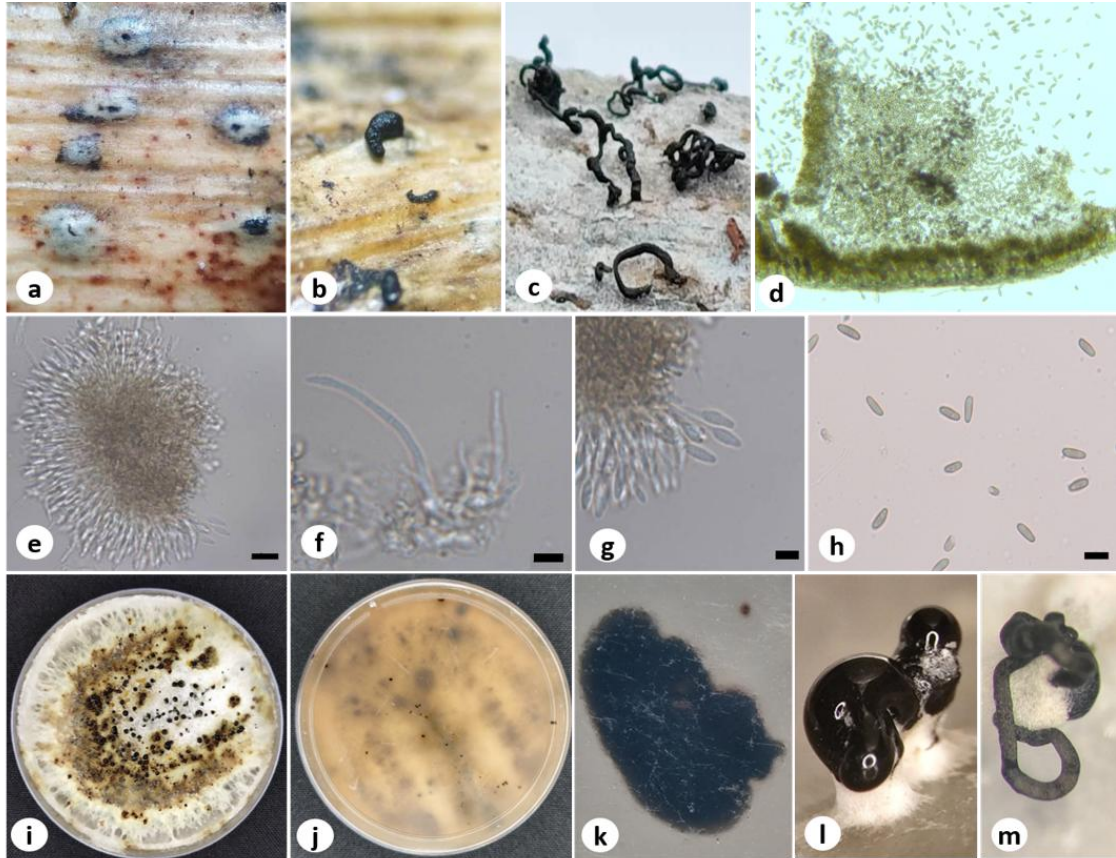


Figura 2: Características morfológicas de *Phaeocytostroma sacchari*. **a.** Conidiomata na superfície da casca **b-c.** Cirro conidial preto exsudando da conidioma **d.** Corte vertical de uma conidioma **e-f.** Célula conidiogênica e conidióforos **g.** Paráfises intercaladas entre os conidióforos **h.** Conídios **i-j.** Coloração de cultura em meio MA2% **k.** Estroma imerso em meio OA **l.** Estroma **m.** Cirros exsudando do estroma em meio OA. Barras: e = 10 μm , f = 5 μm , g = 5 μm , h = 10 μm .

