



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**

FABIANE VALÉRIA RÊGO DA ROCHA

ESPÉCIES DE *THIELAVIOPSIS* EM PALMEIRAS SELVAGENS E CULTIVADA

**SANTARÉM
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**

FABIANE VALÉRIA RÊGO DA ROCHA

ESPÉCIES DE *THIELAVIOPSIS* EM PALMEIRAS SELVAGENS E CULTIVADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para obtenção de grau de Mestre em Biodiversidade.

Orientador: Dr. Maruzanete P. de Melo

**SANTARÉM
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- R672e Rocha, Fabiane Valéria Rêgo da
Espécies de *Thielaviopsis* em palmeiras selvagens e cultivadas./ Fabiane Valéria Rêgo da Rocha. – Santarém, 2022.
63 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Maruzanete Pereira de Melo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade.
1. Ceratocystidaceae. 2. Análise filogenética. 3. *Bactris gassipaes*. I. Melo, Maruzanete Pereira de, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 584.5



Universidade Federal do Oeste do Pará
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE

ATA Nº 24

Em acordo com o Regimento do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará, a dissertação de mestrado é julgada por uma Banca Avaliadora não presencial, constituída por cinco avaliadores, sendo um deles obrigatoriamente externo ao curso, com título de doutor (Artigo 56 do referido regimento). O acadêmico é considerado aprovado quando ao menos três membros avaliadores emitirem pareceres aprovado. Alternativamente, o discente será dispensado da banca avaliação da dissertação, quando comprovar o aceite ou publicação de pelo menos um artigo resultante da sua dissertação, como primeiro autor, em co-autoria com orientador, ou orientador e coorientador quando o orientador for um docente colaborador, em periódico indexado com percentil mínimo de 75 (setenta e cinco) ou superior referente às métricas mais recentes do maior percentil utilizado pelo Journal Citation Reports (Clarivate) ou pelo Scientific Journal Rankings (Scimago), cabendo ao discente apenas a apresentação pública do trabalho (Artigo 58). O discente que teve sua dissertação aprovada deverá apresentá-la em sessão pública com duração de até 50 (cinquenta) minutos obrigatoriamente até no máximo 15 (quinze) dias após a aprovação, e no prazo máximo de vínculo com o curso, ou seja, 24 (vinte e quatro) meses após o início do primeiro semestre letivo do discente no curso (artigo 64). Assim, aos trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois, às quatorze horas, de forma remota através da plataforma GoogleMeet, instalou-se a apresentação de seminário público da dissertação de mestrado da aluna FABIANE VALÉRIA RÊGO DA ROCHA. Deu-se início a abertura dos trabalhos, onde o Professor Dr. MARUZANETE PEREIRA DE MELO, após esclarecer as normativas de tramitação da defesa e seminário público, de imediato solicitou a candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "ESPÉCIES DE *THIELAVIOPSIS* EM PALMEIRAS SELVAGENS E CULTIVADA". Concluída a exposição, o professor comunicou a discente que a versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo de 60 dias; contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante nos formulários de avaliação da banca. A banca examinadora foi composta pelos examinadores professores doutores listados abaixo. Os pareceres assinados seguem em sequência.

Documento assinado digitalmente
gov.br MARUZANETE PEREIRA DE MELO
Data: 05/09/2022 16:26:16-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

MARUZANETE PEREIRA DE MELO

FABIANE VALÉRIA RÊGO DA ROCHA

Discente

AGRADECIMENTOS

Quando iniciei minha Dissertação tinha em mente as experiências que havia vivido durante a Graduação, em que o processo de descoberta do meio acadêmico e de pesquisa foram intensamente compartilhados com amigos. No entanto, o processo de investigação e a escrita me exigiu uma postura mais introspectiva e, em alguns momentos, mais solitária. Como parte de um processo de amadurecimento da Fabiane enquanto pesquisadora e enquanto pessoa, separo as palavras a seguir para agradecer as pessoas que deram cor a esses anos e sempre me encorajaram a seguir em frente. Considerando a finalização dessa Dissertação em meio à pandemia do COVID-19, esses agradecimentos se tornam ainda mais especiais, já que os abraços precisarão esperar mais um pouco.

Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico, especialmente, este projeto de vida.

Especialmente a meu orientador, Professor Doutor Maruzanete Pereira de Melo, que sempre acreditou em mim. Agradeço a orientação exemplar pautada por um elevado e rigoroso nível científico, por sua amizade, cuidado e, sobretudo, sua paciência em todos os momentos, por seus ensinamentos, os quais contribuíram para enriquecer passo por passo, todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado.

À minha família, tios(as), primos(as), sobrinhos, enteadas, avós(os), padrasto, por apoiarem e compreenderem o meu isolamento em inúmeras tardes de domingo. À minha mãe, Vita Rocha e aos meus irmãos deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter uma família tão especial.

Ao meu esposo, Marlisson Feitosa, meu porto seguro, companheiro de todas as horas, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigada por permanecer ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros, sem a atenção devida e depois de tantos momentos de lazer perdidos. Obrigada pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

Aos membros do programa em Biodiversidade — PPGBEES, por todo ensinamento, formação e auxílios financeiros para o desenvolvimento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -- CAPES pela concessão de bolsa durante o mestrado.

Ao Dr. Professor Gilvan Pereira, pelo acolhimento no laboratório de Biologia Molecular – EMBRAPA, AM. Agradeço a todos que, de forma direta ou indiretamente, me auxiliaram a desenvolver minhas análises de sequenciamento molecular, algo que era novo em minha rotina acadêmica, em especial, ao Jefferson (Jerf) e Karina, por toda paciência e ensinamentos repassados sobre o universo da biologia molecular. Ao CNPq pelo financiamento de projeto de pesquisa processo CNPq 435363-2018/2.

À minha amiga, Liliane Castro e sua família, pela amizade, parceria e por terem me acolhido em Manaus.

Aos meus amigos antigos, e anjos que Deus colocou em meu caminho. Mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes na minha vida e estarão sempre em meu coração. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional. Amo vocês!

Às amigas de mestrado, por todos os momentos vividos, em especial à Beatriz, Laura e Suzane, pelo incentivo de sempre, e por terem segurado minha mão em momentos que achei que não fosse capaz, sou grata por tudo.

A Nossa Senhora e a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e, principalmente, por terem me dado uma família tão especial, enfim, obrigada por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

Por fim, o meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer).

RESUMO

Com o intuito de contribuir para o conhecimento dos fungos fitopatogênicos que estão associados às palmeiras selvagens e cultivadas que hospedam estes organismos, destacamos as espécies ou linhagens filogenéticas de fungos pertencentes à família *Ceratocystiaceae*, os quais onde estes causam doenças em palmeiras. Os fungos que induzem podridão em frutos e resinose em palmeiras compreendem correspondem às espécies do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Esta pesquisa tem como objetivos elucidar quais espécies de *Thielaviopsis* que se encontram associadas em espécies de palmeiras nativas e se estas espécies são patogênicas em espécies cultivadas. Esta dissertação resulta em dois capítulos com a realização dessa pesquisa. No capítulo I apresentados, amostras de frutos de espécies de palmeiras nativas com sintomas de podridão que foram coletadas nos estados do Pará e Piauí. Os isolados de *Thielaviopsis* obtidos de quatro espécies distintas de *Arecaceae* foram caracterizados com o uso do conceito de espécies morfológica e filogenética. A partir de análises filogenéticas, os isolados foram identificados como *Thielaviopsis ethacetica* e *Thielaviopsis cerberus*. Todos os isolados induziram sintomas de podridão negra em frutos de *Cocos nucifera*, *Ananas comosus*, e em colmos de *Saccharum officinarum*. Este estudo registra a ocorrência de *T. cerberus* no Brasil. O fato de ambas as espécies serem patógenos em espécies cultivadas, poderá ser uma ameaça para cultivos agrícolas. No capítulo II, a pesquisa teve como objetivo revelar o agente etiológico da podridão negra em frutos de pupunha. Frutos com sinais do fungo foram coletados, de onde obtivemos cinco isolados. Inicialmente, culturas monospóricas foram obtidas e, em seguida, realizamos a identificação morfológica e filogenética. Análises microscópicas revelaram conídios primários, secundários e aleuroconídios. Baseado em análises filogenéticas das regiões gênicas ITS e TEF-1 α , os isolados foram identificados como *Thielaviopsis ethacetica*. Todos os isolados induziram sintomas de podridão negra em frutos de pupunha das variedades amarela e vermelha. Este é o primeiro registro de *T. ethacetica* causando podridão negra em frutos de pupunha no Brasil.

Palavras-chave: *Ceratocystidaceae*. Análise filogenética. *Bactris gassipaes*. Complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Podridão pós-colheita.

ABSTRACT

In order to contribute to the knowledge of phytopathogenic fungi that are associated with wild and cultivated palm trees that host these organisms, it is worth highlighting species or phylogenetic lineages of fungi belonging to the Ceratocystiaceae family, where they cause diseases in palm trees. The fungi that induce fruit rot and resinosis in palm trees comprise the species of the *Thielaviopsis paradoxa* complex. This research aims to elucidate which *Thielaviopsis* species are associated with native palm species and if these species are pathogenic in cultivated species. Two chapters resulted from this research. In chapter I, samples of fruits from native palm trees with symptoms of rot were collected in the states of Pará and Piauí. *Thielaviopsis* isolates obtained from four distinct species of Arecaceae were characterized using the concept of morphological and phylogenetic species. From the analysis, the isolates were identified as *Thielaviopsis ethacetica* and *Thielaviopsis cerberus*. All isolates induced symptoms of black rot in *Cocos nucifera*, *Ananas comosus*, and *Saccharum officinarum* stalks. In chapter II, peach palm fruits showing symptoms of black rot were collected in markets and in an experimental area in the cities of the states of Pará and Acre, Brazil, in the years 2018-2019. The fruits showed symptoms of black rot with the formation of black mycelium on the fruits. Microscopic analysis revealed the presence of typical conidia of the genus *Thielaviopsis* sp. With monosporic cultures were obtained and nine isolated. Based on phylogenetic analysis of the ITS and TEF-1 α gene regions, the fungi were identified as *Thielaviopsis ethacetica*. All isolates induced symptoms of black rot in peach palm fruits of the yellow and red varieties. This is the first record of *T. ethacetica* causing black rot in peach palm fruits in Brazil.

Keywords: Ceratocystidaceae. Phylogenetic analysis. *Bactris gassipaes*., *Thielaviopsis paradoxa* complex., Postharvest rot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Sintomas e sinais de *Thielaviopsis* spp: A: Sintomas de resinose em estipe de babaçu. B-C: Presença de larvas de coleopteros em galerias em estipe de babaçu. D. Frutos de babaçu com sintomas de podridão. E: Sinais de *Thielaviopsis* na região penducular em frutos de babaçu. F: Secção demonstrando a colonização do fruto. G: Peritécios sobre casca de babaçu. H: Peritécios com exsudação de ascósporos. I: Sinais de *Thielaviopsis* em frutos de palmeira inajá. J: Sinais de *Thielaviopsis* em frutos de tucumã.37
- Figura 2 – Análise filogenética bayesiana de *Thielaviopsis* spp. isolados obtidos de palmeiras. A árvore foi construída usando sequências concatenadas dos genes ITS e TEF-1 α . Os valores de probabilidade posterior bayesiana $\geq 0,90$ são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. Foram indicadas sequências de isolados ex-type (T) e ex-epítipo (ET). A barra de escala (0,04) representa substituições de nucleotídeos por local. Esta árvore está enraizada com *Ceratocystis fimbriata*.38
- Figura 3 – Marcadores morfológicos de *T. cerberus* e *T. ethacetica*: A,B: Culturas de *T. cerberus*. C. Seta indicando a base do peritécio. D,E: Exsudação de ascósporos. F: Detalhe de pseudoperitécios. G-H: Detalhe peritécios. I: Detalhe de hifas da região estiolar do peritécios. J: Ascósporos. I.M.N: Conídios primários. O.P: Conídios secundários.39
- Figura 4 – Teste de patogenicidade em frutos de abacaxi: A: Detalhe da colonização do fungo, seguido do escurecimento da casca. B,C: Colonização de *Thielaviopsis ethacetica*, causando amolecimento da polpa.....40
- Figura 5 – Teste de patogenicidade em colmos de cana-de-açúcar: A-B: Sintoma de podridão, colonização de *T. cerberus*. C: Sintoma de podridão, colonização *T. ethacetica*.41

Figura 6 – Teste de patogenicidade em frutos de coqueiro. A: Frutos assintomático (Controle). B: Sintoma externo. C-D: Sintoma de podridão interna, colonizado por *T. ethacetica* e *T. cerberus*, respectivamente.....41

Figure 1 – *Thielaviopsis ethacetica*: a. Rot of the peduncle (arrow indicating injury). b. Sectioned fruit showing colonization of the seed. c. Symptom of pulp rot (arrow indicating injury). d. Black colonization of the pulp. e. Asymptomatic fruits (control). f. Inoculated fruit showing grayish-white mycelium. g. Inoculated fruit showing colonization of the pulp. 57

Figure 2 – Bayesian phylogenetic tree of *Thielaviopsis* spp. isolates from *Bractis gassipaes*. The tree was built using concatenated sequences of the genes ITS and TEF-1 α . Bayesian posterior probability values ≥ 0.90 are indicated above the nodes. The sequences generated in this study are highlighted in bold. Sequences from ex-type (T) and ex-epitype (ET) strains are indicated. The scale bar (0.04) represents nucleotide substitutions per site. This tree is rooted with *Ceratocystis fimbriata*.58

Figure 3 - *Thielaviopsis ethacetica*: a. Dark-colored mycelium. b-c. Primary conidia produced in chains. d, g: Rectangular-shaped secondary conidia. e. Secondary conidia with an oblong shape. f. Secondary conidia with an ellipsoidal shape. h. Secondary conidia (arrow) indicating thick walls. i. Aleuroconidia (arrows) indicating thick walls.59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados e sequências usada na análise filogenética neste estudo, a CABI: Commonwealth Agricultural Bureaux International Bioscience, formerly International Mycological Institute (IMI); CBS: Coleção de cultura CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CMM: Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil; CMW: Coleção de cultura do Instituto de biotecnologia de agricultura e floresta (FABI), University of Pretoria. Sequencia ex-type (T) isolados epitype (ET). bITS: internal transcribed spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene; TEF-1a: translation elongation factor 1-alpha gene..36

Tabela 2 - *Thielaviopsis* spp. isolados e sequências utilizadas na análise filogenética.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

PEEX – Programa Institucional de Ensino, Pesquisa e Extensão

PPGBEES – Programa de Pós Graduação em Biodiversidade

UFLA – Universidade Federal de Lavras

UFPI – Universidade Federal do Piauí

UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Qual é o problema da pesquisa?	15
1.1.2 <i>Thielaviopsis</i> e gêneros afins	16
1.1.3 Fitodoenças causadas por <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	17
1.1.4 Interação fungos fitopatogênicos x plantas nativas	18
1.2 COMO A PESQUISA FOI REALIZADA?.....	18
1.3 QUAL A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA?	19
1.4 AUTORES E INSTITUIÇÕES FINANCEIRAS.....	19
1.5 SUGESTÕES DE LEITURA	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 específicos	21
CAPÍTULO I	22
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	26
ISOLAMENTO DO FUNGO	26
EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	26
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	27
TESTE DE HOMOTALISMO	28
TESTE DE PATOGENICIDADE E AVALIAÇÃO DE AGRESSIVIDADE	28
COCOS NUCIFERA	28
ANANAS COMOSUS	29
SACCHARUM OFFICINARUM	29
RESULTADOS	30
ANÁLISE FILOGENÉTICA	30
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	30
Teste de patogenicidade (<i>Ananas comosus</i>).....	31
TESTE DE PATOGENICIDADE EM FRUTOS DE <i>COCOS NUCIFERA</i>	31
DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS	42
CAÍTULO 2	45
1 Introduction	47
2 Material and Methods.....	48
3 Results	50
4 Discussion	51
5 Author contributions.....	54
6 Acknowledgments.....	54
REFERENCES	60

CONHECIMENTO ACERCA DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS ÀS PALMEIRAS SELVAGENS

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 QUAL É O PROBLEMA DA PESQUISA?

Atualmente, não é novidade mencionar sobre a ampla diversidade que a Floresta amazônica abriga no território de 6.000.000 de km², sendo que o bioma Amazônico ocupa aproximadamente 49% do território brasileiro. É o maior bioma do Brasil e está situado, predominantemente, na Região Norte, abrangendo os estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins e Roraima, considerado assim, o maior bioma do Brasil.

A família de plantas Arecaceae possui ampla diversidade de espécies, popularmente conhecidas como “palmeiras”, apresentando atualmente 181 gêneros aceitos e cerca de 2.600 espécies. O porte imponente da maioria das espécies se dá em função de sua apresentação, cujo caule pode ser ramificado (mais raro) ou solitário, sempre com folhas recortadas e terminais no ápice do caule, formando uma “coroa” bastante vistosa.

No Brasil, existem cerca de 390 espécies de palmeiras, sendo a maioria, plantas nativas da Amazônia, estas espécies se encontram agrupadas em cerca de 40 gêneros. E desses 40 gêneros, destacam-se de forma regional e nacional os gêneros *Euterpe*, *Bactris*, *Astrocaryum*, *Oenocarpus* e *Jessenia*, que somam 20 espécies, com potencial econômico para o agronegócio.

Especificamente, a população local utilizam várias denominações para estas plantas. Conhecidas vulgarmente como: “buritis”, “tucumãs”, “inajás”, “marajás”, “jarinas” e “açáís”. Muitas palmeiras são de grande importância socioeconômica, servindo como fonte de alimento e fornecendo material para cobertura de moradias, madeira para construção e fibras para confecção de cordas, ornamentos e artesanatos.

1.1.2 *Thielaviopsis* e gêneros afins

Fungos da família Ceratocystidaceae são representados por importantes fitopatógenos como *Ceratocystis*, *Thielaviopsis*, *Huntia* e *Chalariopsis*. Estes gêneros de fungos são representados por importantes agentes causadores de importantes doenças de plantas. Globalmente, existem vários surtos de doenças causados por espécies de fungos pertencentes a esta família de fungos, sendo necessárias medidas criteriosas de manejo. *Thielaviopsis paradoxa* é um fitopatógeno polífago, amplamente distribuído em várias regiões do mundo, sendo um importante fitopatógeno em ampla gama de hospedeiros. Baseado no conceito de espécie morfológica, o fungo passou por diversas mudanças taxonômicas, primeiramente, foi denominado de *Sporoschisma paradoxum*, e posteriormente, de *Chalara paradoxa*, *Ceratocystis paradoxa* e *Thielaviopsis paradoxa*. Estudo utilizando abordagens modernas de biologia molecular revelou que, o que era denominado de *T. paradoxa* se desmembrou em várias espécies filogenéticas. Desta forma, *T. paradoxa lato sensu* se desmembrou em três grandes grupos. O primeiro grupo é representado pela espécie *Thielaviopsis radicola*, um importante fitopatógeno em várias espécies de palmeiras. Além dessa, uma nova espécie denominada de *Thielaviopsis cerberus* foi descrita. Anteriormente, este fungo era conhecido como *T. paradoxa*, este patógeno induz podridão pós-colheita em frutos de *Theobroma cacao*. O segundo grupo é composto pelas espécies *Thielaviopsis ethacetica*, sendo uma linhagem amplamente distribuída, apresentando ampla gama de hospedeiro. Apesar de não existir informações do centro de origem desta espécie, pesquisadores levantaram a hipótese de que este patógeno apresentava restrita distribuição, no entanto, existem evidências de que *T. ethacetica* emergiu para outros hospedeiros, através de atividades antrópicas. *Thielaviopsis ethacetica* foi detectada em áreas de sistema agroflorestal de cacau na África, devido à capacidade da lesão causada no teste de patogenicidade, evidencia este fungo como potencial patógeno emergente na cultura de *Theobroma cacao*. O terceiro grupo engloba as espécies *Thielaviopsis paradoxa stricto sensu* e *Thielaviopsis euricoi*, ambas induzindo podridão em frutos de dendezeiro e coqueiro.

Mais tarde, com o auxílio de sequenciamento de nucleotídeos e uso de marcadores moleculares, comprovou-se que *T. ethacetica* é representado por duas

linhagens emergentes, mesmo apresentando as mesmas características morfológicas, são geneticamente distintas. Acredita-se que uma destas linhagens poderia ter evoluído do continente africano em plantas nativas de *Elaeis guineenses*. Enquanto a segunda linhagem está associada à *Theobroma cacao* e *Ananas comosus*, espécie de centro de origem da América do Sul. Baseado na última pesquisa sobre a taxonomia de fungos da família *Ceratocystidaceae*, foi comprovado que esta família apresenta ampla diversidade de espécies. Isso só foi possível devido à redefinição das espécies dentro dos seus respectivos gêneros, este desmembramento foi possível graças à aplicação do conceito de espécie filogenética baseado no sequenciamento de DNA multigênico.

1.1.3 Fitodoenças causadas por *Thielaviopsis paradoxa*

No Brasil existem diversos registros de *Thielaviopsis paradoxa* (*syn. Ceratocystis paradoxa*) causando doenças em diferentes hospedeiros. Na cultura do abacaxizeiro, este patógeno induz doença pós-colheita, denominada de podridão negra. A polpa dos frutos adquire coloração negra devido à colonização dos frutos, seguido de amolecimento da polpa, depreciando o produto. Outro importante problema pós-colheita é a associação deste fungo em frutos de banana, induzindo uma doença denominada de podridão da coroa. Em palmeiras como coqueiro, *Thielaviopsis paradoxa*, basicamente, causa duas doenças denominadas podridão do fruto e resinose, esta última ocorre no estipe da planta, esta doença recebe esta denominação devido à liberação de líquido que escorre sobre a superfície do estipe.

Na costa Nordeste do Brasil, já foi registrado surto de resinose em coqueiro. Acredita-se, que este surto esteja relacionado à presença de insetos vetores do patógeno, merecendo destaque para *Rhynchophorus palmarum*. Além disso, *T. paradoxa* induz podridão em frutos de coqueiro. Os sintomas da doença se iniciam na região penducular, com a formação de sinais do patógeno. A doença evolui para sintomas de podridão da casca do fruto. Em outras plantas da família Arecaceae, como em frutos de pupunha foi registrada esta doença nos estados da região Norte do Brasil, onde se tem observado a podridão negra em frutos de pupunha.

Thielaviopsis paradoxa, induz duas doenças de importante interesse agrícola. A podridão abacaxi em cana-de-açúcar, esta doença é caracterizada devido à

podridão escura do tecido em colmos de *Saccharum*, esta doença recebeu esta denominação devido ao processo de apodrecimento quando, o fungo libera acetato de etila. Além da podridão, o fungo reduz a germinação das mudas de cana-de-açúcar. Enquanto, que, em frutos de abacaxi, esta doença é denominada de podridão negra.

1.1.4 INTERAÇÃO FUNGOS FITOPATOGÊNICOS X PLANTAS NATIVAS

Mecanismos evolutivos, como o salto de fungos entre hospedeiros, são estratégias importantes da sobrevivência de patógenos. Estes mecanismos contribuem para novos surtos de doenças por pragas exóticas invasivas, incluindo fungos fitopatogênicos. Pesquisas têm demonstrado a relação de fungos da família *Ceratocystidaceae* associadas às plantas nativas onde engloba *Thielaviopsis*. E em plantas da família *Arecaceae*, existem a constatação de *Thielaviopsis* causando podridão em frutos. Estudos conduzidos por pesquisadores sul-africanos, demonstraram que *T. ethacetica* tenha co-evoluído em plantas nativas de dendezeiro, podendo ter ocorrido a disseminação para plantas cultivadas da região. No entanto, as pesquisas com maior número de trabalhos que envolvem a associação de *Ceratocystidaceae* são representadas por *Ceratocystis* em árvores.

1.2 COMO A PESQUISA FOI REALIZADA?

Amostras de frutos de palmeiras selvagens como palmeira inajá, buriti, tucumã e babaçu foram coletadas. As amostras foram acondicionadas em embalagens com pedaços de algodão para a formação de câmara úmida. Dois dias após a incubação realizou-se o isolamento, transferindo fragmentos de micélio e esporos para meio de cultura batata, dextrose e ágar (BDA). Para a realização da identificação dos isolados empregou-se o conceito de espécie morfológica e filogenética. Na avaliação dos descritores morfológicos os isolados foram cultivados em meio extrato de Malte a 2%, em seguida foram avaliados os descritores morfológicos como: coloração de culturas, tipos de conídios, disposição da formação dos conídios, presença de aleuroconídios, formação ou não de peritécios, presença de apêndices periteciais e formato de ascósporos.

Para a avaliação do conceito de espécie filogenética, realizou-se a extração de DNA. Foram amplificadas partes das regiões *ITS* e *TEF1- α* . Após a obtenção das ampliações realizou-se o sequenciamento das amostras. Análises filogenéticas foram realizadas baseadas na inferência Bayesianas. Nestas análises, utilizamos sequências de nucleotídeos de referência das espécies do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Para confirmar a patogenicidade dos isolados, realizamos inoculações em frutos de abacaxi, coqueiro e colmos de cana-de-açúcar. Após a avaliação da patogenicidade, procedemos com o reisolamento para confirmar se os novos isolados são os mesmos que estavam causando a doença originalmente.

1.3 QUAL A IMPORTÂNCIA DA PESQUISA?

As poucas pesquisas que envolvem a identificação de fungos do gênero *Thielaviopsis*, foram realizadas com isolados obtidos de plantas cultivadas. No entanto, pesquisas que envolvem a interação deste gênero de fungo com plantas silvestres são raras. Os resultados desta pesquisa serão úteis para embasar futuras pesquisas, reforçando a hipótese de que plantas silvestres são importantes reservatórios de isolados de *Thielaviopsis*. Demonstrando assim, que este gênero de fungo apresenta estratégia de sobrevivência na ausência de plantas cultivadas.

Além disso, baseado nos resultados desta pesquisa, pode-se inferir que *Thielaviopsis spp.* co-evoluíram ao longo da história evolutiva em palmeiras selvagens e através de ação de agentes bióticos e abióticos o inóculo “salta” das plantas selvagens para plantas cultivadas, induzindo assim doenças importantes como podridão negra em frutos de abacaxi, podridão peduncular e resinose em coqueiro, podridão em colmos de cana-de-açúcar e podridão de frutos em cacauzeiro.

1.4 AUTORES E INSTITUIÇÕES FINANCEIRAS

Fabiane Valéria Rêgo da Rocha¹, Maruzanete Pereira de Melo², Gilvan Ferreira da Silva^{4,3}

1 – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-graduação em Biodiversidade; Bolsista Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; 2- Universidade Federal do Piauí;

3 – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Coordenador do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica da Embrapa Amazônia Ocidental

1.5 SUGESTÕES DE LEITURA

Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 535-544

de Beer ZW, Duong TA, Barnes IBD, Wingfield BD, Wingfield MJ (2014). Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology* 79:187-219

Gepp V, Hernández L, Alaniz S, Zaccari F (2013) First reports of *Thielaviopsis paradoxa* causing palm fruit rot *Butia capitata* in Uruguai. *New Disease Reports* 27: 12.

Mbenoun M, de Beer ZB, Wingfield MJ, Wingfield BD, Roux J (2014) Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. *Mycologia* 106:757-784.

Warwick DRN, Passos EEM (2009) Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology* 34:175-177.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar morfológicamente e identificar espécies de *Thielaviopsis* provenientes de palmeiras selvagens e cultivadas, assim como confirmar se os isolados obtidos de plantas selvagens induzem doenças em plantas de interesse agrônômico.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Coletar amostras de frutos com sintomas de podridão; Isolar, caracterizar morfológicamente e preservar isolados de *Thielaviopsis*;
2. Extrair DNA e amplificar fragmentos das regiões ITS e TEF 1 α e identificar através de análise filogenética;
3. Confirmar através de inoculações se isolados de *Thielaviopsis* são fitopatogênicos em frutos de pupunha;
4. Confirmar através de inoculação se os isolados são patogênicos em frutos de coqueiro, abacaxi e colmos de cana-de-açúcar.

CAPÍTULO I

ESPÉCIES DE *THIELAVIOPSIS* ASSOCIADO EM PALMEIRAS SELVAGENS¹

Fabiane Valéria do Rego, Gilvan Ferreira da Silva, Sarah da Silva Costa, Patrícia Gomes Cardoso, Francisco Alcântara Neto, Solange Maria de França, Maruzanete Pereira de Melo.

Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biologia e Florestal, Santarém, PA, Brazil.

Embrapa Amazônia Ocidental, Rod AM 10, Km 29, 69010-970, Manaus, AM, Brazil

Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Iningá, 64049-550, Teresina, PI, Brazil.

Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, 37200-900, Lavras, MG, Brazil

Correspondence author: Maruzanete Pereira de Melo (fitomaru@gmail.com)

¹ O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão para o periódico *Mycological Progress*, journal que publica artigos científicos que envolvem a taxonomia e a classificação de novas espécies e a interação fungos x plantas. Esta pesquisa teve cooperação científica de pesquisadores de várias instituições como: Embrapa Amazônia Ocidental, Universidade Federal de Lavras, Universidade Federal do Piauí e Universidade Federal do Oeste do Pará.

RESUMO

Palmeiras nativas hospedam diversos fungos fitopatogênicos, dentre estes, merecem destaque espécies ou linhagens filogenéticas de fungos pertencentes à família *Ceratocystidaceae*. Os fungos que induzem podridão em frutos e resinose em palmeiras compreendem as espécies do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Esta pesquisa teve como objetivos elucidar quais espécies de *Thielaviopsis* se associam com espécies de palmeiras nativas e se estas espécies são patogênicas em espécies de interesse agrônomo. A partir de análises filogenéticas multigênicas (ITS e *TEF*), os isolados foram identificados como *Thielaviopsis ethacetica*. Enquanto, que, utilizando a avaliação dos marcadores morfológicos, cinco isolados foram identificados como *Thielaviopsis cerberus*. Com os isolados de *T. ethacetica* observou-se a produção de conídios primários, secundários e aleuroconídios. Enquanto que, nos isolados de, *T. cerberus*, produziu conídios primários, aleuroconídios e peritécios com ascósporos viáveis. Todos os isolados induziram sintomas de podridão negra em frutos de *Cocos nucifera*, *Ananas comosus* e *Saccharum officinarum*. Este estudo evidencia que espécies de palmeiras nativas são reservatórios para espécies de *T. ethacetica* e *T. cerberus*. Este estudo revela a primeira ocorrência de *T. cerberus* no Brasil, fungo quarentenário que pode ser uma ameaça para plantas de interesse agrônomo.

INTRODUÇÃO

No trópico úmido amazônico existe ampla diversidade de espécies nativas de *Arecaceae*, estas plantas são utilizadas pela população local na fabricação de artesanatos e os frutos para fins de alimentação. As espécies predominantes de palmeiras na região do trópico úmido e Nordeste do Brasil são: *Austrocaryum vulgare*, *Attalea speciosa*, *Attalea maripa* e *Mauritia flexuosa*. Apesar desta diversidade de espécies e sua importância, as pesquisas com este grupo de plantas necessitam de mais estudos, especificamente, quando envolve a diversidade de microrganismos fitopatogênicos (MIRANDA *et al.*, 2010).