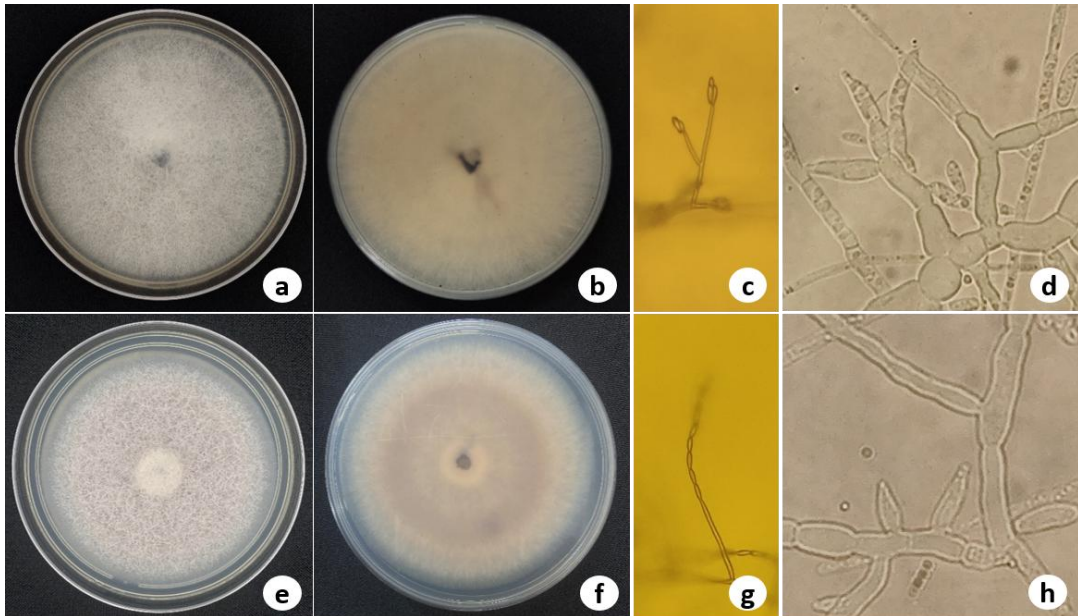


Figura 3: Características morfológicas de *F. sacchari* e *F. madaense*. *Fusarium sacchari* (a-d): **a-b.** Coloração de cultura em meio BDA, **c.** Microconídios em falsas cabeças **d.** Polifiáde **e-f.** *Fusarium madaense* (e-h): **e-f.** Coloração de cultura em meio BDA **g.** Monofiálide com conídios em cadeia **h.** Monofiálides.

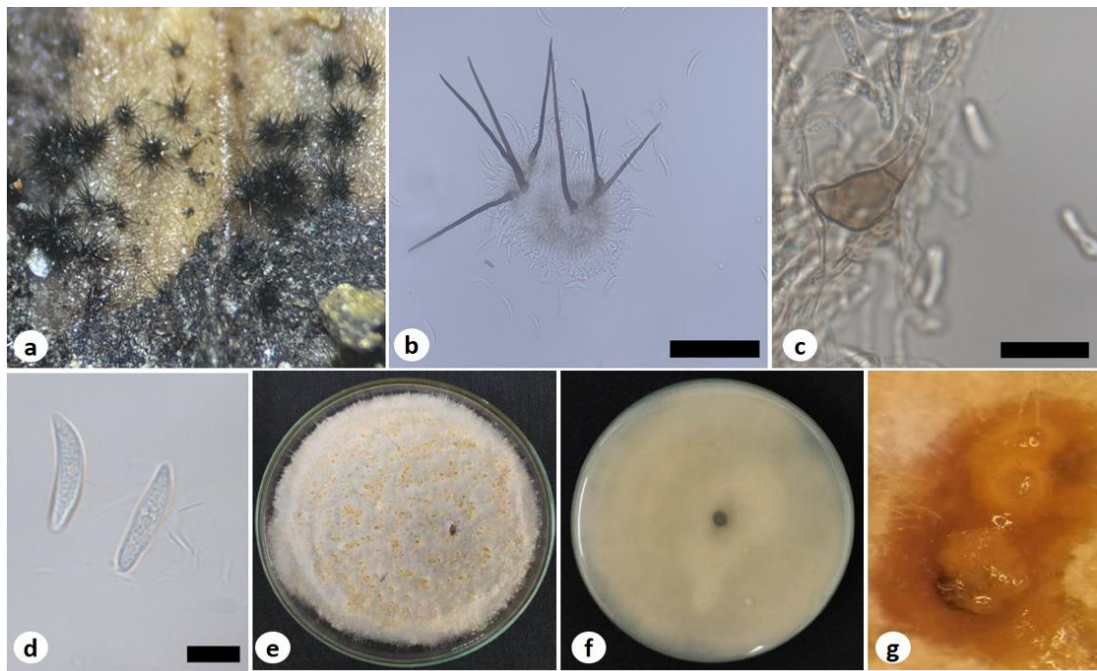


Figura 4: Características morfológicas de *Colletotrichum falcatum*. **a.** Acérvulos na superfície de colmos **b.** Cerdas septadas **c.** Apessório **d.** Conídios **e-f.** Coloração de cultura em meio BDA **g.** conidiomas laranja. Barras: b = 100 µm, c = 20 µm, d = 10 µm.

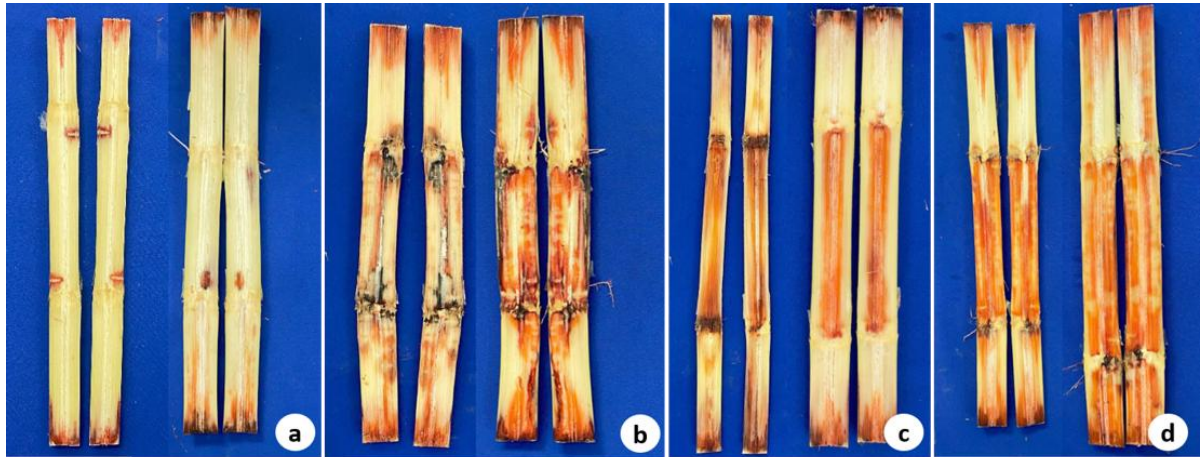


Figura 5: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por *P. sacchari* e *C. falcatum*, após inserção de suspensão de esporos em colmos seccionadas de cana-de-açúcar. Tratamentos: **a.** Controle; **b.** *Phaeocystostroma sacchari*; **c.** *Colletotrichum falcatum*; **d.** *P. sacchari* + *C. falcatum*.