Fungos da família *Ceratocystidaceae* são encontrados em plantas nativas em diversas regiões do mundo. Na África do Sul, foi relatada a associação de *Ceratocystis albifundus* em plantas nativas de *Protea gaguedii*, geralmente infecções nestes hospedeiros nativos não são caracterizadas como doença, no entanto, atualmente, este patógeno é endêmico em várias espécies de árvores do gênero *Protea spp.* Mais tarde confirmou-se surto de murcha, causado por *C. albifundus* em plantações de *Acacia mearnsii* (ROUX *et al.*, 2007). No Havaí, foi constatada a devastação de florestas nativas de *Metrosideros polymorpha*, sendo *Ceratocystis lukuohia* e *Ceratocystis huliohia* como agentes etiológicos (BARNES *et al.*, 2018). *Huntia* é outro gênero da família *Ceratocystidaceae* associado a plantas nativas. Recentemente, foram descritos *Huntia krugeri* e *Huntia hellenica*, induzindo murchas em espécies de árvores nativas (LIU *et al.*, 2020). Foi constatada a ocorrência natural de *Thielaviopsis ethacetica* e *Thielaviopsis paradoxa* causando podridão negra em frutos de palmeiras nativas de *Sallaca zalacca* e *Butia capitata* (WULANDARI; AHMAD, 2018; GEEPP *et al.*, 2013).

Espécies de vários fungos apresentam capacidade de migração de um hospedeiro para o outro, este evento é importante no processo de co-evolução, levando a diversificação e sobrevivência do patógeno. Este salto de hospedeiro é um processo pelo qual os patógenos se estabelecem em novos nichos. Esta mudança de hospedeiro é uma das forças evolutivas, permitindo a adaptação do patógeno e surgimento de numerosas doenças emergentes de etiologia fúngica (LEE *et al.*, 2016; THINES, 2019).

O movimento e dispersão de inóculo de fungos da família *Ceratocystidaceae* ocorre, principalmente, através da ação de insetos, aliando a formação de injúrias e

galerias, potencializando assim a ocorrência da infecção e colonização fúngicas. Existem algumas associações de fungos da família *Ceratocystidaceae* que apresentam relação mutualística com insetos principalmente besouros causadores de injúrias em casca de árvores e palmeiras (MAYES *et al.*, 2020; MBENOUM *et al.*, 2015).

Devido ao uso de ferramentas de biologia molecular, com o emprego de sequenciamentos de nucleotídeos, os fungos pertencentes à família *Ceratocystidaceae* passaram por profundas mudanças taxonômicas. Merece destaque o gênero *Thielaviopsis*, pois, ao consultar a literatura básica, observamos que *Thielaviopsis paradoxa* s. lat foi com diferentes nomes, como *Spororischima paradoxum* de Seynes, *Chalara paradoxa* de Seynes e *Ceratocystis paradoxa* de Seynes. Atualmente, empregando o conceito de espécie filogenética, através do uso moderno de ferramentas moleculares, a maioria destes nomes é rejeitada ou invalidada. Sendo, assim, o que era denominado *Thielaviopsis paradoxa* (sin: *Ceratocystis paradoxa*), foi ampliado para seis espécies geneticamente distintas. De acordo com o novo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (MCNEILL *et al.* 2012), das espécies que compreendem o complexo *Thielaviopsis paradoxa*, a sinonímia *Ceratocystis*, não será mais utilizada para fungos pertencente ao complexo *T. paradoxa*, enquanto, o nome *Chalara* declinou taxonomicamente, sendo substituído por *Chalariopsis* de (De BEER *et al.* 2014). O complexo compreende as espécies filogenética e biológica. *Thielaviopsis ethacetica*, *T. cerberus*, *T. euricoi*, *T. musarum*, *T. radicolica* e *T. paradoxa*, que são os representantes do complexo. Estas espécies são importantes patógenos, em diversas espécies de plantas cultivadas (MBENOUN *et al.*, 2014).

No Brasil, são raras as pesquisas que mencionam plantas nativas como reservatórios de fungos fitopatogênicos, além disso, dentre as pesquisas que existem, algumas apresentam identificação errônea, em função de utilizar apenas a caracterização morfológica. Sendo assim, esta pesquisa pretende realizar o levantamento de isolados de *Thielaviopsis* spp obtidos de palmeiras silvestres e pretende responder as seguintes perguntas: (i) quais são as espécies de *Thielaviopsis* associadas a palmeiras selvagens na região amazônica? (ii) Isolados de *Thielaviopsis* são patogênicos em plantas cultivadas?

MATERIAL E MÉTODOS

ISOLAMENTO DO FUNGO

Frutos das palmeiras nativas de *Austrocaryum vulgare*, *Attalea speciosa*, *Attalea maripa* e *Mauritia flexuosa* com sintomas de podridão negra foram coletados nos estados do Pará e Piauí, no Brasil. Primeiramente, procedemos com o isolamento direto, sendo que micélio e cirros de ascósporos foram transferidos para a placa contendo BDA. Em seguida, as placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12h. Após o crescimento, colônias com aspecto do gênero *Thielaviopsis* foram transferidas para a placa contendo meio extrato de malte.

Inicialmente, foi realizado cultivo monospórico com objetivo de obter culturas geneticamente puras. Preparamos uma suspensão de esporos com objetivo de obter culturas monospóricas. Após a germinação, os esporos foram transferidos com auxílio de seringa hipodérmica para a placa de Petri contendo extrato de malte a 2%. Após a obtenção de culturas monospóricas os isolados foram mantidos em microtubos de 2 ml, contendo água destilada e esterilizada. Os isolados foram depositados na Coleção de Cultura de Fungos “fitopatogênicos Maria Menezes” CMM-UFRPE (Tabela 1).

EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Isolados monospóricos, foram cultivados em meio extrato de Malte, após sete dias de crescimento, realizamos raspagem das culturas para obtenção de micélio. Os fragmentos de micélio foram transferidos para microtubos de 1,5 ml para extração de DNA genômico usando o *Axy Prep Multisource Kit Genomic DNA Miniprep* (Axygen Biosciences®). As análises filogenéticas foram realizadas com sequências de DNA de duas regiões gênicas: Fator de alongação EF-1 α e ITS. Os seguintes pares de *primers* foram utilizados nas reações de PCR e de sequenciamento: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a região ITS (White et al. 1990), EF1F (5'-

TGCGGTGGTATCGACAAGCGT-3') e EF2R (5'-AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG-3') para EF-1 α (JACOBS *et al.* 2004).

As PCRs foram realizadas com as seguintes concentrações: 12.5 μ L *Taq PCR Master Mix 2x*, 2 μ L de cada *primers* (reverse e forward) e 9 μ L de água ultrapura, totalizando um volume final de 25 μ L. As condições das reações seguiram recomendações dadas pelos respectivos autores de cada par de *primers*. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de *agarose* 1% corado com *GelRed* (Biotium®), com posterior visualização realizada em um transluminador. O comprimento dos fragmentos amplificados foi comparado com um marcador de comprimento de fragmentos 1 Kb. Os fragmentos amplificados purificados utilizando-se o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Brasil, São Paulo, BR).

Os fragmentos dos genes foram sequenciados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Amazonas, Brasil. Os eletroferogramas gerados foram analisados visualmente com o auxílio do programa *SeqAssem* (HEPPERLE, 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados *GenBank*, do *National Center for Biotechnological Information* – NCBI, por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Sequências de referência correspondentes a ITS e EF-1 α das espécies do complexo *T. paradoxa*, previamente depositadas no *GenBank*, também foram acrescentadas às análises (Tabela 1). No programa MEGA 6® (TAMURA *et al.* 2013), foram feitos os alinhamentos múltiplos das sequências utilizando-se a ferramenta *CLUSTALW* (THOMPSON *et al.* 1994). Foram também realizadas análises filogenéticas com base no princípio da Inferência Bayesiana, utilizando o *software Mr Bayes* 3.1.2 (RONQUIST *et al.* 2012). Foram obtidas árvores filogenéticas para cada região gênica isoladamente, bem como árvores combinadas.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Baseados na morfologia da colônia e na origem dos isolados foram selecionados 16 isolados para a caracterização morfológica. Os isolados foram cultivados em meio de cultura Extrato de Malte (MEA); com a presença de chips de colmos de *Saccharum* esterilizados que foram depositados sobre a superfície do meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa incubadora a 25 °C com

fotoperíodo de 12h. Foram realizados microcultivos, visando observar as estruturas fúngicas. Os fragmentos de micélios foram transferidos para pequenos blocos de meio de cultura MEA, em seguida, uma lamínula foi depositada sobre o bloco, e então, incubada em câmara úmida por 72 horas. As lâminas foram incubadas em câmara úmida durante cinco dias a 25 °C. As preparações microscópicas foram observadas em microscópio binocular comum. As estruturas morfológicas foram mensuradas utilizando o microscópio Zeiss (n = 30) (MBENOUN et al., 2015).

TESTE DE HOMOTALISMO

Para induzir a formação de peritécios, os isolados de *T. cerberus* foram cultivados em meio de cultura Malte a 2%, em seguida, as placas foram incubadas no escuro durante o experimento e avaliadas diariamente. Com objetivo de avaliar a viabilidade dos ascósporos, após a exsudação cirros de ascósporos, foram transferidos para meio de cultura contendo extrato de Malte (MBENOUN et al., 2014).

TESTE DE PATOGENICIDADE EM *COCOS NUCIFERA*

Para confirmar a patogenicidade dos isolados, frutos de *Cocos nucifera* sadios foram selecionados. Quarenta frutos foram desinfestados superficialmente com hipoclorito de sódio (0,3 %) durante cinco minutos e, em seguida, lavados com água esterilizada. Discos de micélio com diâmetro de (0,4 mm) de ambas as espécies de *Thielaviopsis* foram removidos de culturas com sete dias de idade. Os discos foram depositados na região do pedúnculo, em seguida foi umedecido com 1 ml com água destilada esterilizada. Para os frutos testemunhas foram depositado discos de 0,4 mm sem a presença do fungo. Cada fruto foi armazenado em sacolas plásticas, com objetivo de formação de câmara úmida. O ensaio foi montado utilizando-se cinco frutos para cada isolado, sendo que quatro frutos foram inoculados com o fungo e um fruto como controle. No momento da avaliação, os frutos foram seccionados para avaliar a colonização da polpa. Para confirmar a patogenicidade, pequenos fragmentos dos tecidos dos frutos inoculados foram

desinfestados com hipoclorito de sódio durante dois minutos, em seguida, lavados em água destilada esterelizada. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo BDA. As lesões da colonização foram mensuradas. Essas medições foram analisadas estatisticamente para avaliar a agressividade dos isolados (SANTOS *et al.*, 2017).

TESTE DE PATOGENICIDADE EM *ANANAS COMOSUS*

Para avaliar a patogenicidade em frutos de abacaxi, foram utilizados frutos sadios adquiridos em comércios locais que, inicialmente, foram lavados com água e secos com papel toalha. Com auxílio de um palito esterilizado, uma porção do micélio foi transferida para a superfície do fruto através de ferimento de 0,2 cm de profundidade. Em seguida, discos de micélio com 0,4 cm foram depositados no ferimento, os locais de inoculação foram envolvidos com parafilm para evitar a desidratação. Para os frutos testemunha foram depositados de 0,4 mm sem a presença do fungo. Cada fruto foi armazenado em sacolas plásticas com objetivo de formação de uma câmara úmida. O ensaio foi montado, sendo utilizados 5 frutos para cada isolado, sendo que 4 frutos foram inoculados com o fungo e um fruto mantido como controle e posteriormente, os frutos foram depositados em bandejas e armazenados em sala climatizada com temperatura de 25 °C (HUBERT *et al.* 2014).

TESTE DE PATOGENICIDADE EM *SACCHARUM OFFICINARUM*

A variedade de *S. officinarum* RB92579 foi selecionada para inoculação. O teste de colonização dos colmos foi realizado em colmos de cerca de um metro de comprimento. Na base do colmo foi depositado 1 ml de suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 de conídios ml e, a seguir, protegida com parafilme. Nos colmos o controle foi depositado apenas água destilada esterelizada. Os colmos inoculados foram incubados em ambiente climatizado 25 ° C e fotoperíodo de 12h. As repetições continham sete colmos cada. Vinte dias após a inoculação, os colmos foram seccionados longitudinalmente para avaliação visual e mensuração da colonização (CHAPOLA *et al.* 2014).

RESULTADOS

Durante as coletas foram observados frutos de *Austrocaryum vulgare*, *Attalea maripa* e *Mauritia flexuosa* com estruturas do fungo, correspondentes a micélio e conídios. Ao realizarmos preparações microscópicas, observaram-se marcadores morfológicos típicos de *Thielaviopsis* (Figura 1). Enquanto, que, em frutos de *Attalea speciosa*, além de observar a colonização do tecido dos frutos, detectou-se a formação de peritécios com exsudação de ascósporos (Figura 1).

ANÁLISE FILOGENÉTICA

Ao realizar análises de *BLASTn* das sequências amplificadas dos genes *ITS* e *TEF*, observou-se que os isolados pertencem ao complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Baseado em análise combinadas das sequencias, 10 isolados agruparam com isolados de referências *ex-type* de *Thielaviopsis ethacetica* (IMI 50560), dentro de um clado com alto suporte (*Bayesian posterior probability* 1.00).

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Os isolados de *T. ethacetica* apresentaram coloração branca após 24 horas de incubação, após 48 a 72 horas as culturas apresentaram coloração preta. Todos os isolados produziram odor característico de acetato de etila. Os conídios primários eram hialinos, retangulares-cilíndricos, medindo 6-7 x 4-5 μm . Conídios secundários eram marrons a escuros, variando de formatos retangulares, oblongos e ovais, medindo 7-9 x 4-6 μm . Eventualmente, observou-se o engrossamento de parede em conídios secundários que apresentavam coloração escura aleuroconídios. unicelulares, globosos, marrom escuro, com parede dupla e ásperas, medindo 13 x 16 μm .

Seis isolados de *T. cerberus* foram identificados, utilizando o conceito de espécie morfológica, haja vista, que essa é a única espécie deste complexo que é possível identificar através da avaliação dos marcadores morfológicos. Os isolados de *T. cerberus* apresentaram coloração da cultura inicialmente branca, tornando cinza-escuro (Figura 3). Três dias após incubação das culturas observou-se a

formação de protoperitécios de coloração negra, e na base do protoperitécios, a existência de ornamentação digitada. Após seis dias de incubação, observou-se a formação de peritécios rostrados, com exsudação de massa de ascósporos de coloração alaranjada. Os peritécios apresentaram hifas divergentes nas extremidades, enquanto nos protoperitécios, não foram observadas hifas divergentes nas extremidades do rostro (Figura 3). Os ascósporos eram viáveis, germinando e formando culturas inicialmente brancas. Os ascósporos eram unicelulares, elipsoidais, no entanto, foram encontrados ascósporos com duas células aderidas, devido à presença de bainhas. Conídios primários, retangulares, hialinos, variando a marrom-escuro medindo 8-11 x 5-7 μm . Aleuroconídios solitários, globosos, coloração escura com parede dupla (Figura 3)

TESTE DE PATOGENICIDADE (*ANANAS COMOSUS*)

Todos os isolados de *T. ethacetica* e *T. cerberus* induziram sintomas de podridão negra em frutos de abacaxi. Dois dias após a inoculação, detectamos no ponto de inoculação amolecimento da polpa, com a formação de micélio de coloração cinza-escuro e a formação de peritécios. Ao seccionar os frutos observou-se escurecimento do tecido, acompanhado de apodrecimento da polpa e desintegração da casca (Figura 4).

TESTE DE PATOGENICIDADE EM FRUTOS (*COCOS NUCIFERA*)

Todos os isolados de *T. ethacetica* e *T. cerberus* induziram sintomas nos frutos durante cinco dias após a inoculação. Inicialmente, detectou-se a formação de esporulação no local de inoculação, ao realizar cortes no pericarpo dos frutos observou-se o escurecimento do tecido (Figura 5).