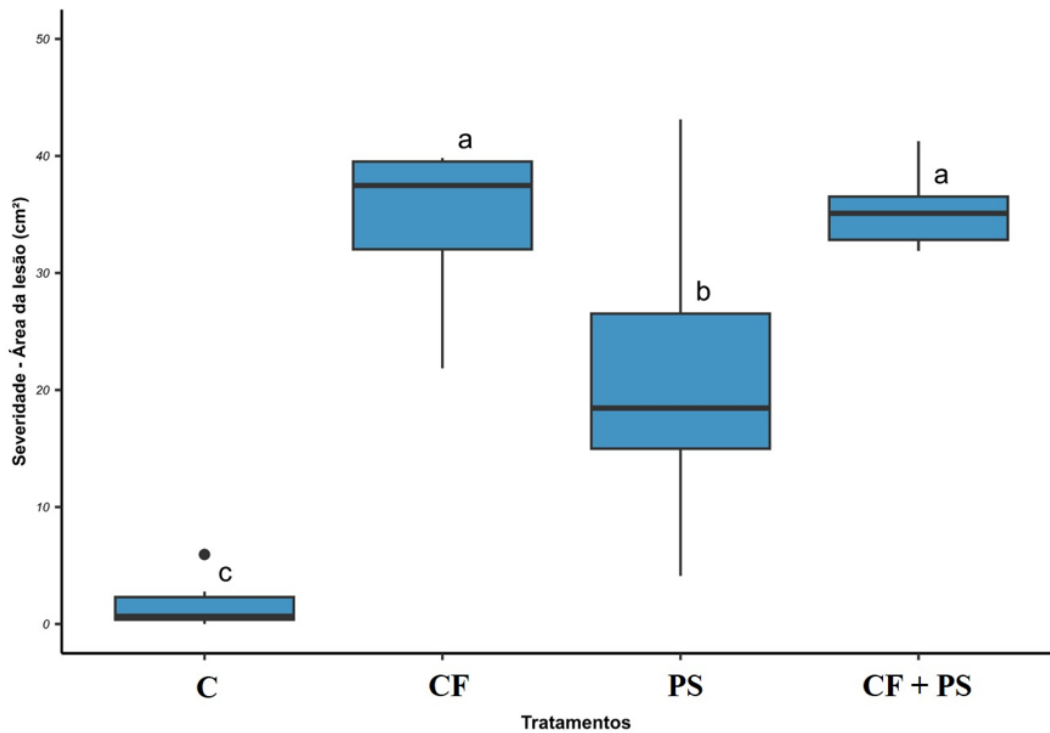


Figura 6- Severidade da Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzida por *P. sacchari* (PS), *C. falcatum* (CF) e *P. sacchari* + *C. falcatum*, após a inserção de suspensão de conídios em colmos seccionados. Resultado obtido por análise de variância ANOVA ($p \leq 0,05$). Letras distintas representam diferença estatística entre médias por Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

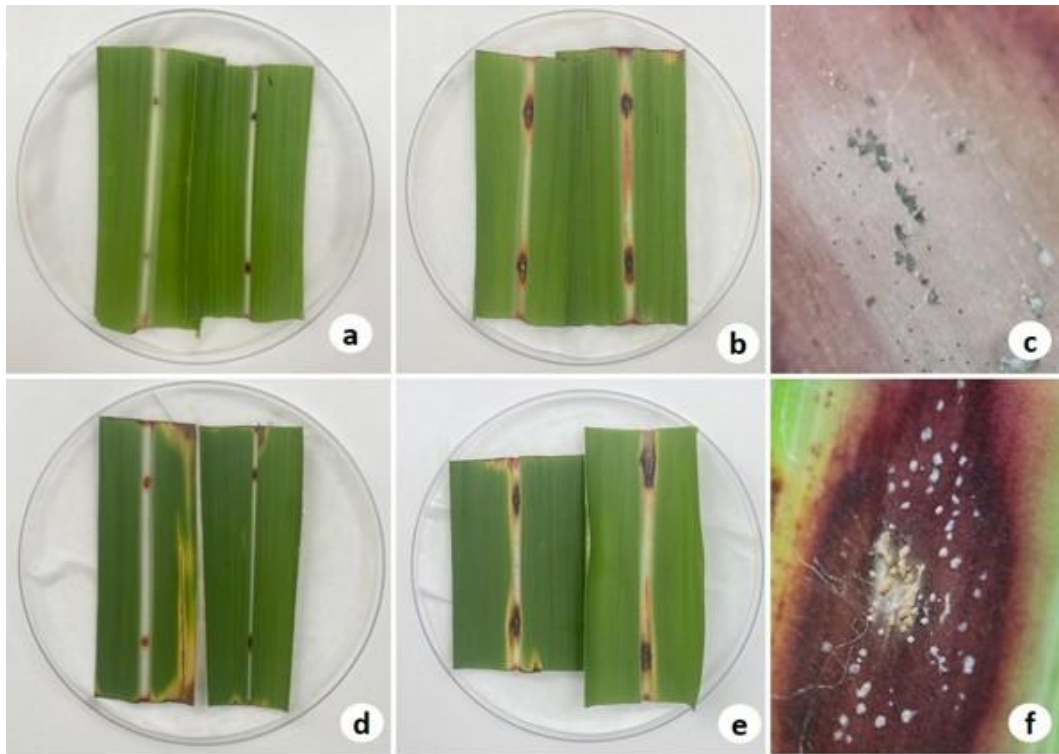


Figura 7: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por *P. sacchari* e *C. falcatum*, após a deposição de suspensão de conídios em folhas seccionadas de cana-de-açúcar. Folhas inoculadas com as seguintes espécies. **a.** Controle; **b.** *C. falcatum*; **c.** acervulos produzidos por *C. falcatum* na nervura central; **d.** *P. sacchari*; **e.** *P. sacchari* + *C. falcatum*; **f.** micélio aéreo produzido pela a combinação na nervura central.

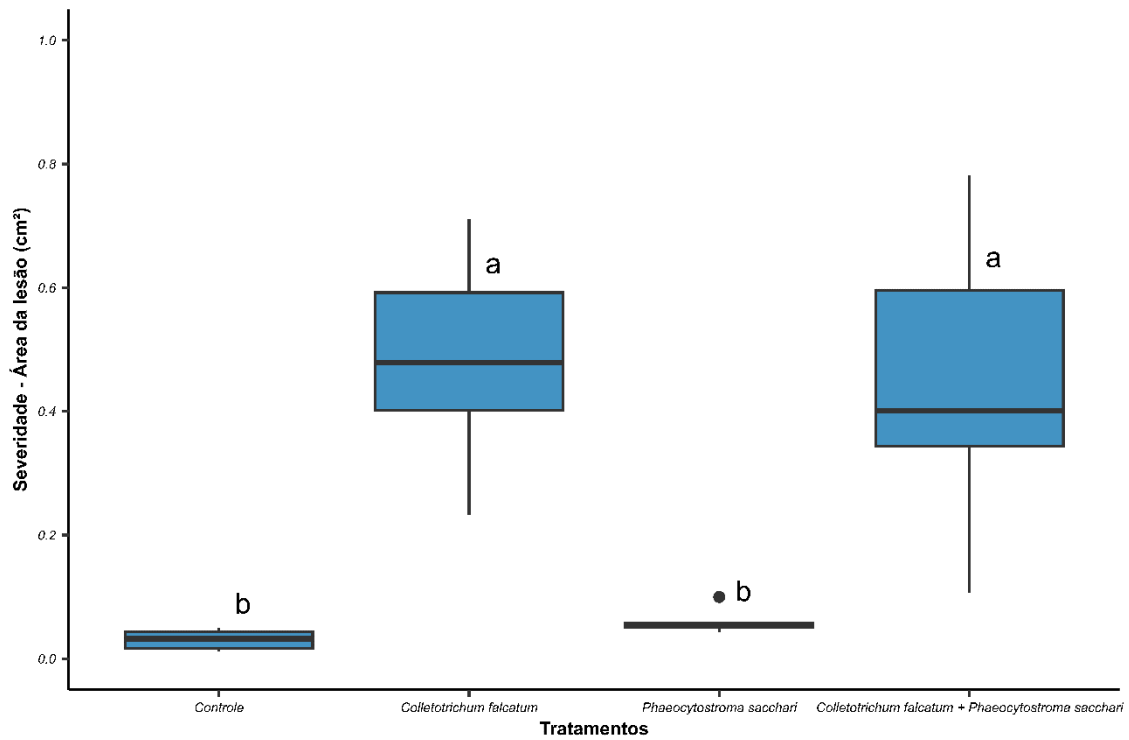


Figura 8- Severidade da Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzida por *P. sacchari*, *C. falcatum* e *P. sacchari* + *C. falcatum*, após a deposição de suspensão de conídios sobre folhas seccionadas. Resultado obtido por análise de variância ANOVA ($p \leq 0,05$). Letras distintas representam diferença estatística entre médias por Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



Figura 9: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por *P. sacchari* e *C. falcatum*, após inserção de suspensão de conídios na bainha em plantas de cana-de-açúcar. Tratamentos: **a-b.** Controle; **c-d.** *Colletotrichum falcatum* **e-f** *Phaeocystostroma sacchari*; **g-h.** *P. sacchari* + *C. falcatum*.