TESTE DE PATOGENICIDADE EM COLMOS DE *SACCHARUM OFFICINARUM*

Ao avaliar os colmos, 12 dias após a inoculação, observou-se que todos os isolados inoculados induziram sintoma de podridão em colmos de cana de açúcar. Observou a formação de micélio de coloração negra no interior do colmo, que

correspondia aos esporos do fungo. Além disso, detectou-se o cheiro de acetato de etila, liberado no momento da secção dos colmos (Figura 5).

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam que *T. ethacetica* e *T. cerberus* são patógenos latentes, associados às palmeiras nativas na região amazônica e no Nordeste brasileiro. Este resultado reforça a hipótese de Borgens *et al.* (2019), os autores acreditaram que *T. ethacetica* é difundido em várias regiões geográficas, em diferentes palmeiras, inclusive, em espécies de palmeiras nativas. No Brasil, esta espécie foi relatada causando podridão em frutos de coqueiro, no entanto, inicialmente, os autores denominaram o fungo como *T. paradoxa s. stric* (PINHO *et al.*, 2013). Além disso, este fungo foi relatado causando podridão em frutos de *Ananas comosus*, *Elaeis guinensis* e podridão de colmo em *Saccharum* spp. em diferentes regiões geográficas de países asiáticos, americano e africano (MBENOUN *et al.*, 2014; BORGENS *et al.*, 2019; NASCIMENTO *et al.* 2020).

Relatos na literatura demonstram que *T. paradoxa s.lato* é o principal patógeno em diversos hospedeiros de importância agrícola no Brasil (MENDES *et al.*, 1998; FARR *et al.*, 2020). As principais pesquisas que envolvem a identificação filogenética constataram que não existem isolados de *T. paradoxa s.stric* no Brasil (MBENOUN *et al.*, 2014; MBENOUN *et al.*, 2015, DE BEER *et al.*, 2015). Sendo assim, acredita-se que *T. paradoxa s.stric* é pouco comum, possivelmente, muitos destes relatos são *T. ethacetica*. No entanto, para confirmar esta hipótese, estudos utilizando ampla coleção de isolados de diferentes hospedeiros, aliados com o uso de ferramentas modernas de biologia molecular devem ser realizados. Até o momento, as espécies relatadas no Brasil foram: *T. ethacetica*, *T. euricoi*, *T. musarum* (MBENOUN *et al.*, 2014, MELO *et al.*, 2016, BORGENS *et al.*, 2019).

Em estipe de *Attalea speciosa*, obteve-se isolados de *T. cerberus*, em galerias de insetos da ordem Coleoptera, o que evidencia que este inseto possa ter sido o vetor do patógeno, além de potencializar a penetração do fungo, em função da presença de injúrias. Levantamos a hipótese de que isolados de *T. ethacetica* e *T. cerberus* podem migrar das palmeiras nativas para espécies cultivadas, principalmente, através da ação de insetos vetores, ou através da ação

antropogênica. Estudos anteriores demonstraram a associação de *Thielaviopsis paradoxa* com *Rhynchophorus palmarum*, evidentemente, acredita-se que durante o processo de alimentação, este inseto pode ser o principal agente de disseminação de esporos (PARRA *et al.* 2003). Pesquisa conduzida por Carvalho *et al.* (2011) tem demonstrado a presença de esporos de *T. paradoxa* associado na superfície e no intestino de *R. palmarum*, sendo que os isolados provenientes dos insetos foram patogênicos em *Cocos nucifera* (CARVALHO *et al.*, 2013).

Ao avaliar os marcadores morfológicos de *T. cerberus*, observou-se poucos conídios primários e aleuroconídios, predominando a formação de peritécios e ascósporos viáveis. Poucas diferenças morfológicas existem entre as espécies do complexo *Thielaviopsis paradoxa*, no entanto, foi possível distinguir morfológicamente as espécies *T. cerberus*, de *T. ethacetica*, devido *T. cerberus* ser a única espécie do complexo que não produz conídios secundários, além da abundante produção de peritécios *in vitro* (MBENOUN *et al.*, 2014). Baseado nas descrições morfológicas confirmou-se que os isolados deste estudo não pertencem a *T. paradoxa s. strict*, devido não se observar a formação de sinemata em ambas as espécies, marcador morfológico exclusivo desta espécie (MBENOUN *et al.*, 2014).

Em função da constatação da fase sexuada de *T. cerberus* nas condições naturais, acredita-se que esta espécie apresenta alta variabilidade genética em função do processo de recombinação. Na descrição original desta espécie, foi observada a presença de peritécios na superfície de frutos de cacau e dendezeiro (MBENOUN *et al.*, 2014). Este evento evidencia possível risco, uma vez que patógenos que apresentam ciclo sexual são capazes de evoluir e se adaptar às mudanças do ambiente como novos hospedeiros, em função da recombinação genética, podendo potencializar a virulência, adaptação em diferentes ambientes e hospedeiros (GIRAUD *et al.*, 2010).

Thielaviopsis cerberus é a única espécie homotática do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. Recentemente, estudo genético avaliou a estrutura do locus gênico do tipo de acasalamento de *T. cerberus*, confirmando a presença de um locu responsável pela autofertilização, contendo quatro tipos de genes relacionado ao acasalamento (*Mating types*), enquanto que a região autoestéril é representada por um locus *Thielaviopsis cerberus* é a única espécie homotática do complexo *Thielaviopsis paradoxa*. (KRAMER *et al.*, 2021).

Apesar da descrição original de *T. cerberus* ser de amostras coletadas no continente africano, proveniente de *Theobroma cacao* e *Elaeis guinensis*, não se conhece o centro de origem deste fungo. É provável que o inóculo deste patógeno tenha sido disseminado, durante o transporte de material vegetal e domesticação no período da colonização. A primeira evidência é que o fungo foi introduzido no continente africano através de material propagativo de *T. cacao*, proveniente do Brasil, enquanto que, a segunda hipótese, é que ocorreu a disseminação do patógeno de *E. guinensis* da África para a América do Sul. Devido ao processo de globalização do comércio de produtos vegetais, tem ocorrido a distribuição de microorganismos. Este tem sido o caso de vários fungos fitopatogênicos, que foram introduzidos em novas regiões geográficas, co-evoluindo com novos hospedeiros, surgindo novas doenças devastadoras em plantas cultivadas e silvestres (ANDERSON *et al.* 2004).

Este estudo demonstra que fungos do gênero *Thielaviopsis* hospedam em palmeiras nativas, podendo ser uma estratégia de sobrevivência na ausência de hospedeiros cultivados. Em diferentes partes mundo, especificamente países de origem tropical, tem-se observado crescentes registros de diversas doenças emergentes, que envolvem a interação de *T. ethacetica* (*sin.*: *Thielaviopsis paradoxa* e *Ceratocystis paradoxa*). E, estas ocorrências podem ser interpretadas como consequência da dispersão de inóculo do patógeno, possivelmente, através de transporte de material propagativo (TZENG *et al.* 2010; SUWANDI *et al.* 2012; ANDERSON *et al.* 2004).

Thielaviopsis cerberus é relatado como um novo patógeno quarentenário para o Brasil, apesar de estar associado em plantas silvestres, acredita-se que este fungo pode ser uma ameaça às plantas cultivadas, especificamente em frutos de cacau, coqueiro e dendezeiro. Apesar da confirmação da ocorrência de *Thielaviopsis* presente em diversas regiões geográficas no Brasil, não se conhece o real impacto deste grupo de fungos nas espécies de plantas de interesse agrícola, no entanto, é necessário a investigação para confirmar quais espécies de *Thielaviopsis* estão associadas ao cultivo de *Ananas comosus*, *Musa spp*, *Theobroma cacao* e *Cocus nucifera*. Esta pesquisa reforça a importância do estudo de levantamento de fungos fitopatogênicos em plantas nativas, demonstrando, que estes patógenos apresentam versáteis estratégias de sobrevivência.

Tabela 1: *Thielaviopsis* spp. isolados e sequências utilizadas na análise filogenética

Species name	Culture collection number(s) ^a	Host/substrate	Origin	Isolation	Collector (supplier)	GenBank accession numbers ^b	
						ITS	TEF-1 ^a
<i>T. ethacetica</i>	MP 08	<i>Mauritia flexuosa</i>	Brazil	2018	M. P. Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 09	<i>Mauritia flexuosa</i>	Brazil	2018	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 13	<i>Astrocaryum</i> sp	Brasil	2018	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 14	<i>Astrocarium</i> sp	Brazil	2018	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 15	<i>Astrocarium</i> sp	Brazil	2018	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 24	<i>Astrocarium</i> sp	Brazil	2019	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 30	<i>Attalea maripa</i>	Brasil	2019	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	MP 35	<i>Attalea maripa</i>	Brazil	2019	M. P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	SS01	<i>Attalea maripa</i>	Brazil	2018	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	SS02	<i>Attalea maripa</i>	Brazil	2018	M.P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 70	<i>Attalea flexuosa</i>	Brazil	2020	M.P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 71	<i>Attalea flexuosa</i>	Brazil	2020	M.P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 75	<i>Attalea flexuosa</i>	Brazil	2020	M.P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 76	<i>Attalea flexuosa</i>	Brazil	2020	M.P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 77	<i>Attalea flexuosa</i>	Brazil	2020	M. P.Melo		
<i>T. cerberus</i>	MP 78	<i>Attalea flexuosa</i>	Brasil	2020	M.P.Melo		
<i>T. ethacetica</i>	CMW 37775; IMI 50560 ET	<i>Ananas comosus</i>	Malaysia		(CABI)	JX518341	JX518309
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36671	<i>Elaeis guineensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518351	JX518319
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36771	<i>Sacharum</i> sp.	South Africa		N. van Wyk (FABI)	JX518330	JX518298
<i>T. ethacetica</i>	CMW 37777; IMI 344082	<i>Cocos nucifera</i>	Tanzania		(CABI)	JX518339	JX518307
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36691	<i>Theobroma cacao</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518343	JX518311
<i>T. ethacetica</i>	CMW 28533; CBS 601.70	<i>Ananas comosus</i>	Brazil	1970	M. Barreto Figueiredo (CBS)	JX518331	JX518299
<i>T. cerberus</i>	CMW 36668 T	<i>Elaeis guineensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518348	JX518316
<i>T. cerberus</i>	CMW 35024	<i>Theobroma cacao</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518356	JX518324
<i>T. euricoi</i>	CMW 28537; CBS 893.70 T	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	1970	E. de Matta (CBS)	JX518335	JX518303
<i>T. euricoi</i>	CMW 8790	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia		M.J. Wingfield (FABI)	JX518327	JX518295
<i>T. musarum</i>	CMW 1546 ET	<i>Musa</i> sp.	New Zeland	1962	T.W. Canter-Visscher (FABI)	JX518325	JX518293
<i>T. musarum</i>	CMM 1525	<i>Musa sapientum</i>	Brazil	2015	M. P. Melo	KU052801	KU175887
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36689; CBS 1307.61 ET	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon	1961	M. Mbenoun & J. Roux	JX518342	JX518310
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36642; CBS 130760	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon	1960	M. Mbenoun & J. Roux	JX518346	JX518314
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36654	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518350	JX518312
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36754	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518344	JX518318
“ <i>T. paradoxa</i> ”	CMM 1739; CML 2392	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	2012		JQ963886	JQ963883
<i>T. paradoxa</i> s. lat. 1	CMW 28535; CBS 1010.54	<i>Rosa</i> sp.	Netherlands	1954	J.W. Veenbaas-Rijks (CBS)	JX518333	JX518301
<i>T. paradoxa</i> s. lat. 2	CMW 28536; CBS 116770	Palm species	Ecuador	1970	M.C. Aime (CBS)	JX518334	JX518302
<i>T. radicolica</i>	CMW 1032; CBS 114.47 T	<i>Phoenix dactylifera</i>	USA	1947	D.E. Bliss	KF612023	KF612024

<i>T. radicicola</i>	CMW 26389; CBS 167.67	<i>Lawsonia inermis</i>	Mauritania	1967	G.L. Hennebert	KF953932	KF917202
<i>C. fimbriata</i>	CMW 1547	<i>Ipomoea batatas</i>	Papua New Guinea	2005	E.H.C. McKenzie	AF264904	EF070395
<i>C. fimbriata</i>	CMW 15049	<i>Ipomoea batatas</i>	USA	2005	C.F. Andrus; 1937	DQ520629	EF070394

Tabela 1 – Isolados e sequências usadas na análise filogenética neste estudo, a CABI: *Commonwealth Agricultural Bureaux International Bioscience, formerly International Mycological Institute (IMI)*; CBS: Coleção de cultura CBS-KNAW *Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands*; CMM: Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Profa. Maria Menezes”, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; CML: Coleção Micológica de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil; CMW: Coleção de cultura do Instituto de biotecnologia de agricultura e floresta (FABI), *University of Pretoria*. Sequencia ex-type (T) isolados epitype (ET). *bITS*: internal transcribed spacer regions 1 and 2 including the 5.8S rRNA gene; TEF-1a: translation elongation factor 1-alpha gene.

FIGURA 1



Figura 1 – Sintomas e sinais de *Thielaviopsis* spp: A: Sintomas de resinose em estipe de babaçu. B-C: Presença de larvas de coleópteros em galerias em estipe de babaçu. D. Frutos de babaçu com sintomas de podridão. E: Sinais de *Thielaviopsis* na região peduncular em frutos de babaçu. F: Secção demonstrando a colonização do fruto. G: Peritécios sobre casca de babaçu. H: Peritécios com exsudação de ascósporos. I: Sinais de *Thielaviopsis* em frutos de palmeira injá. J: Sinais de *Thielaviopsis* em frutos de tucumã.

FIGURA 2

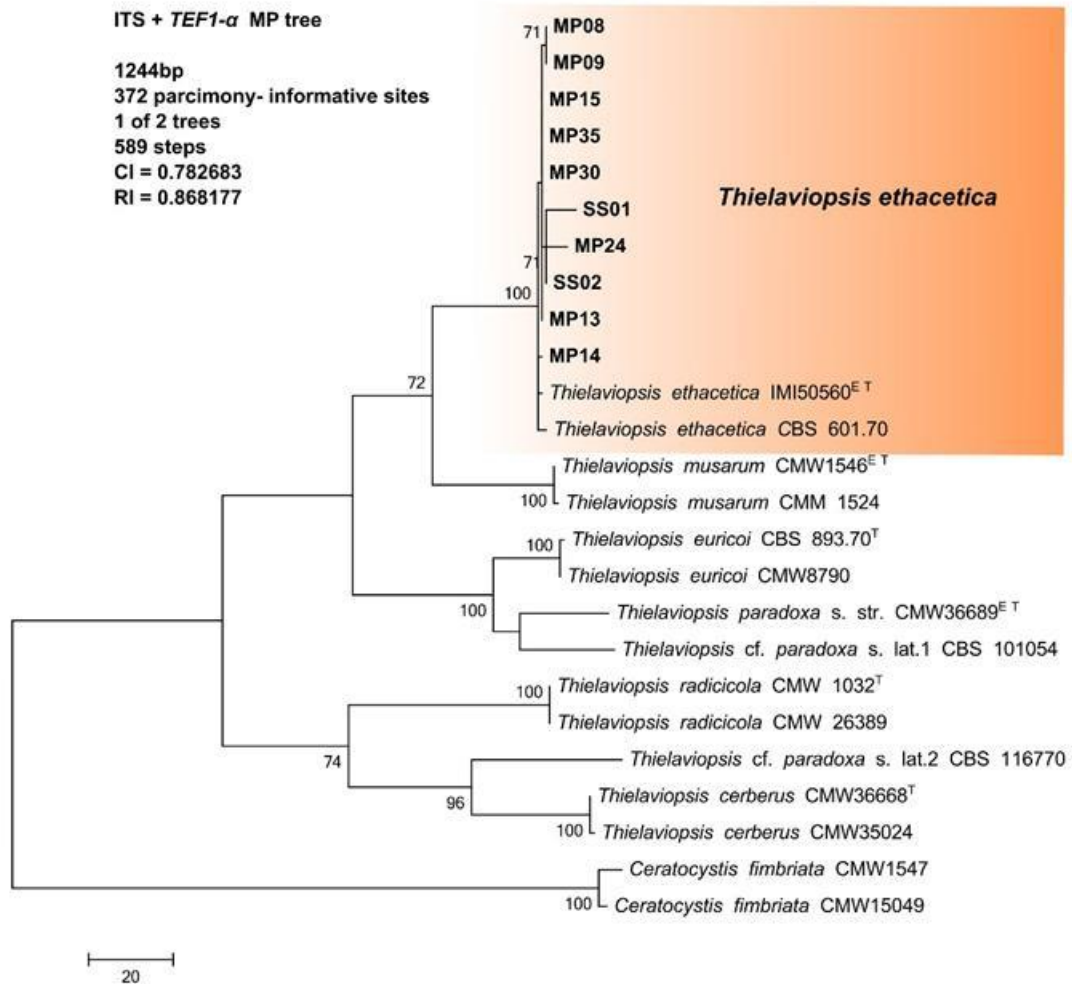


Figura 2 – Análise filogenética *bayesiana* de isolados de *Thielaviopsis* spp. isolados obtidos de palmeiras. A árvore foi construída usando sequências concatenadas dos genes ITS e *TEF1- α* . Os valores de probabilidade posterior *bayesiana* $\geq 0,90$ são indicados acima dos nós. As sequências geradas neste estudo estão destacadas em negrito. Foram indicadas sequências de isolados *ex-type* (T) e *ex-epitipo* (ET). A barra de escala (0,04) representa substituições de nucleotídeos por local. Esta árvore está enraizada com *Ceratocystis fimbriata*.