Figura 10: Sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha induzidos por *P. sacchari* e *C. falcatum*, após inserção de disco de micélio de esporulação de fungos e suspensão de conídios na bainha em plantas de cana-de-açúcar. Tratamentos: **a-d.** Suspensão de conídios; **e-h.** Inserção de disco de micélio. **a-b.** Controle, **c-d.** *P. sacchari*; **e-f.** Controle **g-h.** *P. sacchari*.



Figura 11: Sintomatologia da Podridão da Casca e Síndrome da Murcha, observada em campo. **a.** Descoloração da casca; **b-c.** Podridão interna avermelhada; **d-e.** Colmos murchos e totalmente secos; **f.** Exsudação de cirros, em formato espiralado na superfície da casca de *P. sacchari*; **g.** Colmos sintomáticos deixada em campo.

Tabela 1. Isolados obtidos de *Phaeocytostroma sacchari* colmo de cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Podridão Vermelha.

CML ¹	Código de trabalho ²	Origem Geográfica ³	Variedade	Nº de Acesso ao GenBank		
				TEF	LSU	ITS
4418	BS 52	Amarají PE	SP78-4764			
4433	BS 53	Tupaciguara MG	CTC 2			
4444	BS 57	Nova Ponte MG	RB92579			
4445	BS 61	Nova Ponte MG	CTC 2			
4474*	AK 8	Campo Florido MG	CTC 4			
4502	AK 10	Campina Verde MG	-			
-	AK14	Maurilândia GO	RB867515			
-	AK15	Maurilândia GO	IAC SP95-5094			
-	AK16	Itumbiara GO	-			
-	AK17	Itumbiara GO	IAC SP95-5094			
-	AK18	Bom Jesus GO	CTC9007			
-	AK19	Bom Jesus GO	RB975242			
-	AK20	Turvelândia GO	CTC20			
-	AK21	Turvelândia GO	CTC 4			
-	AK42	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK43	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK44	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK45	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK46	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK47	Ivinhema MS	RB92579			

¹CML= Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil

²Código de trabalho: BS = Bárbara Silva AK= Ana Karoline

³Estados Brasileiros: PE= Pernambuco; MG= Minas Gerais; GO= Goiás; MS= Mato Grosso do Sul

*Isolados usados nos testes de patogenicidade

Tabela 2. Isolados de *Colletotrichum falcatum* obtidos de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha.

CML ¹	Código de trabalho ²	Origem Geográfica ³	Variedade	Nº de Acesso ao GenBank		
				GAPDH	ACT	ITS
3861 *	-	Paranavaí PR	-			
-	AK 11	Campina Verde MG	-			
-	AK 12	Campina Verde MG	-			
-	AK28	Maurilândia GO	IAC SP9550-94			
-	AK29	Bom Jesus GO	CTC4			
-	AK40	Ivinhema MS	RB92579			
-	AK41	Ivinhema MS	RB92579			

¹CML= Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil

²Código de trabalho: AK= Ana Karoline

³Estados Brasileiros: PR= Pernambuco; MG= Minas Gerais; GO= Goiás; MS= Mato Grosso do Sul

*Isolados usados nos testes de patogenicidade

Tabela 3. Isolados do Complexo FFSC obtidos de colmos de cana-de-açúcar com sintomas de Podridão da Casca e Síndrome da Murcha no ano de 2021 e 2024.