Figura 3

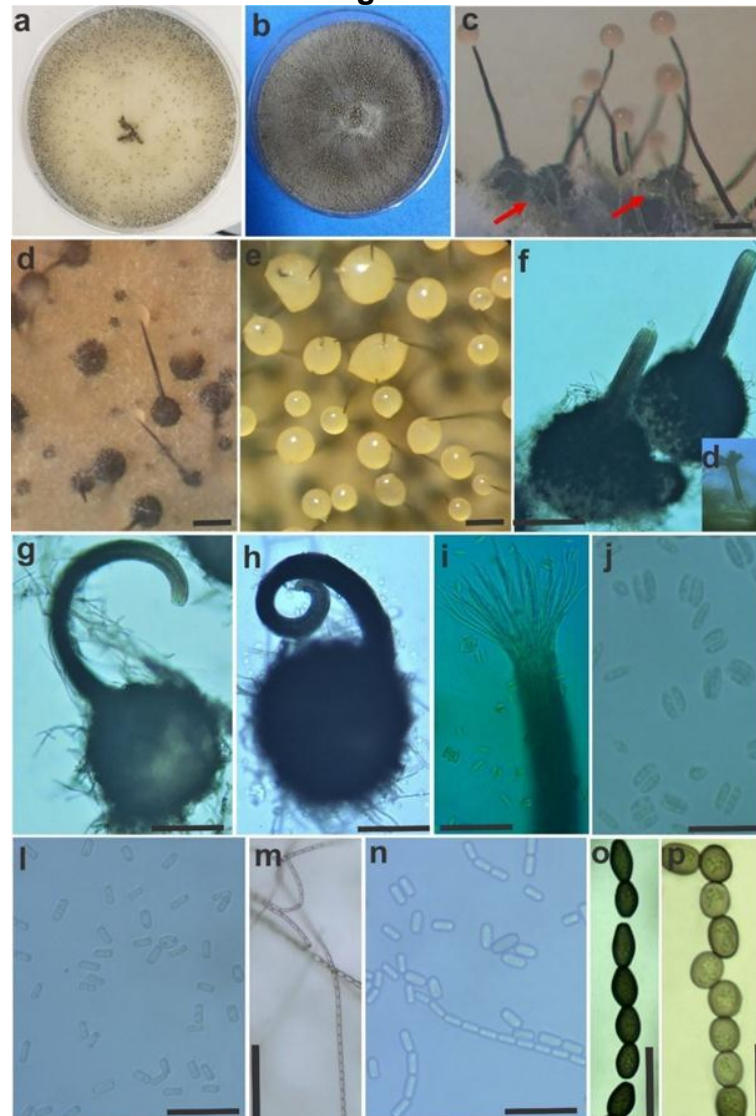


Figura 3 – Marcadores morfológicos de *T. cerberus* e *T. ethacetica*: A.B: Culturas de *T. cerberus*. C. Seta indicando a base do peritécio. D.E: Exsudação de ascósporos. F: Detalhe de pseudoperitécios. G-H: Detalhe de peritécios. I: Detalhe de hifas da região estiolar do peritécios. J: Ascósporos. I.M.N: Conídios primários. O.P: Conídios secundários.

Figura 4

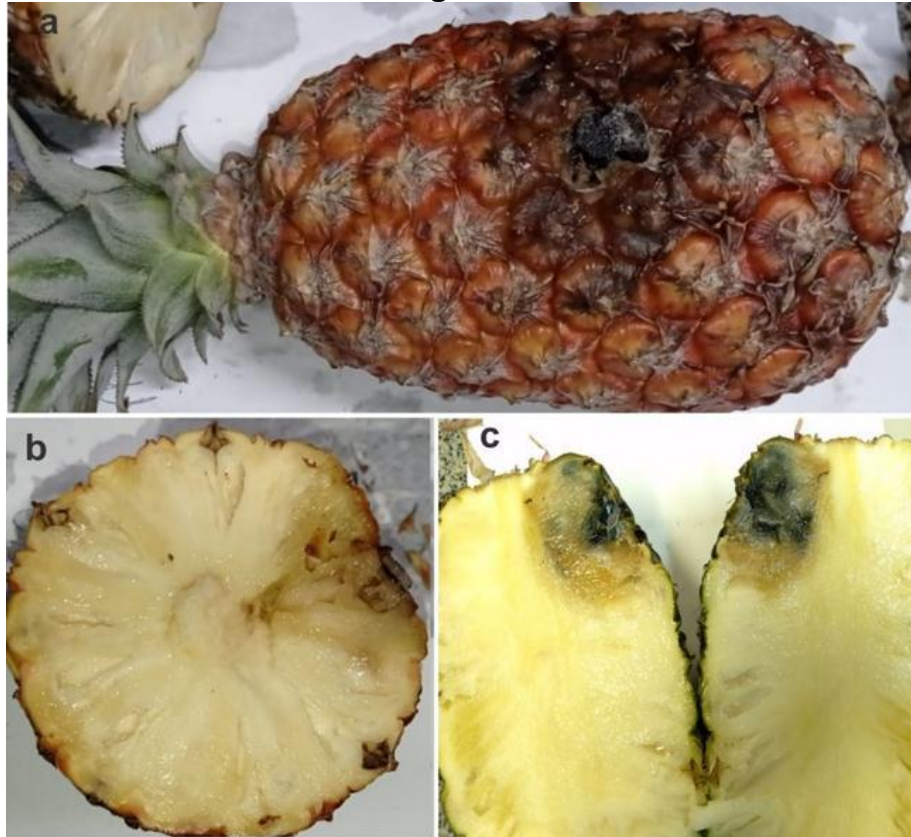


Figura 4 – Teste de patogenicidade em frutos de abacaxi: A: Detalhe da colonização do fungo, seguido do escurecimento da casca. B-C. Colonização de *Thielaviopsis ethacetica*. C: Colonização de *Thielaviopsis ethacetica*, causando amolecimento da polpa.

Figura 5

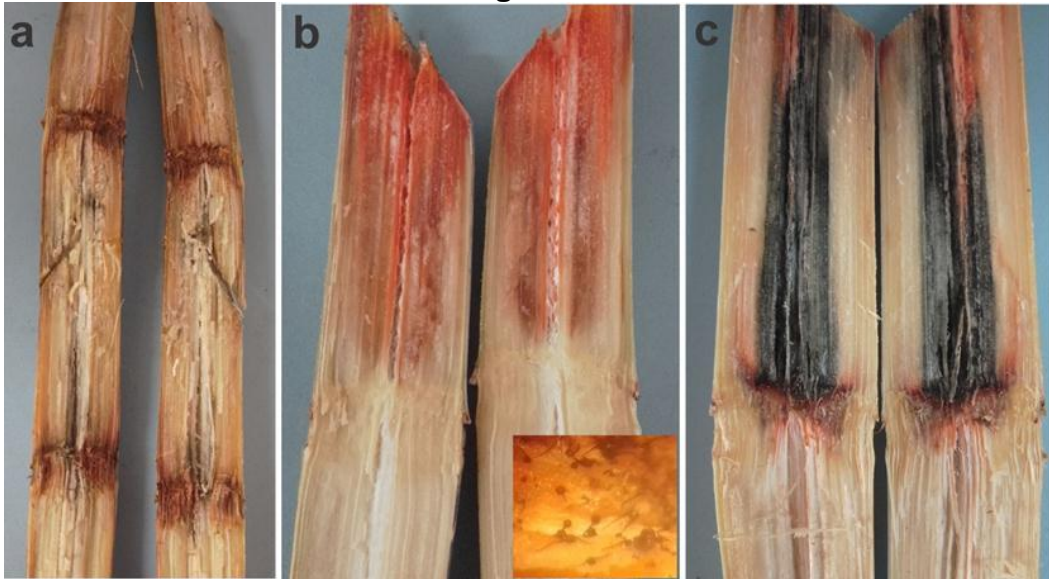


Figura 5 – Teste de patogenicidade em colmos de cana-de-açúcar: A-B: Sintoma de podridão, colonização de *T. cerberus*. C: Sintoma de podridão, colonização *T. ethacetica*.

Figura 6

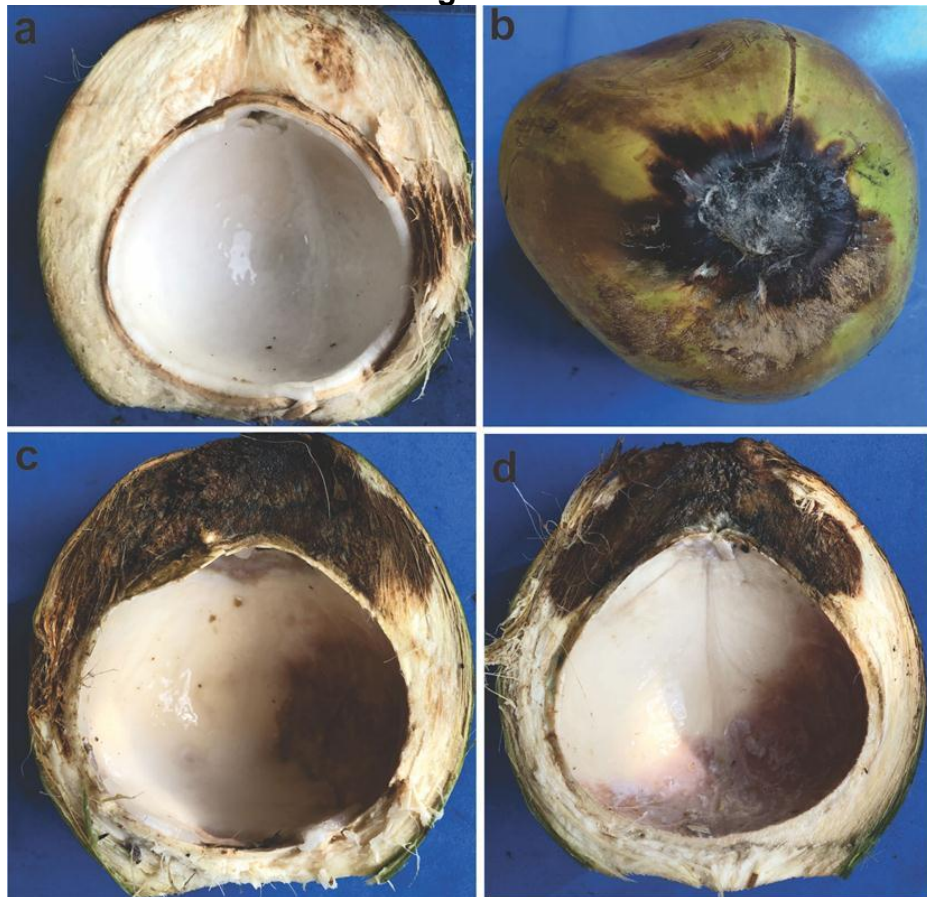


Figura 6 – Teste de patogenicidade em frutos de coqueiro. A: Frutos assintomáticos (Controle). B: Sintoma externo. C-D: Sintoma de podridão interna, colonizado por *T. ethacetica* e *T. cerberus*, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Anderson PK, Cunningham AA, PATEL NG, MORALES FJ, EPSTEIN PR, Daszak P.(2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 535-544
- Barnes I, Fourie A, WINGFIELD MJ, HARRINGTON TC, McNew DL, Sugiyama LS, Luiz.BC, Heller WP, Keith LM (2018) New *Ceratocystis* species associated with rapid death of. *Metrosideros polymorpha* in Hawai'i. *Perssonia* 40: 154-181
- Borgens AF, Alcântara Neto F, Matos KS, Beserra Júnior JE, Massola Júnior NS, Moreira SI, Melo MP (2019) *Thielaviopsis ethacetica* the ethiological agente os sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil *Tropical Plant Pathology* 44:460-467.
- Carvalho RRC, Warwick DRN, Souza PE, Carvalho filho JLS (2011) Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. *Scientia Plena*. 7: 1-6.
- Chapola RG, Ogasawara GA, Jans B, Massola Junior NS (2014) Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio de pulverização de fungicida em rebolos no sulco de plantio. *Ciência Rural* 44:197-202.
- De Beer ZW, Duong TA, Barnes IBD, Wingfield BD, Wingfield MJ (2014). Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies Mycology* 79: 187-219
- Farr DF, Rosmman AY. 2014. Fungal Database Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. [<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (viewed 'online setemb 25, 2016)]L.
- Geep V, Hernández L, Alaniz S, Zaccari F (2013) First reports of *Thielaviopsis paradoxa*. Causing palm fruit rot *Butia capitata* in Uruguai. *New Disease Reports* 27:12.
- Hepperle D (2004) SeqAssem©: Win32-Version. a sequence analysis tool conting assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Available at: <http://www.sequentix.de>.
- Hubert J, Fourrier C, Laplace D, loos R (2014) First reports of pineapple black rot caused by *Ceratocystis paradoxa* on *Ananas comosus* in French Guiana. *Plant Disease* 98.

- Liu F, Marincowitz S, Chen S, Mbenoun M, Tsopelas P, Soulioti N, Wingfield MJ (2020) Novel species of *Huntliella* from naturally-occurring forest trees Greece and South African. *MycKeys* 69:33-52
- Jacobs K, Bergdahl DR, Wingfield MJ, Halik S, Seifert KA, Bright DE, Wingfield BD (2004) *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research* 08:411-418
- Kramer D, Lane FA, Steenkamp ET, Wingfield BD, Wilken PM (2021) Unidirectional mating-type switching confers self-fertility to *Thielaviopsis cerberus*, the only homothallic species in the genus. *Fungal Biology* 125:427-434
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 1–8, in: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA.
- Mendes, M. A. S., Silva, V. L., Dianese, J. C., Ferreira, M. A. S. V., Santos, C. E. N., Gomes Neto, E., Urben, A. F. & Castro, C. (1998). Fungos em Plantas no Brasil. Embrapa-SPI, Embrapa Cenargem, Brasília.
- Mayers CG, Harrington TC, Masuya H, Jordal BH, McNew DL, Shih HH, Roets F, Kietzka GJ Patterns of coevolution between ambrosia beetle mycangia and the Ceratocystidaceae, with five new fungal genera and seven new species. *Persoonia* 44:4-66.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, van Prud'homme Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012) Regnum vegetabile international. code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne code): 142. Koeltz Scientific Books, Germany.
- Mbenoun M, de Beer ZB, Wingfield MJ, Wingfield BD, Roux J (2014) Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. *Mycologia* 106:757-784.
- Mbenoun M, Wingfield MJ, Letsoalo T, Bihon W, Wingfield BD, Roux J (2015) Independent origins and incipient speciation among host-associated populations of *Thielaviopsis ethacetica* in Cameroon. *Fungal Biology*. 119: 957-972.
- Nascimento SMC, Nakasone AK, Neto CFO, Alves KZ, Sobrinho RSA, Conceição SS, Campos KR, Carvalho EA (2020) Patogenicidade e caracterização de *Thielaviopsis ethacetica* em Palma de óleo. *Summa Phytopathologica* 46: 236-241.