CML ¹	Código de trabalho ²	Morfofoto	Origem Geográfica ³	Variedade	Nº de Acesso ao GenBank	
					TEF	RPB2
-	AK22	<i>F. madaense</i>	Maurilândia GO	CTC 4		
-	AK24	<i>F. sacchari</i>	Turvelândia GO	IACSP01-3127		
-	AK25	<i>F. sacchari</i>	Maurilândia GO	IAC SP95-5094		
-	AK26	<i>F. madaense</i>	Itumbiara GO	RB867515		
-	AK27	<i>F. madaense</i>	Maurilândia GO	-		

¹CML= Coleção Micológica de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil

²Código de trabalho: AK= Ana Karoline

³Estados Brasileiros: GO= Goiás; MS= Mato Grosso do Sul

Tabela 4: Sequências de DNA do material de referência utilizado nas análises filogenéticas de *Phaeocytostroma sacchari*.

Espécie	Código	Substrato	Local	ITS	LSU	TEF	Referências
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	CPC 16776	<i>Zea mays</i>	África do Sul	FR748035	FR748095	FR748067	Lamprecht et al. 2011
<i>Ph. ambiguum</i>	CBS 128784 T = CPC 17071	<i>Zea mays</i>	África do Sul	FR748036	n.a.	FR748068	Lamprecht et al. 2011
<i>Ph. ambiguum</i>	CPC 17078	<i>Zea mays</i>	África do Sul	FR748042	FR748101	FR748074	Lamprecht et al. 2011
<i>Ph. ambiguum</i>	CFMS 1293	<i>Zea mays</i>	Brasil	KU323506	-	KU351846	Aguiar et al. 2016
<i>Ph. ambiguum</i>	CFMS 1294	<i>Zea mays</i>	Brasil	KU323507	-	KU351847	Aguiar et al. 2016
<i>Ph. yomense</i>	MFLUCC 21-0093 T	Madeira submersa	Tailândia	MZ538521	MZ538555	-	Boonmee et al. 2021
<i>Ph. megalosporum</i>	CBS 284.65 T	Solo de arroz	Índia	FR748045	FR748103	FR748077	Lamprecht et al 2011
<i>Ph. plurivorum</i>	CBS 113835	<i>Helianthus annuus</i>	Portugal	FR748046	FR748104	FR748078	Lamprecht et al. 2011
<i>Ph. sacchari</i>	CBS 275.34	-	Japão	FR748047	FR748105	FR748079	Lamprecht et al. 2011
<i>Ph. sacchari</i>	n.i.	<i>S. officinarum</i>	México	KC893550	-	-	Carabez et al. 2014
<i>Ph. sacchari</i>	n.i.	<i>S. officinarum</i>	Brasil	OP268443	-	-	Melo et al. 2023
<i>Ph. sacchari</i>	n.i.	<i>S. officinarum</i>	Índia	OR430131	OR430348	.-	Gopi et al. 2022
<i>Ph. penniseti</i>	BRIP 63721a	<i>Penn. clandestinum</i>	Australia	PP780304	PP779796		Tan & Wong 2024
<i>Pustulomyces bambusicola</i>	MFLUCC 11-0436	<i>Bambusa sp.</i>	Thailand	KF806752	KF806753	KF806755	Dai et al. 2014
<i>Pseudophaeo. bambusicola</i>	M_2022a	<i>Bambusa sp.</i>	China	OP162725	OP162723	OP139362	Monkai et al. 2022
<i>Paradiaporthe artemisiae</i>	MFLUCC 17-1663 isotype	<i>Artemisia sp.</i>	-	MF190156	MF190101	MF377584	Senanayake et al. 2017
<i>Stenocarpella macrospora</i>	CBS 117560 ET	Híbrido de milho Bt	África do Sul	FR748048	DQ377934	MG934504	Lamprecht et al. 2011
<i>St. macrospora</i>	CPC 11863	<i>Zea mays</i>	África do Sul	FR748049	-	-	Lamprecht et al. 2011
<i>St. maydis</i>	CBS 117558 ET	Milho tradicional	África do Sul	FR748051	DQ377936	FR748080	Lamprecht et al. 2011
<i>St. maydis</i>	CBS 117559	Milho híbrido	África do Sul	FR748052	DQ377937	FR748081	Lamprecht et al. 2011
<i>Diaporthe cynaroidis</i>	CBS 122676	<i>Protea cynaroides</i>	África do Sul	EU552122			Marincowitz 2008