- Parra D, Morillo F, Sánchez P, Pineda J, Guerra J (2003) Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn em El tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Cucurlionidae). *Entomotropica*, v.18, n.1, p. 49-55, 2003.
- Posada D, Buckley TR (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol* 53:793-808.
- Pinho DB, Dutra DC, Pereira OL (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Trop Plant Pathology* 38:152-157.
- Rambaut A (2009) Fig Tree 1.2.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Accessed on March 20, 2016.
- Roux J, Heath RN, Labuschagne L, Nkuekam GK, Wingfield MJ (2007) Occurrence of the wattle wilt pathogen, *Ceratocystis albifundus* on native South African trees. *Forest Pathology* 37: 292-302.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, H"ohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP(2011) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539-42.
- Santos PRD, Mussi-Dias V, Freire MGM, Carvalho BM, Silveira SF (2017) Diagrammatic scale of severity for postharvest black rot (*Ceratocystis paradoxa*) in coconut palm fruits. *Summa Phytopatologica* 43: 269-257.
- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
- Thines M (2019) An evolutionary framework for host shifts-jumping ships for survival. *New phytologist*. 224: 605-617.
- Wulandari NF, Ahmad RZ (2018) *Thielaviopsis* spp from Salak (*Salacca zalaca* (Gaerntn.) Voss in Indonésia. *International Journal of Agricultural Technology* 14:797-804.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academid Press, San Diego, pp 315-322.

CAÍTULO 2

Black rot in peach palm (pupunha) fruits: an age-old postharvest problem poorly investigated

Short Title: *Thielaviopsis* on palm

Fabiane Valéria Rego da Rocha², Robison Severo³, Leandro Jun Shibutani⁴, Dayse Drielly Souza Santana Vieira⁵, Kedma da Silva Matos⁶, Enayra Silva Sousa⁷, José Evando Aguiar Beserra Júnior⁸, Sarah da Silva Costa Guimarães⁹, Gilvan Ferreira da Silva¹⁰, Maruzanete Pereira de Melo

1 – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biologia e Florestal, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Santarém, PA, Brazil;

2 – Universidade Federal do Oeste do Pará, Campus Juruti, Juruti, PA, Brazil;

3 – Universidade Federal de Roraima, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, 69310-000, Boa Vista, RR, Brazil;

4 – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brazil;

5 – Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, 37200-900, Lavras, MG, Brazil;

6 – Embrapa Amazônia Ocidental, Rod AM 10, Km 29, 69010-970, Manaus, AM, Brazil;

7 – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Planejamento e Política Agrícola, Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brazil.

*Corresponding author: Maruzanete Pereira de Melo; e-mail: fitomaru@gmail.com

⁴Normas de publicação do artigo disponível em: <https://www.appsnet.org/publications>

ABSTRACT

The *Thielaviopsis paradoxa* complex counts six phylogenetic species. These species are important pathogens in different hosts. *Thielaviopsis ethacetica* is known as a polyphagous pathogen, causing diseases such as fruit rot and stem bleeding in palms. Peach palm (pupunha) fruits with black rot symptoms were collected in markets and farms in different municipalities of Pará, Brazil, during 2018 and 2019. The fruits showed symptoms of black rot, with the formation of a black-colored mycelium. Microscopy analysis revealed the presence of conidia typical of the genus *Thielaviopsis*. Monosporic cultures were obtained, and five isolates were selected. Based on phylogenetic analyses of the ITS region and the TEF-1 α gene, the fungi were identified as *Thielaviopsis ethacetica*. The isolates had rectangular-shaped primary conidia with hyaline coloration, while secondary conidia were cylindrical to oblong in shape and dark brown. All isolates induced black rot symptoms in yellow and red peach palm fruits. This is the first record of *T. ethacetica* causing black rot in peach palm fruits in Brazil, which represents a potential threat to the culture of *Bactris gasipaes*.

Keywords: *Bactris gassipaes*. Phylogenetic analysis. Postharvest rot. *Thielaviopsis paradoxa* complex.

1 INTRODUCTION

Black rot is a major postharvest problem of peach palm (pupunha) fruits (*Bactris gasipaes* L.). It has been observed for decades in the Northern region of Brazil. The etiologic agent of black rot is pointed as the *Thielaviopsis paradoxa* (Alves & Flores, 1982). The disease is characterized by a darkening and softening of the pulp and premature fruit drop. There is formation of mycelium and spores of the fungus as the disease evolves. Injuries to plants caused by birds and insects ease the infection by several fungi, which includes *T. paradoxa* (Mota & Gasparotto, 1998).

Thielaviopsis paradoxa is a soil fungus, an important etiologic agent of plant diseases in monocotyledonae. This fungus has a wide geographic distribution both in tropical and arid areas (Morgan-Jones, 1967; Garofalo & McMillan, 2004). It was first described associated as a pathogen in pineapple plants in France, inducing a disease called black rot in fruits (Kile, 1993). The presence of *T. paradoxa* (latu sensu) in palm species is reported in many regions of the world. This phytopathogen is mainly found in the tropical regions of Africa, Asia, and South America. *Thielaviopsis paradoxa* induces the symptoms of stem bleeding and fruit rot in palm species that are important to agronomy and forestry (Mbenoun et al., 2014; Mbenoun et al., 2015). This fungus is frequently observed in Brazil on coconut and ornamental palms (Warwick & Passos, 2009; Viana et al., 2009; Pinho et al., 2013). In ornamental and açai palms, this group of phytopathogens associates with insect borers, facilitating the dissemination of spores and potentiating the occurrence of the disease (Araújo & Silva, 2010; Oliveira, 2017).

Thielaviopsis paradoxa has been divided into several genetically distinct species. Thus, *T. paradoxa* latu sensu counts six species that are allocated into three different clades. The first group contains the species *Thielaviopsis radicola* (Bliss) Moreau Mbenoun and *Thielaviopsis cerberus* Mbenoun and Wingfield, which are phytopathogens in palm trees. The second group consists of *Thielaviopsis ethacetica* (Went) Mbenoun and de Beer, which is associated with several hosts and has a wide geographic distribution, and *Thielaviopsis musarum*, an etiologic agent of crown rot in banana fruits (Melo et al., 2016; Mbenoun et al., 2014). The third group includes *T. paradoxa* stricto sensu and *Thielaviopsis euricoi* (Bat and Vital) Mbenoun and de Beer, important rot-inducing pathogens in *Elaeis guinensis* and *Cocus nucifera* (Mbenoun et al., 2014).

There are several records of black rot in peach palms in Brazil in which *T. paradoxa* is the etiologic agent (Mendes et al., 1998). However, these records are flawed and inaccurate because the identification of the etiologic agent was based only on morphological markers. According to the new International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (McNeill et al., 2012), from the six genera under the name *Ceratocystis* five have become *Thielaviopsis*. Currently, the name *Ceratocystis* is only used for the causative agent of wilt in tree species, while *Chalara* has been replaced for *Chalariopsis* (de Beer et al., 2014).

Although black rot in peach palm is a critical phytosanitary problem, the identification of the etiologic agent has been neglected. Furthermore, there is no record by researchers of its isolates in culture collections. In addition, all identifications of isolates obtained from peach palms were performed through the evaluation of morphological markers. Therefore, this research aims to contribute to clarify the etiological agent of black rot in peach palm (pupunha) fruits by applying the concept of phylogenetic species, morphological characterization, and pathogenicity test.

2 MATERIAL AND METHODS

Peach palm fruits with black rot symptoms were collected in local markets and farms in Juruti, Santarém and Belém (Western Pará) in the Northern region of Brazil. Twenty samples from 15 fruits were collected and sent to the laboratory to perform fungi isolation. The fruits were sectioned and stored in bags with moistened cotton to simulate a humidity chamber. After the formation of fungal structures, direct isolation was performed with a metal needle. Portions of mycelium were transferred into a potato dextrose agar (PDA) medium, which was incubated for a 12-hour photoperiod at 28 °C. Monosporic cultures of four isolates were performed, which were then deposited at the Culture Collection “Maria Menezes” for Phytopathogenic Fungi at the UFRPE, Recife - Brazil (Table 1).

Five isolates were selected for morphological characterization based on their colony morphology and origin. The isolates were grown on malt extract (MEA) culture medium with sterilized *Saccharum* bud chips deposited on its surface. The Petri dishes were kept in an incubator for a 12-hour photoperiod at 25 °C. Microcultures were performed to observe fungal structures. The mycelium fragments were

transferred to small blocks of MEA culture medium in slides and then covered with a coverslip. Then, they were incubated in a humidity chamber for 72 hours at 25 °C (Mbenoun et al., 2014). The slides were observed with a binocular microscope, and the conidia markers (n = 30) were measured.

Mycelium biomass was obtained by scraping cultures grown on 2% MEA. Mycelium fragments were transferred to 1.5-mL microtubes for extraction of total DNA using the AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen® Biosciences). The gene *TEF-1α* and the region ITS were amplified and sequenced for phylogenetic analysis using the primers *EF1F* (5'-TGCGGTGGTATCGACAAGCGT-3'), *EF2R* (5'-AGCATGTTGTCGCCGTTGAAG-3') (Jacobs et al., 2004), *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), and *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990).

PCRs were performed at the following concentrations: 12.5 μL Taq PCR Master Mix 2x 2 μL of each primer (10 mM) (reverse and forward), and 9 μL of ultrapure water, 1.5 μL (2.5 U) – a final volume of 25 μL. Reaction conditions followed the recommendations of the respective authors of each primer pair. The amplicons were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel stained with GelRed™ (Biotium Inc.) in TAE 1 × Buffer (Sambrook et al., 1989) and visualized under UV light. PCR products were purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kits (Promega Brasil, São Paulo, BR). The gene fragments were sequenced by chain termination method (Sanger sequencing) at the Embrapa Amazônia Ocidental.

Nucleotide sequences were edited using SeqAssem (Hepperle, 2004). Additional reference sequences of *Thielaviopsis* isolates infecting different hosts were obtained from the NCBI GenBank and papers published in high-impact factor journals (Table 1). The edited sequences were compared with those found at the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTn tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences were aligned using the Clustal W function of MEGA v. X (Kumar et al., 2018). Bayesian inference analyses were performed on all sequences using the Monte Carlo chain method. The software MrModeltest 2.3 (Posada & Buckley, 2004) was used to produce the best-fitting nucleotide substitution model. The GTR+G model was used. Phylogenetic analyses were performed using the CIPRES online tool (Miller et al., 2010) and MrBayes v. 3.2 (Ronquist et al., 2011). Markov chains were run simultaneously on random trees with 10,000,000 generations, and trees were

sampled every 1,000 generations for a total of 10,000 trees. The first 2,500 trees of each analysis were discarded as burn-in, and the remaining 7,500 trees were used to calculate later probabilities of branches as determined by a consensus of the majority of sampled trees. Trees were visualized using Figtree (Rambaut, 2009). Isolates of *Thielaviopsis fimbriata* were used as an outgroup. Sequences produced in this study were deposited at the NCBI GenBank (Table 1).

Eighty healthy, early-maturing fruits of each variety (red and yellow) of peach palm (pupunha) were selected. The fruits were washed with neutral detergent and sterile water and then inoculated using two different methods. In the first method, 9 mm mycelium discs were deposited in the region of the peduncle. In the second method, 100 μ L of spore suspension at a 1×10^5 conidia/mL concentration were also deposited in the peduncle. Sterile distilled water was used as a negative control. Each treatment consisted of four replications, and the experimental unit was represented by one fruit. The fruits were incubated in a humidity chamber for five days at 28 °C with a 12-hour photoperiod. After incubation, the symptoms and signs of the pathogen on the surface of the fruit were characterized. The fruits were sectioned to evaluate the colonization of the fungus (Alves & Flores, 1982). After the evaluations, the fungus was reisolated to comply with Koch's postulates.

3 RESULTS

Peach palm fruits had with different levels of severity in the collection sites. More severe rot symptoms occurred in fruits at an advanced ripening stage and in fruits with mechanical damage (Fig. 1a). The lesions started mainly in the peduncle region of the fruit. As the disease progressed, white mycelium often formed, which later turned black. Inside the fruits, dark-colored mycelial colonization and softening of the tissue could be observed (Fig. 1 b-c). An intense, black-colored colonization occurred in the pulp of the sectioned fruits (Fig. 1c-d). A strong odor commonly released from the rotten fruit, which may be related to the production of ethyl acetate.

Compared with *Thielaviopsis* lineages deposited at the GenBank, the isolates presented an identity above 97% with the sequences of *T. ethacetica* (BLASTn analysis of the *ITS* region and the gene *TEF-1 α*). In the phylogenetic analysis, the five *Thielaviopsis* isolates formed a well-supported (Bpp=0.99), monophyletic group with the ex-type isolate of *T. ethacetica* (IMI 50560). The isolates from this study

grouped with *T. ethacetica* isolates obtained from the hosts *Cocos nucifera*, *Ananas comosus*, and *Saccharum officinarum*, which are found in different geographical regions (Fig. 2).

The colonies initially showed a white coloration but turned dark after eight days of cultivation (Fig. 3a). There was no synnemata on the sterilized fragments. On the microscope evaluation of the white-colored mycelium, hyaline, unicellular, rectangular primary conidia measuring 5.6-8.8 μm in length and 2.8-4.0 μm in width were observed (Fig. 3b-c). In the dark-colored mycelium, there was the formation of secondary conidia with three distinct shapes. The first type was cylindrical, light brown, and measured 6.6-11.6 μm x 3.0-3.7 μm (Fig. 3d, g). The second type had an oblong to globose shape measuring 5.0-10.0 x 3.0-5.3 μm (Fig. 3e). The third type presented ellipsoid-shaped conidia measuring 7.0-13.0 x 3.0-4.0 μm (Fig. 3f). Also, there was production of unicellular aleuroconidia in dark-colored colonies. They presented cell walls measuring 10.8-17.5 x 5.4-8.4 μm and had a warty, dark-brown, ovoid-shaped appearance (Fig. 3h-i).

All isolates induced rot symptoms in peach palm fruits of the varieties "red" and "yellow," which are characterized by the softening of the pulp with subsequent evolution to black rot. This characteristic is similar as that on fruits initially collected for isolation. Both inoculation methods were efficient in starting the infection. In fruits used as control, neither symptom nor colonization of the pathogen was observed (Fig. 1e). There was a deterioration of the tissues after 24-48 h (symptom similar to soft rot), which evolved into a dark tissue coloration (Fig. 1f). In the outer region, especially at the inoculation point, there was the formation of pathogen's signs, followed by a characteristic odor of ethyl acetate. The mesocarp was colonized and had a dark coloration (Fig. 1g).

4 DISCUSSION

Black rot occurs in peach palm (pupunha) fruits when they begin to ripen. It is believed that wounds and injuries potentiate its occurrence. This disease is a post-harvest problem frequently observed for many years. During the commercialization period, losses of up to 5% of the total production may occur (Véras et al., 1997). Frequently, the black rot of peach palm fruits occurs during the period of commercialization and transport, showing that the infection may occur with fruits still

on the plant, evidencing that *T. ethacetica* can be a latent pathogen. The rots begin in the region of the peduncle; however, the colonization of the tissue advances to the pulp of the fruit. It has been observed that, associated with fruits of *C. nucifera*, the rot caused by *T. paradoxa* occurs after harvest. Specifically, the symptoms appear in the peduncle region probably due to injuries at the time of harvest (Pinho et al., 2013).

This study proves, by applying the morphological species concept, phylogenetic analysis, and pathogenicity test, that the causative agent of black rot in pupunha fruits is *T. ethacetica*. Previous research mentions that the causative agent of black rot is *T. paradoxa* (Alves & Flores, 1982; Garcia & Souza, 1998). However, it is believed that many reports of the association of *Thielaviopsis* with several palm species in Brazil do not describe *T. paradoxa* s. str since only its morphology was used to identify the pathogen. The taxonomic reassessment of *T. paradoxa* has shown that it is a complex composed of six phylogenetically distinct but morphologically similar species (Mbenoun et al., 2014).

Although black rot is a common disease, especially in the humid tropical region of the Amazon, the correct identification of the etiologic agent has not yet been performed. Many associations and reports of *T. paradoxa* on different plants in Brazil are believed to be erroneous since all records were made using morphological descriptors. Therefore, several of these reports may indicate *T. ethacetica*, a species of the *Thielaviopsis paradoxa* complex with a wide geographical distribution. Studies have shown that *T. paradoxa* has a low incidence in Asian and African regions, whereas *T. ethacetica* is frequently found on various hosts (Mbenoun et al., 2014; Mbenoun et al., 2015).

Despite the existence of a diversity of associations of *T. paradoxa* in cultivated plants, studies performing the correct identification of *Thielaviopsis* spp. are neglected in Brazil. Interestingly, the isolate CMM 1739, which was previously identified as *T. paradoxa*, here clustered with isolates from this study (Pinho et al., 2013). Studies conducted by South African researchers revealed the presence of *T. ethacetica* causing stem bleeding and fruit rot in several palm species (Mbenoun et al., 2014). *Thielaviopsis ethacetica* is also a predominant pathogen in crops, inducing rot in *A. comosus* fruits and pineapple sett rot disease on sugarcane (Mbenoun et al., 2015; Borges et al., 2019).

During the cultivation and domestication of *B. gasipaes*, the pathogen's inoculum may have been dispersed to various geographical regions (humans transporting and propagating material and fruits). In addition, the dispersal of *T. ethacetica* may have occurred through the action of the *Rhynchophorum palmarum* beetle. This insect (the main pest in palm species and coconut plantations) is a vector of the *Thielaviopsis* inoculum, which may cause injuries and facilitate the penetration of the pathogen. Studies conducted in Brazil have shown the presence of *T. paradoxa* latu s. spores in the digestive system of *R. palmarum*, which may be a potential vector for the inoculum of this fungus (Parra et al., 2003; Carvalho et al., 2011). In different regions of Cameroon, the distribution of *T. ethacetica* was initially restricted to a few hosts. Yet, due to anthropogenic actions during crop care and management, the fungus spread to other regions and hosts (Mbenoun et al., 2015).

Mbenoun et al. (2015) developed microsatellite sequences to investigate genetic diversity in an extensive collection of *T. ethacetica* isolates from various hosts in Cameroon. Four groups were identified. Two groups comprise isolates from *Elaeis guineensis* with a high genetic variability, suggesting that an indigenous population of the pathogen represents these groups. The other two groups (one consisting of isolates from *Theobroma cacao* and the other *A. comosus*) showed a low genetic diversity and probably represent introduced populations. These results suggest that *T. ethacetica* is a taxonomic complex represented by two phylogenetically distinct lineages based on TEF-1 α sequences and flanking regions of microsatellite loci (Mbenoun et al., 2015).

Based on the evaluation of morphological markers, it was not possible to confirm the identity of the etiologic agent. However, it was confirmed that the studied isolates do not belong to *T. paradoxa* s. str., since there were no synnemata. Furthermore, it was possible to confirm that the isolates in this study do not belong to *T. cerberus*, as this species produces only primary conidia. The production of different types of conidia by the same isolate makes the identification and taxonomy of *Thielaviopsis* spp. difficult (Mbenoun et al., 2014). Secondary conidia may eventually have thick walls when fully developed; it can be confused with aleuroconidia. However, spores such as aleuroconidia are different from secondary conidia because they are produced holoblastically and have granulations on the wall (Mbenoun et al., 2014).

Although the isolates in this study are from the Amazonian humid tropics, it is likely that this fungus is present in peach palm plants in other regions of Brazil. In regions located in the Atlantic Forest, the occurrence of *T. paradoxa* latu s. in peach palm fruits causing fruit rot has been observed (author's observations). It is likely that these reports point to *T. ethacetica* since in recent years researchers have performed identification using the morphological species concept. The correct identification of the causative agent of black rot in peach palm fruits is essential to assist in managing the disease and to subsidize studies involving the selection of resistant varieties. In addition, it helps make quarantine decisions easier in order to prevent the introduction and spread of the pathogen's inoculum. This study reports the first occurrence of *T. ethacetica* causing post-harvest rot in peach palm (pupunha) fruits in Brazil. However, further studies are needed to assess the reproductive biology and the fungicide resistance of this species.

5 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Maruzanete Pereira de Melo, Dayse Drielly Souza Santana Vieira, Robison Severo, Leandro Jun Shibutani contributed to conceptualization, sample collection, pathogenicity testing, morphological characterization, preparation of the draft manuscript, review and editing; José Evando Aguiar Beserra Junior, Enayra Sousa, Kedma da Silva Matos, Sarah da Silva Costa and Gilvan Ferreira da Silva contributed with methodology that included extraction, purification, phylogenetic analysis and preparation and review of the manuscript.

6 ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledgements. The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for granting a scholarship and the research funding. JEABJ is the recipient of the 'Productivity in Research (PQ)' fellowship from CNPq. MPM thanks CNPq for funding the research project process no. 435363/2018-2. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical approval

This research did not involve human beings and/or animals.

TABLE 1

Species name	Culture collection number(s) ^a	Host/substrate	Origin	Isolation	Collector (supplier)	GenBank accession numbers ^b	
						ITS	TEF-1a
<i>T. ethacetica</i>	CMM 4882	<i>Bactris gasipaes</i>	Brazil	2018	M.P.Melo	OL623838	OL631623
<i>T. ethacetica</i>	CMM 4883	<i>Bactris gasipaes</i>	Brazil	2018	M.P.Melo	OL623839	OM643318
<i>T. ethacetica</i>	CMM	<i>Bactris gasipaes</i>	Brazil	2018	M.P.Melo	OM643316	OM643317
<i>T. ethacetica</i>	CMM 4909	<i>Bactris gasipaes</i>	Brazil	2018	R. Severo	OL623840	OL631624
<i>T. ethacetica</i>	CMM 4910	<i>Bactris gasipaes</i>	Brazil	2019	R. Severo	OL623841	OL631625
<i>T. ethacetica</i>	CMW 37775; IMI 50560 ET	<i>Ananas comosus</i>	Malaysia		(CABI)	JX518341	JX518309
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36671	<i>Elaeis guineensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518351	JX518319
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36771	<i>Sacharum</i> sp.	South Africa		N. van Wyk (FABI)	JX518330	JX518298
<i>T. ethacetica</i>	CMW 37777; IMI 344082	<i>Cocos nucifera</i>	Tanzania		(CABI)	JX518339	JX518307
<i>T. ethacetica</i>	CMW 36691	<i>Theobroma cacao</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518343	JX518311
<i>T. ethacetica</i>	CMW 28533; CBS 601.70	<i>Ananas comosus</i>	Brazil	1970	M. Barreto Figueiredo (CBS)	JX518331	JX518299
<i>T. cerberus</i>	CMW 36668 T	<i>Elaeis guineensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518348	JX518316
<i>T. cerberus</i>	CMW 35024	<i>Theobroma cacao</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518356	JX518324
<i>T. euricoi</i>	CMW 28537; CBS 893.70 T	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	1970	E. de Matta (CBS)	JX518335	JX518303
<i>T. euricoi</i>	CMW 8790	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia		M.J. Wingfield (FABI)	JX518327	JX518295
<i>T. musarum</i>	CMW 1546 ET	<i>Musa</i> sp.	New Zeland	1962	T.W. Canter-Visscher (FABI)	JX518325	JX518293
<i>T. musarum</i>	CMM 1525	<i>Musa sapientum</i>	Brazil	2015	M. P. Melo	KU052801	KU175887
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36689; CBS 1307.61 ET	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon	1961	M. Mbenoun & J. Roux	JX518342	JX518310
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36642; CBS 130760	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon	1960	M. Mbenoun & J. Roux	JX518346	JX518314
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36654	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518350	JX518312
<i>T. paradoxa</i> s. str.	CMW 36754	<i>Elaeis guinensis</i>	Cameroon		M. Mbenoun & J. Roux	JX518344	JX518318
“ <i>T. paradoxa</i> ”	CMM 1739; CML 2392	<i>Cocos nucifera</i>	Brazil	2012		JQ963886	JQ963883
<i>T. paradoxa</i> s. lat. 1	CMW 28535; CBS 1010.54	<i>Rosa</i> sp.	Netherlands	1954	J.W. Veenbaas- Rijks (CBS)	JX518333	JX518301
<i>T. paradoxa</i> s. lat. 2	CMW 28536; CBS 116770	Palm species	Ecuador	1970	M.C. Aime (CBS)	JX518334	JX518302
<i>T. radicolica</i>	CMW 1032; CBS 114.47 T	<i>Phoenix dactylifera</i>	USA	1947	D.E. Bliss	KF612023	KF612024
<i>T. radicolica</i>	CMW 26389; CBS 167.67	<i>Lawsonia inermis</i>	Mauritania	1967	G.L. Hennebert	KF953932	KF917202
<i>C. fimbriata</i>	CMW 1547	<i>Ipomoea batatas</i>	Papua New Guinea	2005	E.H.C. McKenzie	AF264904	EF070395
<i>C. fimbriata</i>	CMW 15049	<i>Ipomoea batatas</i>	USA	2005	C.F. Andrus; 1937	DQ520629	EF070394

Table 1 – *Thielaviopsis* spp. isolates and sequences used in phylogenetic analysis.

FIGURE 1

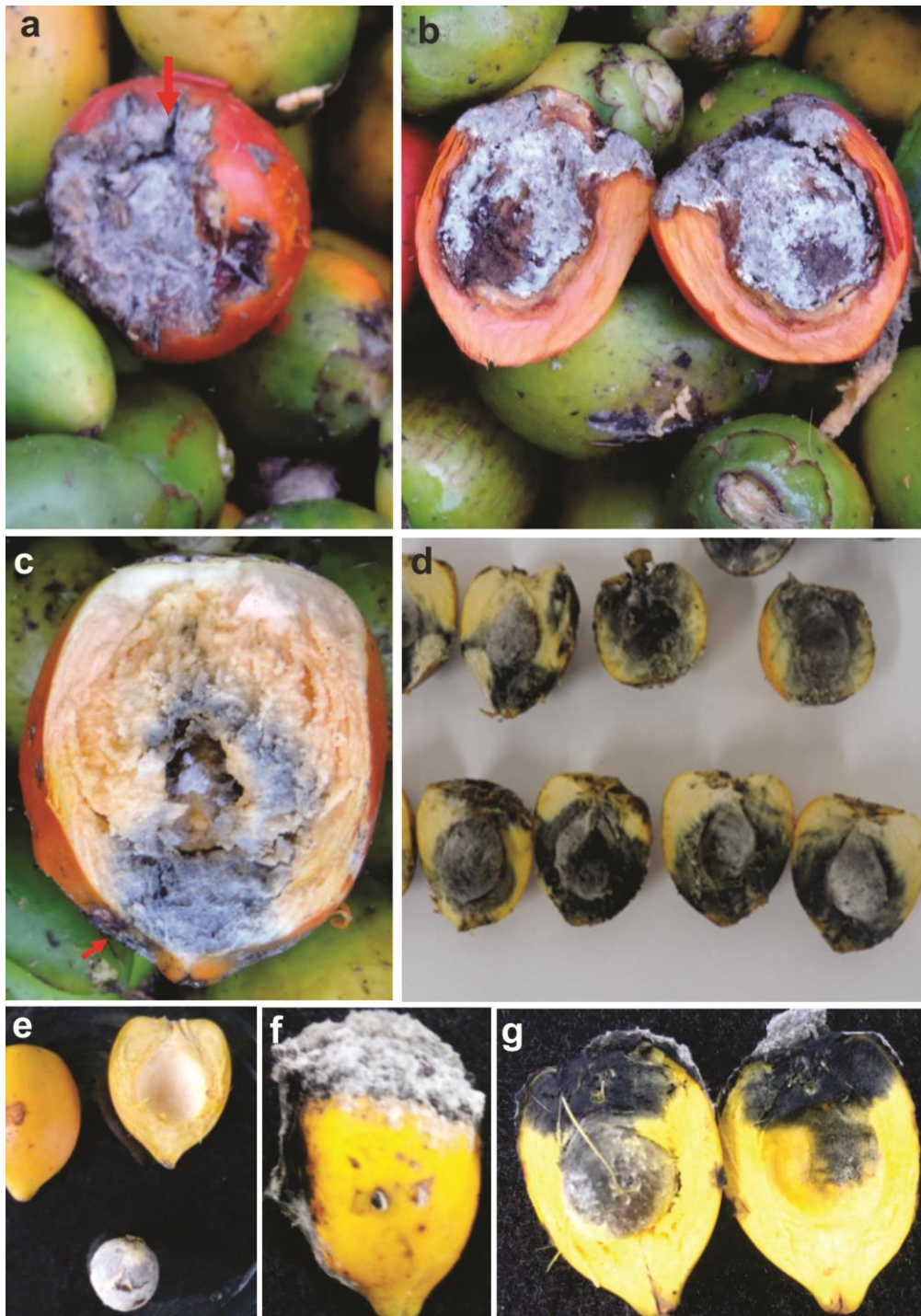


Figure 1 – *Thielaviopsis ethacetica*: a. Rot of the peduncle (arrow indicating injury). b. Sectioned fruit showing colonization of the seed. c. Symptom of pulp rot (arrow indicating injury). d. Black colonization of the pulp. e. Asymptomatic fruits (control). f. Inoculated fruit showing grayish-white mycelium. g. Inoculated fruit showing colonization of the pulp.

FIGURE 2

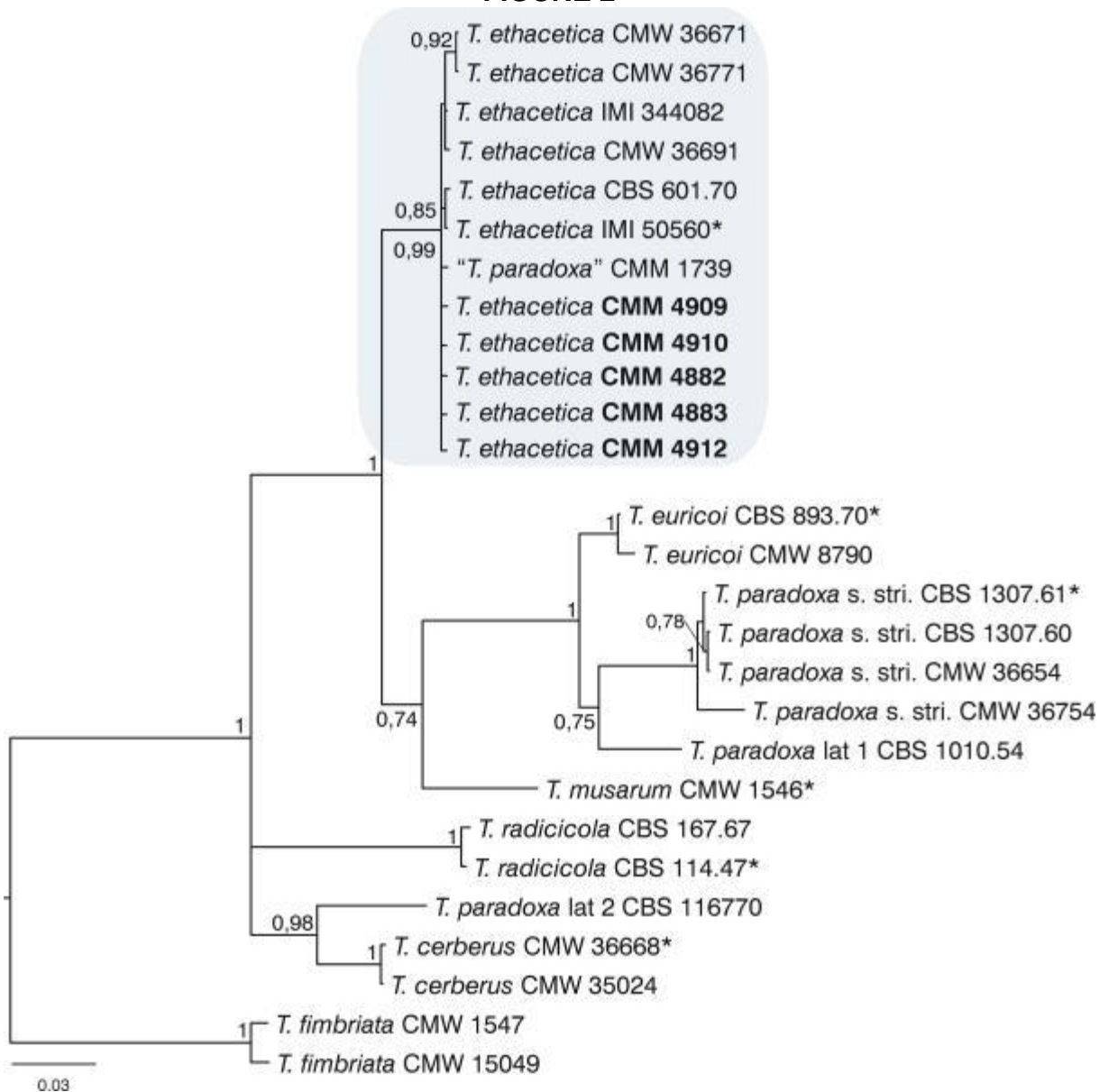


Figure 2 – Bayesian phylogenetic tree of *Thielaviopsis* spp. isolates from *Bractis gassipaes*. The tree was built using concatenated sequences of the genes ITS and TEF-1 α . Bayesian posterior probability values ≥ 0.90 are indicated above the nodes. The sequences generated in this study are highlighted in bold. Sequences from ex-type (T) and ex-epitype (ET) strains are indicated. The scale bar (0.04) represents nucleotide substitutions per site. This tree is rooted with *Thielaviopsis fimbriata*.

FIGURE 3

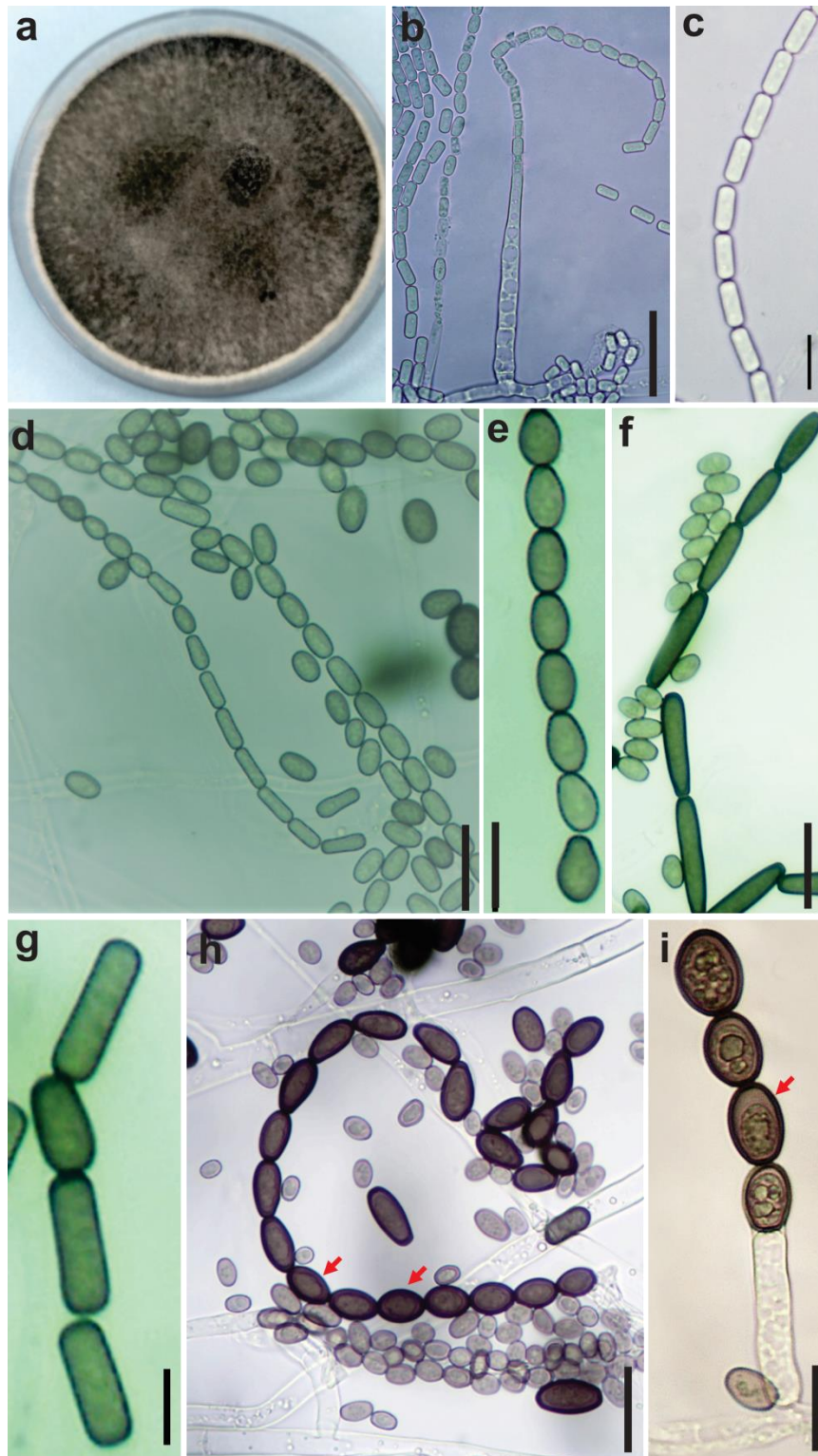


Figure 3 - *Thielaviopsis ethacetica*: a. Dark-colored mycelium. b-c. Primary conidia produced in chains. d, g: Rectangular-shaped secondary conidia. e. Secondary conidia with an oblong shape. f. Secondary conidia with an ellipsoidal shape. h. Secondary conidia (arrow) indicating thick walls. i. Aleuroconidia (arrows) indicating thick walls.

REFERENCES

- Araújo, J. S. P. & Silva, M. A. S. (2010). A palmeira imperial: Da introdução no Brasil-colônia as doenças e pragas no século XXI. *Ciência e Cultura*, 62, 26-28.
- Alves, M. L. B. & Flores, W. B. C. (1982). Teste preliminares para controle da podridão negra em pupunha (*Bactris gassipaes*). *Acta Amazônica*, 12, 499-502. <https://doi.org/10.1590/1809-43921982123499>.
- Borges, A. F., Alcântara Neto, F., Matos, K. S., Beserra Júnior, J. E., Massola Júnior, N. S., Moreira, S. I. & Melo, M. P. (2019). *Thielaviopsis ethacetica* the ethiological agente os sugarcane pineapple sett rot disease in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 44, 460-467. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00298-9>.
- Carvalho, R. R. C., Warwick, D. R. N., Souza, P. E. & Carvalho Filho, J. L. S. (2011) Longevidade de *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da resinose do coqueiro em *Rhynchophorus palmarum*. *Scientia Plena*, 7, 1-6.
- de Beer, Z. W., Duong, T. A., Barnes, I. B. D., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. (2014). Redefining *Ceratocystis* and allied genera. *Studies in Mycology*, 79, 187-219. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.001>.
- Garofalo, J.F., McMillan, R.T. 2004. *Thielaviopsis* diseases of palms. *Proc Fla Hortic Soc* 117:324-325
- Hepperle, D. (2004). SeqAssem©: Win32-Version. a sequence analysis tool conting assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Available at: <http://www.sequentix.de>
- Jacobs, K., Bergdahl, D. R., Wingfield, M. J., Halik, S., Seifert, K. A., Bright, D. E. & Wingfield, B. D. (2004). *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*, 108, 411-418. <https://doi.org/10.1017/S0953756204009748>.
- Kile, G.A.(1993). Plant diseases caused by species of *Ceratocystis* sensu stricto and *Chalara*. In: Wingfield MJ, Seifert KA, Webber JF, eds. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity. St Paul, Minnesota: APS press. p 173-183.
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Mbenoun, M., de Beer, Z. B., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D. & Roux, J. (2014). Reconsidering species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa*

complex, including a new species from oil palm and cacao in Cameroon. *Mycologia*, 106, 757-784. <https://doi.org/10.3852/13-298>.

- Mbenoun, M., Wingfield, M. J., Letsoalo, T., Bihon, W., Wingfield, B. D. & Roux, J. (2015). Independent origins and incipient speciation among host-associated populations of *Thielaviopsis ethacetica* in Cameroon. *Fungal Biology*, 119, 957-972. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.009>.
- McNeill J., Barrie F.R, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, van Prud'homme Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012) *Regnum vegetabile international. code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne code)*: 142. Koeltz Scientific Books, Germany
- Mendes, M. A. S., Silva, V. L., Dianese, J. C., Ferreira, M. A. S. V., Santos, C. E. N., Gomes Neto, E., Urben, A. F. & Castro, C. (1998). *Fungos em Plantas no Brasil*. Embrapa-SPI, Embrapa Cenargem, Brasília.
- Melo, M.P., Matos, K.S., Beserra Jr, J.E.A., Moreira, S.I., Silva, F.F., Neto, F.A., Alves, E., Pereira, O.L. (2016). *Thielaviopsis musarum* causes postharvest crown and fruit rot banana in northeastern Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 41, 258-263. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0094-4>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. 1-8, in: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA.
- Morgan-Jones, G. (1967). *Ceratocystis paradoxa*: CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 143. Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Mota, A. M. & Gasparotto, L. (1998). Fungos associados a “síndrome da queda de frutos” da pupunheira. *Ciências Agrárias*, 7, 69-79
- Oliveira, M. P. (2017). Stem bleeding of açai palm plants, caused by *Ceratocystis paradoxa*, in southern Bahia. *Agrotrópica*, 29, 13-20. <https://doi.org/10.21757/0103-3816.2017v29n1p13-20>.
- Parra, D., Morillo, F., Sánchez, P., Pineda, J. & Guerra, J. (2003). Presencia de *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes Höhn en el tubo digestivo de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Cucurlionidae). *Entomotropica*, 18, 49-55
- Posada, D. & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53, 793-808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>.

- Pinho, D. B., Dutra, D. C. & Pereira, O. L. (2013). Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal postharvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38, 152-157. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000200010>
- Rambaut, A. (2009). Fig Tree 1.2.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Accessed on March 20, 2016.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2011). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539-42. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTALW: 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. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Vêras, S. M, Lima, M. I. P. M, Gasparotto, L.(1997). Doenças de fruteiras da Amazônia. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN, F. A.; REGARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3ª. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2, 1997, p. 406-410.
- Viana, F. M. P., Freire, F. C. O. & Lima, J. S. (2009). Podridão do estipe da palmeira-imperial (*Roystonea oleracea* (Jacq.) Cook) nos Estados do Ceará e Piauí. *Comunicado Técnico Embrapa*.
- Warwick, D. R. N. & Passos, E. E. M. (2009). Outbreak of stem bleeding in coconuts caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Sergipe, Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 34, 175-177. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300007>.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315-322.

Comentários à coordenação do PPGBEES:

A dissertação apresenta uma temática muito interessante e relevante. Poucas correções de cunho nomenclatural necessitam ser realizadas em algumas partes do texto.

A escrita é clara com bibliografia coerente e adequada com o problema proposto.

A pesquisa apresenta excelentes resultados.

Parabéns pela pesquisa desafiadora, pioneira e relevante para a ciência.

Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado**I - Aprovada (X)**

Aprovada: indica que o revisor aprova a dissertação sem ou com correções. Na existência de correções, estas devem ser indicadas nos comentários à coordenação e/ou no próprio documento da dissertação.

IV - Reprovada ()

Reprovada: indica que a dissertação não é adequada.

Nome do membro da banca: Nadja Santos Vitória

Data: 07/08/2022

Assinatura:

Nadja Santos Vitoria

Comentários à coordenação do PPGBEES:

A dissertação foi bem redigida e os resultados apresentam grande relevância científica. As figuras foram muito bem feitas. Identifiquei no texto alguns pequenos erros de digitação, parágrafos duplicados e falta de itálico em alguns nomes científicos, mas são detalhes que podem ser revistos pela discente. Fiz alterações com controle de alterações e comentários no texto.

A introdução geral não contém citações para as informações no texto, mas acredito ser devido as normas do programa, pois no restante da dissertação foram incluídas as citações nos parágrafos.

Nos resultados do primeiro capítulo senti falta da inclusão dos dados moleculares de uma das espécies encontradas, a *Thielaviopsis cerberus*. Apesar da autora mencionar sobre a possibilidade de identificação morfológica, como propõem uma espécie de praga quarentenária para o Brasil, é muito importante uma caracterização precisa e por mais de um método. Senti falta também dos resultados do teste de homotalismo descrito na metodologia do Capítulo I.

Para o capítulo 2, senti falta de um parágrafo inicial falando da origem, importante e usos da pupunha. Isso é importante para os leitores estrangeiros que podem não ter esse conhecimento.

Diante da qualidade e relevância dos resultados, aprovo a dissertação com correções.

Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado**I - Aprovada (X)**

Aprovada: indica que o revisor aprova a dissertação sem ou com correções. Na existência de correções, estas devem ser indicadas nos comentários à coordenação e/ou no próprio documento da dissertação.

IV - Reprovada ()

Reprovada: indica que a dissertação não é adequada.

Nome do membro da banca: Alexandre Reis Machado

Data: 12/08/2022

Assinatura:

Alexandre Reis Machado

Comentários à coordenação do PPGBEES:

A dissertação da Fabiane Rocha está muito bem redigida e apresenta resultados de grande relevância técnica-científica para o estado do Pará e para o Brasil. A organização da obra está de acordo com o método científico, com hipótese bem definida e objetivos e metodologias adequados para testar a hipótese levantada. Destaca-se a redação de um dos capítulos em Inglês, o que facilita a divulgação do trabalho no meio científico internacional (ressalto que os resultados também possuem relevância internacional). Deste modo, meu parecer é pela aprovação da dissertação da Fabiane. Contudo, correções no texto são necessárias (envio as minhas correções e comentários detalhados no próprio texto da dissertação).

Avaliação final do projeto de dissertação de mestrado**I - Aprovada (x)**

Aprovada: indica que o revisor aprova a dissertação sem ou com correções. Na existência de correções, estas devem ser indicadas nos comentários à coordenação e/ou no próprio documento da dissertação.

IV - Reprovada ()

Reprovada: indica que a dissertação não é adequada.

Nome do membro da banca: Cristiano Souza Lima

Data: 13/08/2022

Assinatura:

