



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil

Suzilaine Yasmim da Silva Cavalcante

**Recife - PE
2020**

SUZILÂINE YASMIM DA SILVA CAVALCANTE

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO NEGRA DA CENOURA NO
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE)

**RECIFE - PE
FEVEREIRO - 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C376e Cavalcante, Suzilaine Yasmim da Silva Cavalcante
Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil / Suzilaine Yasmim da Silva Cavalcante Cavalcante. - 2020.
57 f. : il.
- Orientador: Andre Angelo Medeiros Gomes.
Coorientador: Marcos Paz Saraiva Camara.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, 2020.
1. Apiaceae. 2. Daucus carota. 3. Filogenia. 4. Thielaviopsis basicola. I. Gomes, Andre Angelo Medeiros, orient. II.
Camara, Marcos Paz Saraiva, coorient. III. Título

CDD 632

**ETIOLOGIA DA PODRIDÃO NEGRA DA CENOURA NO
BRASIL**

SUZILÂINE YASMIM DA SILVA CAVALCANTE

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 28/02/2020

ORIENTADOR:



Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes (UFRPE)

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Humberson Rocha Silva (UFRPE)



Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (UFPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2020**

*Aos meus amados pais, Solange Barbosa da Silva
e Genivaldo de Jesus Cavalcante, e ao meu
irmão, Fábio Barbosa da Silva, exemplos de
amor e determinação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida e sempre guiar meus passos.

Aos meus pais, Solange Barbosa da Silva e Genivaldo de Jesus Cavalcante, pelo amor, educação e força, e por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Ao meu irmão, Fábio Barbosa da Silva, pelo apoio, companheirismo e por constantemente acreditar no meu potencial.

A minha tia-mãe, Classiane Barbosa da Silva, pelo amor, acolhimento e apoio incondicional. Ao meu eterno Dindinho, Carlos Santos Barbosa (*in memoriam*), pelos sorrisos, conselhos e por me proporcionar bem-estar e alegria sempre que esteve ao meu lado.

As minhas amigas inestimáveis, Denise Costa e Monique Costa, pelo amor, orações, confiança e pelos incentivos que nunca me fizeram desistir.

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Angelo Medeiros Gomes, pelas orientações, incentivo e paciência.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcos P. S. Câmara, pelo suporte tecnológico no desenvolvimento dos estudos moleculares.

A Dr.^a Josiene S. Veloso, por toda assistência, paciência e ensinamentos durante o processo de análise molecular.

A todos os componentes do Laboratório de Patologia Pós-Colheita, Adriana, Athaise, Barbara, Erasmo, Mirelly e Wallingson, pelo bom convívio e momentos de descontração.

Ao Kledson Mendes, pelo carinho, cuidado, paciência, por toda ajuda e dedicação, e por sempre me deixar bem nos meus momentos de estresse.

As “Três é demais”, Isabella Feitosa e Isabel Cesária, pela amizade, companheirismo e por me proporcionarem tantos momentos de alegrias.

A todos os colegas que Recife me presenteou, pelos auxílios diversos, profissionais e pessoais, fazendo com que as tribulações do cotidiano se tornassem leves e passageiras.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta etapa em minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO GERAL | vii |
| GENERAL ABSTRACT | viii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 10 |
| 1. Aspectos gerais e importância da cultura da cenoura | 10 |
| 2. Principais doenças da cenoura | 12 |
| 3. Podridão negra da cenoura..... | 13 |
| 3.1. Patógenos associados à podridão negra da cenoura | 13 |
| 4. <i>Berkeleyomyces basicola</i> e o gênero <i>Thielaviopsis</i> | 14 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |
| CAPÍTULO II..... | 10 |
| ABSTRACT | 23 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| RESULTADOS | 32 |
| DISCUSSÃO | 34 |
| AGRADECIMENTOS | 37 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 54 |

RESUMO GERAL

A podridão negra é uma das principais doenças pós-colheita da cenoura (*Daucus carota* L.). No Brasil, esta doença foi relatada no Rio Grande do Sul, Maranhão e no Distrito Federal, nos últimos anos, sua ocorrência tem se difundido expressivamente nos principais pólos produtores de cenoura. A taxonomia do agente causal é bastante complexa, o mesmo já foi reclassificado diversas vezes. O presente trabalho teve como objetivos: a) obter isolados associados à podridão negra da cenoura; b) identificar filogeneticamente os isolados obtidos; c) avaliar a influência da temperatura no crescimento micelial em diferentes meios de cultura; d) testar a patogenicidade dos isolados. Foram obtidos 18 isolados a partir de cenouras com sintomas de podridão negra. Análises de sequências de DNA a partir dos conjuntos de dados das regiões LSU (LR0R e LR5), MCM7 (Cer-MCM7F e Cer-MCM7R) e 60S (60S-506F e 60S-908R) foram realizadas. Todas as sequências obtidas foram comparadas com 27 sequências parciais de DNA do Genbank de espécies da família Ceratocystidaceae. Análises filogenéticas a partir de Inferência Bayesiana com conjunto de dados individuais e concatenado concluiu que os isolados utilizados neste estudo agruparam-se consistentemente no gênero *Berkeleyomyces*. As análises do gene individual MCM7 e a concatenada possibilitou a distinção das espécies dentro do gênero, identificando os isolados como *B. basicola*. A temperatura ótima para o crescimento micelial variou entre 22,35 e 22,9 °C para BDA e MA, respectivamente. Houve diferença significativa entre os isolados em relação aos níveis de agressividade, com lesões variando entre 0,5 e 1,2 cm de diâmetro. O presente estudo revela que *B. basicola* é o agente causal da podridão negra da cenoura no Brasil e que a região gênica MCM7 possibilita consistentemente a distinção de espécies dentro do gênero *Berkeleyomyces*, quando comparado com os outros genes utilizados neste estudo.

Palavras-chave: Apiaceae; *Daucus carota*; Filogenia; *Thielaviopsis basicola*.

GENERAL ABSTRACT

Black rot is one of the main post-harvest diseases of carrots (*Daucus carota* L.). In Brazil, this disease has been reported in Rio Grande do Sul, Maranhão and the Federal District, in recent years, its occurrence has been spreading expressively in the main centers producing carrots. The taxonomy of the causal agent is quite complex, it has been reclassified several times. The present work had as objectives: a) to obtain isolates associated with black carrot rot; b) phylogenetically identify the isolates obtained; c) evaluate the influence of temperature on mycelial growth in different culture media; d) test the pathogenicity of the isolates. They were obtained 18 isolates from carrots with black rot. Analysis of DNA sequences from the LSU data sets of regions (LR5 and LR0R), MCM7 (Cer-Cer-MCM7F and MCM7R) and 60S (60S-60S-506F and 908R) were performed. All sequences obtained were compared with 27 partial DNA sequences from Genbank of species of the family Ceratocystidaceae. Phylogenetic analyzes based on Bayesian Inference with individual and concatenated data set concluded that the isolates used in this study were consistently grouped in the genus *Berkeleyomyces*. The analyzes of individual gene MCM7 and concatenated possible to distinguish the species within the genus, identified as *B. basicola* isolated. The optimum temperature for mycelial growth varied between 22.35 and 22.9 °C for PDA and MA, respectively. There was a significant difference between the isolates in relation to the levels of aggressiveness, with lesions varying between 0.5 and 1.2 cm in diameter. The present study shows that *B. basicola* is the causal agent of black rot of carrots in Brazil and MCM7 gene region consistently enables the distinction of species within the genus *Berkeleyomyces* compared with the other genes used in this study.

Keywords: Apiaceae; *Daucus carota*; Phylogeny; *Thielaviopsis basicola*.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

ETIOLOGIA DA PODRIDÃO NEGRA DA CENOURA NO BRASIL

INTRODUÇÃO GERAL

1. Aspectos gerais e importância da cultura da cenoura

A cenoura (*Daucus carota* L.) pertence à família Apiaceae. É originária da Ásia Central, região atual do Irã e Afeganistão. Foi difundida na região Mediterrânea no século VII, tendo boa aceitabilidade pelos europeus que a introduziram nas Américas no início de sua colonização, e tem sido cultivada por centenas de anos até os dias de hoje (DOSSA; FUCHS, 2017; MACKEVIC, 1929; SIMON et al., 2008). É uma planta bianual, herbácea que produz raiz comestível, pivotante reta e sem ramificações perceptíveis, consistindo na principal parte comercializada dessa cultura. Possui caule pouco expressivo, podendo apresentar um comprimento de 30 a 50 cm de altura e folhas oriundas de folíolos recortados, que podem atingir um metro de altura acima do solo (DOSSA; FUCHS, 2017; FILGUEIRA, 2003).

A produção de cenoura é uma atividade notória em todo o mundo, está entre as dez principais hortaliças economicamente importantes, no que diz respeito a área de produção e valor de mercado, devido a sua ampla utilização na alimentação humana, industrial, médica e farmacêutica (SIMON et al., 2008). Desde os primórdios da civilização, há relatos da aplicação de suas folhas para combater tumores cancerígenos, além de possuir uma fonte relevante de betacaroteno, um hidrocarboneto precursor de vitamina A (CHITARRA; CARVALHO, 1984; ELZEBROEK, 2008).

De acordo com a estimativa da produção média anual de cenoura em 2014, a China é o maior produtor mundial, responsável por cerca de 17 milhões de toneladas, seguido pelos Estados Unidos, que produziu cerca de dois milhões de toneladas e em terceiro lugar, a Rússia com 1,7 milhões de toneladas (FAO, 2015).

O Brasil é responsável por produzir cerca de 780 mil toneladas de cenoura anualmente, e é considerado o sexto maior produtor mundial (CARVALHO, et al., 2017; FAO, 2015). Segundo a Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças de Hortaliças (ABCSEM), em 2015, a cultura da cenoura impulsionou o mercado nacional, gerando uma movimentação financeira de 156 milhões de reais. A produção brasileira, se

destaca-se com uma área plantada equivalente a 30 mil hectares, sendo a terceira hortaliça mais comercializada em centrais de abastecimentos no país (IBGE, 2018).

Essa hortaliça é cultivada em todo território nacional, as principais regiões que se destacam como produtoras em larga escala é o Sudeste (335 mil toneladas), enfatizando os estados de Minas Gerais e São Paulo, o Sul (85 mil toneladas), com destaque para os estados do Rio Grande do Sul e Paraná, o Nordeste (42 mil toneladas), com a Bahia e Pernambuco, o Centro-Oeste (17 mil toneladas), com Mato Grosso do Sul, e no Norte (19 mil toneladas). Esses são importantes pólos produtores de cenoura, estando distribuídos em quase todo o país e, com isso, é possível observar, a relevância dessa cultura em território nacional (DOSSA; FUCHS, 2017; CARVALHO, et al., 2011; CEPEA, 2016).

Com o advento da biologia genética foi possível ao longo dos anos cultivar e domesticar a cultura da cenoura, uma vez que, anteriormente, por volta do século XX, sua produção era em pequenas escalas, em cultivos familiares ou coletivos (SIMON et al., 2008).

Baseado em suas particularidades, as cenouras são subdivididas em dois grupos: inverno e verão. Estes, levam em consideração algumas características básicas como as condições edafoclimáticas favoráveis a cultura e a resistência às doenças (SOUZA; RESENDE, 2003).

As cenouras cultivadas no Brasil anteriormente, até a década de 1980, eram tidas como cultivares de inverno, pois as mesmas eram oriundas de países de clima frio como a França, Estados Unidos e Japão. Devido a isso, cientistas e trabalhadores rurais sentiram a necessidade de adequar as cenouras para climas mais quentes, como o do Brasil, desta forma, foram desenvolvidas as cultivares Brasília e Kuronan (VILELA; BORGES, 2008). As sementes utilizadas no Nordeste, tida como uma das regiões mais quentes do país, são as do grupo verão, pois estas são bem adequadas para às altas temperaturas até mesmo no inverno. É possível notar que, nas regiões Norte e Nordeste, a adoção da cultivar de cenoura ‘Brasília’ é de quase 100% e alcança todos os Estados, com cultivos durante o ano inteiro (VILELA; BORGES, 2008).

Essa cultivar foi criada pela Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Brasília (UEPAE) - EMBRAPA, adquirida por programas de melhoramento genético, durante quatro anos, tendo sua amostra genética materna oriunda de um colégio em Viamão – Rio Grande do Sul. Os exemplares de cenouras foram coletados e trazidos para UEPAE no segundo semestre de 1976. Apresenta porte médio, com folhas bem desenvolvidas, conferindo resistência a doenças de parte aérea, possibilitando uma melhor produção e desenvolvimento

na época seca. Possuem raízes retas, um pouco arredondadas, de tonalidade alaranjadas podendo atingir cerca de 14 a 16 cm de comprimento (CEAGESP, 2000).

Mesmo com a importância dessa hortaliça para o país, e apesar das cultivares incluídas nos últimos anos terem boa aceitação no mercado, estas ainda assim, são bastante suscetíveis ao ataque de microrganismos fitopatogênicos. Em função disso, o cultivo desordenado, com o intuito de satisfazer o consumo comercial local, assim como, a produção em larga escala com material de propagação homogêneo, faz com que o aumento da incidência de doenças seja substancial. Estas doenças são caracterizadas inicialmente com sintomas no campo e se estendem até a pós-colheita, que além dos prejuízos elencados na produção, também são observadas perdas qualitativas e quantitativas durante o transporte, armazenamento e comercialização (LOPES; REIS, 2016; OLIVEIRA et al., 2006).

2. Principais doenças da cenoura

Problemas de origem fitossanitária podem comprometer a produção e a qualidade das culturas, uma vez que, afetam órgãos essenciais das plantas, como raízes, caules, folhas e frutos, gerando grandes perdas em culturas comerciais (PEREIRA; CARVALHO; PINHEIRO, 2013). Dentre os fatores bióticos, as doenças possuem grande relevância, pois ocorrem em todas as fases de desenvolvimento, desde o plantio até a colheita das plantas e resultam em queda da produtividade e da qualidade das hortaliças (LOPES; REIS 2016).

De uma maneira geral, essas culturas podem ser acometidas por diversos microrganismos fitopatogênicos, dentre eles destacam-se as bactérias, fungos, nematoides e vírus. Vale ressaltar que os fungos são os principais causadores de doenças em plantas (LOPES; REIS, 2016).

A cultura da cenoura possui suscetibilidade a diversos fitopatógenos em todos os estádios do seu desenvolvimento, sofrendo com inúmeras doenças. Dentre as doenças da parte aérea, cita-se a queima das folhas ocasionada por *Alternaria dauci* (J.G. Kühn) J. W. Groves & Skolko, *Cercospora carotae* (Pass.) Kazn. & Siemaszko, e *Xanthomonas campestris* pv. *Carotae* (Kendrick) Dye e Oídio (*Erysiphe heraclei* DC). Doenças de colo e de raiz, como Tombamento de plantas (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn), Sarna comum (*Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman & Henrici), Podridão de esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), Podridão de esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), Galhas (*Meloidogyne* spp.). As podridões pós-colheita, Podridão de *Geotricum* (*Geotrichum* sp), Podridão basal (*Fusarium oxysporum* sensu Smith & Swingle), Podridão de *Rhizopus* (*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.)

Vuill.), e Podridão Negra causada por *Berkeleyomyces basicola* (Berk. & Broome) W.J. Nel, Z.W. de Beer, T.A. Duong, M.J. Wingfield.

3. Podridão negra da cenoura

A podridão negra da cenoura, causada pelo fungo *Berkeleyomyces basicola* (= *Thielaviopsis basicola* (Berkeley e Broome) Ferraris, é uma das principais doenças pós-colheita da cenoura. É caracterizada pela presença de lesões necróticas de coloração negra em diversas partes das raízes. Com o desenvolvimento da doença, a necrose retarda o crescimento das mesmas, e conseqüentemente há uma redução no vigor e rendimento da cultura (KING; PRESLEY, 1942; COUMANS et al., 2011).

O sintoma mais característico ocorre após a colheita, geralmente no decorrer do processo de beneficiamento. Uma vez que, as cenouras são submetidas ao processo de lavagem e acondicionamento em caixas plásticas ou de papel, sob condições de alta umidade, baixa ventilação e temperatura acima de 25 °C. É possível constatar o aparecimento de lesões de coloração acinzentada. À medida que, a doença progride, essas lesões aumentam de tamanho e sua tonalidade escurece, tornando-se pretas devido à produção de clamidósporos (estruturas de resistência) e fialósporos (esporos). Inicialmente, as lesões são superficiais, tornando-se amolecidas à medida que o patógeno coloniza as camadas de células mais internas da raiz. A esporulação do fungo ocorre principalmente nas rachaduras ou injúrias superficiais das raízes causadas durante o beneficiamento da cenoura (LOURENÇO JUNIOR; REIS; LOPES, 2019).

Esta doença é estudada desde a sua primeira constatação no Brasil em 2004, no estado do Rio Grande do Sul, onde vem sendo relatado o aumento acentuado de sua ocorrência nos últimos anos, presente nas principais regiões produtoras de cenoura (LOURENÇO JUNIOR; REIS; LOPES, 2019). Desde então, esta doença tem ganhado cada vez mais ênfase, inclusive devido as perdas ocasionadas na cultura, em indústrias agrícolas, pois os sintomas nas raízes se estendem até a pós-colheita, inviabilizando sua comercialização.

3.1. Patógenos associados à podridão negra da cenoura

A podridão negra da cenoura é uma das principais doenças pós-colheita no Brasil (LOPES; REIS 2016). Essa doença foi descrita há vários anos em diversos países, apresentando uma identificação confusa e atribuída a diversos agentes etiológicos. Na Austrália, foi diagnosticada com o agente causal *Thielaviopsis punctulata* (Hennebert) A. E.

Paulin, T. C. Harr. & McNew (= *T. radicola* (Bliss) Z.W. De Beer & W. C. Allen) (VAN WYK et al., 2009). Nos Estados Unidos e Reino Unido, *Chalara thielavioides* (Peyronel) (= *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau) também foi associada a esta doença (NAG RAJ; KENDRICK, 1975). Na Holanda e Sérvia, raízes de cenoura armazenadas foram diagnosticadas com a presença de manchas necróticas irregulares, com micélio de coloração negra, que posteriormente, foi possível comprovar que o agente causal era *Chalaropsis thielavioides* Peyronel com base em estudos moleculares (KASTELEIN et al., 2007; MILOSAVLJEVIC et al., 2015).

Enfatizando o contexto brasileiro, acredita-se que esse fitopatógeno foi introduzido no país, por meio de turfa importada infectada, onde estas eram utilizadas para o processamento de substrato na confecção de mudas (TEIXEIRA-YAÑEZ, 2005). A doença conhecida como podridão negra da cenoura, foi primeiramente relatada no Rio Grande do Sul em 2004 e mais recentemente no Distrito Federal, (Inácio et al., 2012), posteriormente no Maranhão, (Silva; Costa, 2013), todos associados a *B. basicola*. Porém, em raízes de cenoura comercializadas no Rio de Janeiro foi diagnosticado estruturas teleomórficas de *Ceratocystis fimbriata* em associação com a podridão negra da cenoura (CARVALHO; CARMO, 2003).

4. *Berkeleyomyces basicola* e o gênero *Thielaviopsis*

Atualmente, a família Ceratocystidaceae compreende oito grupos principais bem consolidados, incluindo os gêneros *Ceratocystis sensu stricto*, *Chalaropsis*, *Berkeleyomyces*, *Thielaviopsis*, *Endoconidiophora*, *Davidsoniella*, *Ambrosiella* e *Huntliella*.

Espécies do gênero *Thielaviopsis* são causadoras de podridões em inúmeras culturas que são distribuídas globalmente. *Thielaviopsis* (T.) *basicola* (Berkeley; Broome) Ferraris *B. basicola* é considerado um patógeno significativo de raiz, e já foi diagnosticado causando doenças em dezenas de espécies de plantas, grande parte possui importância econômica acentuada, incluindo alface, algodão, amendoim, citros, cenoura, soja, tabaco e chicória (GELDENHUIS et al., 2006; COUMANS et al., 2011). Bem como, *T. paradoxa* já foi relatada ocasionando podridões em cana de açúcar, fumo e abacaxi (HOLTZ; WEINHOLD, 1994; KIMATI et al., 1997).

A espécie *T. basicola* também foi relatada causando a doença conhecida como podridão negra em raízes de algodoeiro, cenoura e maracujazeiro, e existe uma infinidade de trabalhos que apresentam contradições quanto a identificação desse gênero (HOLTZ; WEINHOLD, 1994; KIMATI et al., 1997; PEREG, 2013).

As principais características desse fungo estão relacionadas com a penetração através de aberturas naturais ou ferimentos para sua infecção. No campo, as injúrias ocasionadas por implementos agrícolas durante os tratos culturais, são a principal forma de penetração do fungo no tecido celular do vegetal. A fase teleomórfica desse fitopatógeno é desconhecida, sendo assim, na fase assexual, apresenta conidióforos que formam fiálides com fialoconídios unicelulares, hialinos, cilíndricos e aleuroconidióforos septados, individuais ou em curtas cadeias com coloração marrom. Podem sobreviver saprofiticamente ou formar clamidósporos (esporos de resistência) unicelulares, de coloração marrom escuro, que ficam em repouso e podem sobreviver no solo por longos períodos (DE BEER et al., 2014; ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

Esse fitopatógeno, inicialmente denominado *Torula* (To.) *basicola* foi identificado por Berkeley e Broome em meados de (1850), causando doença na cultura da ervilha (*Pisum sativum* L.) e "*Nemophila auriculata*" na Inglaterra. Entretanto, antes da descoberta de *T. basicola*, outras denominações também foram propostas para esse mesmo fungo, são elas, *Sporoschisma paradoxum*, por de Seynes (1874), em seguida, Saccardo o encaixou como pertencente ao gênero *Chalara* em 1892. Com isso, houve vários estudos taxonômicos para essa espécie, com a finalidade de encontrar um gênero adequado para ela.

Nesse contexto, com o intuito de determinar a primeira descrição para esse fungo, juntamente com os resultados de diversos trabalhos, o mesmo foi atribuído em sete gêneros diferentes, com quatro epítetos distintos (BERKELEY; BROOME, 1850; SOROKÓN, 1876; MASSEE, 1884; SACCARDO, 1886; NAG RAJ; KENDRICK, 1975; CARMICHAEL et al., 1980).

Algumas décadas mais tarde, Ferraris fez a transferência de *To. basicola* para *T. basicola* e o encaixou como sendo a fase teleomórfica de *Thielavia* (Th) *basicola* (ZOPF, 1876). Levando em consideração o sistema de dupla nomenclatura para fungos, utilizando o estado teleomorfo como padrão (Artigo 59, Código de Viena e anteriores), vários pesquisadores mencionavam *Th. basicola* para argumentar essas espécies (NAG RAJ; KENDRICK, 1975). Porém, McCormick (1925), desenvolveu vários experimentos utilizando culturas monospóricas de *T. basicola* e *Th. basicola* e comprovou que as duas espécies não estavam relacionadas. Essas descobertas levaram a um caos na literatura, uma vez que, os autores não conseguiram incluir o estado sexual para esse fungo. Devido a isso, na época atual, esse fitopatógeno é conhecido apenas por seu estado anamorfo, visto que, após o

estudo de McCormick (1925), nenhum outro autor descreveu um estado sexual para *T. basicola*.

A taxonomia de *T. basicola* ainda é considerada confusa, de modo que, inúmeros trabalhos sugeriram mudanças em sua nomenclatura (ABBAS et al., 2007). O mesmo é considerado um fungo habitante do solo, que pertence ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Microascales, Família Ceratocystidaceae (SACCARDO, 1892).

Em estudos desenvolvidos recentemente, foi constatado que, *T. basicola* não está relacionado com espécies do gênero *Thielaviopsis* dentro da Família Ceratocystidaceae, confirmando os resultados dos trabalhos de Beer et al., (2014), que demonstraram através de estudos moleculares, que *T. basicola* arranhou-se na família Ceratocystidaceae “*incertae sedis*”, onde resulta que, este táxon não foi disposto de maneira consistente dentro dos sete maiores clados formados dentro desta família. De Beer et al., (2014) utilizaram três regiões gênicas LSU, MCM7 e 60S para avaliar filogeneticamente a localização de *T. basicola* dentro dessa família, e foi possível concluir que o fungo não estava associado com espécies do gênero *Thielaviopsis*.

Atualmente, trabalhos desenvolvidos com diversos isolados descritos como *T. basicola*, apresentou duas linhagens monofiléticas representando um novo gênero dentro da família Ceratocystidaceae (NEL et al., 2018). O mesmo ficou sendo representado por *Berkeleyomyces basicola*, apoiando os resultados obtidos, com avaliações das análises de sequências de seis regiões gênicas para a subunidade ribossomal grande (LSU), a proteína 60S ribossômica RPL10 (60S), a região espaçadora transcrita interna (ITS), a actina (ACT), o componente complexo de manutenção do minicromossomo 7 (MCM7) e a RNA polimerase II segunda maior subunidade (RPB2) com características morfológicas das espécies crípticas de *B. basicola*, sendo designada como espécie de referência para esse fungo, entretanto, os demais isolados utilizados neste estudo, foram descritos como uma nova espécie, *Berkeleyomyces rouxiae*. Essas duas espécies são consideradas crípticas pois são morfológicamente semelhantes, e devido a isso, não conseguem ser separadas na ausência de dados moleculares (NEL et al., 2018).

Com o advento da biologia molecular e das descobertas de espécies próximas a *B. basicola*, é possível supor que outras espécies também possam estar associadas a doença podridão negra da cenoura, uma vez que, elas apresentam características bastante semelhantes. Diante da importância dessa cultura para o Brasil, bem como, as divergências quanto a taxonomia de seu agente causal, o objetivo deste trabalho foi obter isolados a partir

de cenouras com sintomas de podridão negra, oriundas de diversas regiões produtoras do Brasil, caracterizar os isolados através de estudos moleculares, bem como, relatar a ocorrência de organismos fúngicos, próximos ao gênero *Thielaviopsis*, que podem estar associados a podridão negra da cenoura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. Q.; NIAZ, M.; GHAFAR A. *Thielaviopsis basicola*: a potential threat to agriculture and forestry in Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 3, p. 985-990, 2007.

ABCSEM, Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudanças. Projeto para o levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil, 2010/2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arqeditor/file/camaras_setoriais/Hortalicas/Dados_Economicos/ABCSEM%202011.pdf. Acessado em 05 de fevereiro de 2020.

BERKELEY, M. J.; BROOME, C. E. XXXIV Notices of British Fungi. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v. 15, n. 88, p. 312-322, 1865.

CARMICHAEL, J. W.; KENDRICK, W. B.; CONNERS, I. L. SIGLER, L. **Genera of Hyphomycetes**. Edmonton, 1980. 386 p.

CARVALHO, C. et al. **Anuário Brasileiro de Hortaliças 2017**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017. 60p.

CARVALHO, A. O.; CARMO, M. G. F. Podridão pós-colheita de cenoura causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 108, 2003.

CARVALHO, A. D. F.; VIEIRA, J. V.; SILVA, G. O.; NASCIMENTO, W. M. **Produção sementes de cenoura**. Embrapa Hortaliça. Brasília, 2011, 27 p.

CEAGESP. Classificação de cenoura: programa de adesão voluntária, São Paulo: Programa Horti e Fruti, 2000. 8 p.

CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/br>; Acesso em: 28 de janeiro de 2020.

CHITARRA, M. I. F.; CARVALHO, V. D. Cenoura: Qualidade e Industrialização. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 120, 1984.

COUMANS, J. V. F.; HARVEY, J.; BACKHOUSE, D.; POLJAK, A.; RAFTERY, M. J.; NEHL, D.; KATZ, M. E.; PEREG, L. Proteomic assessment of host-associated microevolution in the fungus *Thielaviopsis basicola*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 576-588, 2011.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; BARNES, I.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Redefining *Ceratocystis* and allied genera. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 79, p. 187-219, 2014.

DOSSA, D.; FUCHS, F. CENOURA: Produção, mercado e preços na CEASA - PR. **Boletim Técnico**, v. 04, p. 1-8, 2017.

DE SEYNES, J. **Recherches pour servir a l'Histoire naturelle des vegetaux inferieurs**. Paris, 1874, 86 p.

ENGELBRECHT, C. J.; HARRINGTON, T. C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. **Micologia**, Barcelona, v. 97, p. 57-69, 2005.

ELZEBROEK, A.T. G. **Guide to cultivated plants**. In: CABI. Wallingford, 2008, 496 p.

FAOSTAT. The World's Top Carrot Producing Countries. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 17 de fevereiro 2020.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3ª Ed. Viçosa: UFV, 2003, 412 p.

GELDENHUIS, M.M.; ROUX, J.; CILLIERS, A.J.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Clonality in South African isolates and evidence for a European origin of the root pathogen *Thielaviopsis basicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, n. 3, p. 306-311, 2006.

HOLTZ, B. A.; WEINHOLD, A. R. *Thielaviopsis basicola* in San Joaquin Valley soils and the relationship between inoculum density and disease severity of cotton seedlings. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 986-990, 1994.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **SIDRA**: sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2020.

INÁCIO, C. A.; LEMES, G. P.; CAFÉ-FILHO, A. C.; LOPES, C. A. First report of *Thielaviopsis basicola* causing black rot on carrot in Central Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p. 752, 2012.

KASTELEIN, P.; TILMA, E.S.C.; ELDERSON, J.; KOHL, J. Occurrence of *Rhexocercosporidium carotae* on cold stored carrot roots in the Netherlands. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, p. 293-305, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas (Vol. 2)**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, 774 p.

KING, C. J.; PRESLEY, J. T. A root rot of Cotton caused by *Thielaviopsis basicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, n. 9, 1942.

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças da cenoura**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2016, 67 p.

LOURENÇO JUNIOR, V.; LOPES, C. A.; REIS, A. **Podridão negra da cenoura**. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2019, 8 p.

MACKEVIC, V. I. The carrot of Afghanistan. **Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 20, p. 517-562, 1929.

MASSEY, G. E. Description and life-history of a new fungus, *Milowia nivea*. **Journal of the Royal Microscopical Society**, Oxford, v. 4, 842-5, 1884.

MCCORMICK, F. A. Perithecia of *Thielavia basicola* Zopf in culture and the simulation of their production by extract from other fungi. **Connecticut Agricultural Experiment Station**, New Haven, p. 269, 1925.

MILOSAVLJEVIĆ, A.; TRKULJA, N.; POPOVIĆ, T.; IVANOVIĆ, Ž.; MITROVIĆ, M.; JOVIĆ, J.; TOŠEVSKI, I. First report of *Thielaviopsis thielavioides*, a causal agent of postharvest blackening on *Daucus carota* in Serbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, p. 1274, 2015.

NAG RAJ T.R.; KENDRICK W.B. **A Monograph of Chalara and Allied Genera**. Waterloo, 1975, 200 p.

NEL, W. J.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; DE BEER, Z. W. A new genus and species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 871-882, 2018.

OLIVEIRA, S. D.; TERAPO, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília, 2006. 855 p.

PEREG, L. L. Black root rot of cotton in Australia: the host, the pathogen and disease management. **Crop and Pasture Science**, Victoria, v. 64, p. 1112-1126, 2013.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. Recomendações para o manejo da septoriose em tomateiro. **Comunicado Técnico**. Brasília, v. 96, p. 1-4, 2013.

SACCARDO, P. A. Sylloge hyphomycetum. **Sylloge fungorum**, v. 4, 1886, 807 p.

SACCARDO, P. A. Sylloge fungorum. **Supplementum Universale, Pars II**, v. 10, 1892, 580 p.

SILVA, G. S.; COSTA, D. L. M. M. Ocorrência da podridão negra da cenoura no Estado do Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, p. 294, 2013.

SIMON, P. W.; FREEMAN, R. E.; VIEIRA, J. V. BOITEUX, L. S.; BRIARD, M.; NOTHNAGEL, T.; MICHALIK, B.; KWON, Y. S. Carrot In: PROHENS, J.; NUEZ, F. **Vegetables II**, New York, 2008, p. 327-357.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. 19ª ed. Viçosa, 2004, 564 p.

TEIXEIRA-YAÑEZ, L. D. D. **Resistência genética, fungicidas e solarização para o controle de *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris na cultura de alface (*Lactuca sativa* L.)**. 2005, 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

VAN WYK, M.; WINGFIELD, B. D.; CLEGG, P. A.; WINGFIELD, M. J. *Ceratocystis larium* sp. nov., a new species from *Styrax benzoin* wounds associated with incense harvesting in Indonesia. **Persoonia**, Leiden, v. 22, p. 75, 2009.

VILELA, N. J.; BORGES, I. O. Retrospectiva e situação atual da cenoura no Brasil. Brasília, **Embrapa Hortaliças**, 2088, 9 p.

ZOPF, W. Über *Thielavia basicola*, einen endophytischen Parasiten in den Wurzeln des *Senecio elegans*. **Verhandlungen des Botanischen Vereins für die Provinz Brandenburg**, v. 18, p. 101-5, 1876.

CAPÍTULO II

Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil

Etiologia da podridão negra da cenoura no Brasil

Suzilaine Y. S. Cavalcante¹, Josiene S. Veloso¹, Alexandre R. Machado², Marcos P. S. Câmara¹ e André A. M. Gomes^{1*}

¹Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: andreangelomg@gmail.com

²Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: alexanderm.agro@yahoo.com.br

* Autor correspondente: André A. M. Gomes - e-mail: andreangelomg@gmail.com

Número do telefone: +55 38 99245-2288

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

15 **RESUMO**

16 *Thielaviopsis basicola* (= *Berkeleyomyces basicola*), fitopatógeno responsável por
17 causar grandes perdas em diversas culturas agrícolas de importância econômica, é um dos
18 principais fungos que acomete a cultura da cenoura (*Daucus carota* L.). Sua taxonomia possui
19 várias controvérsias na literatura, sendo colocado em diversos gêneros desde seu primeiro
20 relato em 1850. Atualmente, os estudos moleculares baseados em sequências de DNA, tem
21 sido a principal ferramenta para identificação desse fitopatógeno. Objetivou-se investigar
22 qual(is) táxon (taxa) está associado à podridão negra da cenoura no Brasil, através de análises
23 moleculares, avaliar a temperatura ótima de crescimento e a patogenicidade. Os isolados
24 obtidos foram analisados por Inferência Bayesiana com base nas sequências de DNA das
25 regiões LSU, MCM7 e 60S. O resultado das análises individuais e concatenada (LSU, MCM7
26 e 60S) a partir de Inferência Bayesiana concordaram quanto ao agrupamento dos isolados
27 estudados no gênero *Berkeleyomyces*. O marcador molecular MCM7 e a análise concatenada
28 possibilitou a distinção das duas espécies de *Berkeleyomyces*, agrupando isolados utilizados
29 com a espécie referência de *B. basicola*. A temperatura ótima para o crescimento micelial
30 variou entre 19 a 23 °C, houve diferença significativa na agressividade. Conclui-se que *B.*
31 *basicola* é o agente causal da podridão negra da cenoura no Brasil.

32

33 **Palavras-chave:** Apiaceae; *Daucus carota*; Inferência Bayesiana; Multilocus; *Thielaviopsis*
34 *basicola*.

35

36 **ABSTRACT**

37 *Thielaviopsis basicola* (= *Berkeleyomyces basicola*), a phytopathogen responsible for causing
38 large losses in several agricultural crops of economic importance, is one of the main fungi that
39 affects the culture of carrots (*Daucus carota* L.). Its taxonomy has several controversies in the

40 literature, being placed in several genres since its first report in 1850. Currently, moleculy
41 studies based on DNA sequences has been the principal tool for identification of that
42 phytopathogen. The objective was to investigate which taxon are associated with black carrot
43 rot in Brazil, through molecular analysis, evaluate the optimal growth temperature and
44 pathogenicity. The isolates obtained were analyzed by Bayesian Inference based on the DNA
45 sequences of the regions LSU, MCM7 and 60S. The results of the individual and
46 concatenated analyses (LSU, MCM7 and 60S) from Bayesian Inference agreed on the
47 grouping of isolates studied in the genus *Berkeleyomyces*. The molecular marker MCM7 and
48 the concatenated analysis made it possible to distinguish the two species of *Berkeleyomyces*,
49 grouping isolates used with the reference species of *B. basicola*. The optimum temperature for
50 mycelial growth ranged from 19 to 23 °C, there was a significant difference in aggressiveness.
51 It is concluded that *B. basicola* is the causal agent of black carrot rot in Brazil.

52

53 **Keywords:** Apiaceae; Bayesian inference; *Daucus carota*; Multiloccus; *Thielaviopsis*
54 *basicola*.

55 INTRODUÇÃO

56 A cenoura (*Daucus carota* L.) é um vegetal da família Apiaceae, e está entre as dez
57 principais hortaliças de importância econômica em todo o mundo, em termos de produção por
58 área e valor agregado a cultura. No Brasil, destaca-se por ser cultivada o ano inteiro em todas
59 as regiões do país (Boiteux et al., 2017). Estando elencada entre as cinco principais hortaliças
60 produzidas, com uma área de mais de 20.000 ha com produção de mais de meio milhão de
61 toneladas por ano (Dumbra, 2015). É amplamente utilizada *in natura* e minimamente
62 processada para a alimentação humana, sendo fonte de grande quantidade de fibras e
63 betacaroteno (Fontes; Vilela, 2003; Simon et al., 2008).

64 Esta cultura é afetada por diversas doenças, as quais acarretam perdas quantitativas e
65 qualitativas. Entre as principais doenças da cenoura, destaca-se a podridão negra das raízes. A
66 doença é caracterizada pelo surgimento de manchas necróticas de coloração acinzentada à
67 negra, de formato irregular com padrões diversos, podendo aumentar de tamanho até cobrir
68 boa parte da superfície da raiz. Os sintomas podem ser observados no campo, mas se
69 desenvolvem principalmente nas etapas de pós-colheita (Paulin-Mahady; Harrington;
70 MCNew, 2002; Lopes; Reis, 2016).

71 No Brasil, essa doença foi reportada pela primeira vez no Rio Grande do Sul
72 (Dalbosco et al., 2004), em seguida, no Distrito Federal (Inácio et al., 2012) e Maranhão
73 (Silva; Costa, 2013). Porém, sua ocorrência tem expandido significativamente nos últimos
74 anos em alguns pólos produtores de cenoura nas regiões do Alto Paranaíba, em Minas Gerais,
75 e Cristalina, em Goiás (Lourenço Junior; Reis; Lopes, 2019).

76 O agente causal da podridão negra da cenoura é considerado um fitopatógeno
77 habitante do solo, que possui uma ampla gama de plantas hospedeiras de importância
78 econômica. A fase sexual desse fungo é desconhecida. O mesmo produz conídios
79 unicelulares, cilíndricos e hialinos. Estes são responsáveis por facilitar a disseminação, devido

80 a rapidez de sua germinação no tecido vegetal. Possuem esporos de resistência denominados
81 clamidósporos, que podem sobreviver em condições adversas, permanecendo viáveis, quando
82 estimulados a germinação, através da exsudação das raízes (Abbas et al., 2007; de Beer et al.,
83 2014). A taxonomia do agente causal da podridão negra da cenoura é confusa, uma vez que, o
84 principal táxon associado a esta doença vem sofrendo diversas reclassificações ao longo do
85 tempo. No passado, baseado em comparações morfológicas o agente causal da podridão negra
86 da cenoura foi denominado *Chalara elegans* e *Thielaviopsis basicola* (Dalbosco et al., 2013;
87 Silva et al., 2013). Acredita-se que esta confusão ocorre principalmente, devido ao uso de
88 marcadores morfológicos indiscrimináveis, compartilhados com outros taxa pertencentes à
89 família Ceratocystidaceae.

90 Adicionalmente, Paulin & Harrington (2000) utilizando análises de sequências de DNA,
91 como marcador filogenético, mostraram que *T. basicola* agrupava com várias espécies
92 anamórficas de *Ceratocystis*. Posteriormente, estudos realizados pelos mesmos autores
93 sugeriram que *Thielaviopsis* fosse considerado o gênero ideal para acomodar espécies de
94 *Chalara*, assim como a adoção do nome *T. basicola* para o agente etiológico da podridão
95 negra de raízes (Paulin-Mahady et al., 2002). Mbenoun et al. (2014) descreveram as espécies
96 *Thielaviopsis*, entretanto, agrupando-as ao complexo *Ceratocystis paradoxa*. Em 2014,
97 análises filogenéticas de gêneros da família Ceratocystidaceae, utilizando sequências de DNA
98 de diversos genes, evidenciaram que *T. basicola* pertence a uma nova linhagem filogenética
99 da família, não agrupando com nenhum gênero conhecido em Ceratocystidaceae (de Beer et
100 al., 2014). Análises multigênicas evidenciaram que isolados de “*T. basicola*” são
101 representados por duas linhagens filogenéticas distintas, reclassificado como um novo gênero,
102 denominado de *Berkeleyomyces*, uma nova combinação para o epíteto “*basicola*”
103 (*Berkeleyomyces basicola*) e a descrição de uma nova espécie denominada de *Berkeleyomyces*
104 *rouxiae* (Nel et al., 2018). Entretanto, nenhum estudo foi realizado no Brasil, para verificar a

105 identidade do agente etiológico.

106 Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar qual(is) táxon (taxa) estão associados
107 à podridão negra da cenoura no Brasil, através de análises moleculares, e avaliar a
108 temperatura ótima de crescimento do patógeno.

109

110 **MATERIAL E MÉTODOS**

111 **Isolamento e preservação**

112 Foram efetuadas visitas quinzenalmente no Centro de Abastecimento e Logística de
113 Pernambuco (CEASA-PE) e supermercados locais em Recife - PE. Raízes de cenoura que
114 apresentavam sintomas característicos de podridão negra foram coletadas e encaminhadas ao
115 Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LPPC-
116 UFRPE).

117 Para isolamento dos fungos associados, as cenouras foram mantidas em câmara úmida
118 por 24 horas. Após esse período, realizou-se isolamento direto, seguindo as instruções
119 descritas por Alfenas & Mafia (2007). Utilizou-se microscópio estereoscópio para observação
120 das estruturas reprodutivas do fungo e com o auxílio de alça devidamente flambada, estruturas
121 vegetativas e reprodutivas foram retiradas, depositadas no centro de placas de Petri contendo
122 meio de cultura Batata Dextrose-Ágar (BDA) e mantidas à temperatura de aproximadamente
123 25 °C. Posteriormente, foram realizadas preparações microscópicas para observação em
124 microscópio óptico. Em seguida, para a obtenção de cultura pura, os isolados foram repicados
125 para placas contendo meio de cultura Ágar-Água (AA), fragmentos de pontas de hifa foram
126 retirados das colônias e depositados em placas contendo BDA. Após sete dias, discos das
127 colônias foram preservados em método Castellani (Figueiredo, 1967) e acondicionados em
128 geladeira a 4 °C.

129

130 **Identificação morfológica dos isolados**

131 O esclarecimento prévio da identidade dos isolados, ocorreu através da observação
132 de características morfológicas de estruturas somáticas e reprodutivas dos fungos, sob
133 microscópio estereoscópico e óptico. Posteriormente realizou-se análises filogenéticas
134 utilizando sequências de DNA para a identificação das espécies.

135

136 **Extração de DNA, amplificação e sequenciamento de DNA**

137 Procedeu-se com a identificação molecular por meio de análises das sequências de
138 DNA das regiões gênicas da subunidade grande ribossômica (LSU), do componente 7 do
139 complexo de manutenção de minicromossomos (MCM7) e da proteína ribossômica 60S
140 RPL10 (60S).

141 Os isolados foram cultivados em meio líquido Batata-Dextrose (BD), com agitação
142 por sete dias e incubados a 25 °C. A biomassa colhida foi filtrada em gaze esterilizada e
143 macerada com pistilo dentro de cadinho congelado. O micélio triturado foi transferido para
144 tubo Eppendorf de 1,5 mL. A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo de tampão
145 CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Doyle & Doyle (1990). O DNA extraído
146 foi analisado em gel de agarose 1,5% em tampão 1× Tris-ácido acético EDTA (TAE), corado
147 com Sybr gold (Thermo Fisher Scientific), e fotografados sob luz ultravioleta.

148 A região LSU foi amplificada e sequenciada utilizando os primers LR0R
149 (ACCCGCTGAACTTAAGC) e LR5 (ATCCTGAGGGAACTTC) (Vilgalys & Hester,
150 1990). Para a região MCM7 utilizou-se os primers MCM7-for (Cer-MCM7F
151 ACICGIGTITCIGAYGTNAAGCC) e MCM7-rev (Cer-MCM7R
152 TTRGCAACACCAGGRTCACCCAT) (de Beer et al., 2014). E a região 60S foi amplificada
153 usando os primers 60S-506F (GHGACAAGCGTTTCTCNGG) e 60S-908R
154 (CTTVAVYTGGAACTTGATGGT) (Stielow et al., 2014).

155 Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 µL contendo:
156 2,25 µl de água, 1 µl da amostra de DNA, 1 µl de cada primers (LSU 60S e MCM7), 1 µl de
157 sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 6,25 µl de PCR GoTaq® Master Mix (Promega Wisconsin,
158 EUA).

159 As reações de PCR foram realizadas utilizando termociclador (AUT. CAP. 96X0,2ML
160 2720 da Applied Biosystems®). Os ciclos de amplificação foram realizados por desnaturação
161 inicial de 94 °C por 5 min., seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg., a
162 temperatura de anelamento foi de 53-58 °C por 45 seg., extensão a 72 °C por 2 min. e uma
163 extensão final a 72 °C por 7 min. As condições de amplificação foram as mesmas para todas
164 as regiões, exceto para as temperaturas de anelamento (53 °C para LSU, 58 °C para MCM7 e
165 54 °C para 60S).

166 Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose
167 1,5% em tampão 1× Tris-ácido acético EDTA (TAE), corado com Sybr gold (Thermo Fisher
168 Scientific), e fotografados sob luz ultravioleta. Posteriormente, esses produtos foram
169 purificados por meio de precipitação de DNA, utilizando acetato de amônio e etanol. Em
170 seguida, foram sequenciados na plataforma de sequenciamento do Centro de Biociências da
171 Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

172 As sequências consensus foram obtidas usando o Staden Package v. 1.6-r (Bonfield &
173 Staden, 1996) e comparadas com os dados do National Center for Biotechnology Information
174 Bethesda, EUA (NCBI), utilizando algoritmo *BLASTn* (Johnson et al., 2008).

175

176 **Análises filogenéticas**

177 Foram realizadas análises filogenéticas individuais para cada região gênica (LSU,
178 MCM7 e 60S) e análise concatenada contendo as três regiões. Para as análises utilizou-se as
179 sequências obtidas neste trabalho em conjunto com sequências de 27 espécies representando

180 oito gêneros da família Ceratocystidaceae obtidas no banco de dados (GenBank) do National
181 Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela 1).

182 Os alinhamentos das sequências nucleotídicas individuais foram feitos utilizando a
183 versão online do MAFFT v. 7 (Kato & Standley, 2013) e corrigidos manualmente no
184 MEGA7 (Kumar et al., 2016). Os alinhamentos de genes individuais foram concatenados
185 incluindo as regiões LSU, MCM7 e 60S utilizando o software SequenceMatrix v.1.8 (Vaidya
186 et al., 2011). Sequências de duas espécies do gênero *Graphium* foram utilizadas como
187 *outgroup*. Análises filogenéticas de Inferência Bayesiana foram realizadas no portal da
188 internet CIPRES (Miller et al., 2010) utilizando MrBayes v 3.2 (Ronquist et al., 2012),
189 baseado na cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com 100.000.000 de gerações, usando
190 os melhores modelos substituição de nucleotídeos para LSU, MCM7 e 60S (Lset nst=6
191 rates=invgamma, Lset nst=6 rates=invgamma e Lset nst=2 rates=invgamma),
192 respectivamente, selecionados de acordo com Akaike Information Criterion (AIC) no
193 software MrModeltest v.2.3 (Posada & Crandall, 1998). As árvores foram amostradas a cada
194 1000 gerações, descartando 25% de todas as árvores obtidas. Probabilidade posterior (Rannala
195 & Yang, 1996) foram determinadas a partir da árvore de maior consenso entre as árvores
196 remanescentes. As árvores geradas foram visualizadas no programa FigTree (Rambaut, 2009).

197

198 **Influência da temperatura no crescimento micelial**

199 Foram selecionados seis isolados (LPPC11, LPPC17, LPPC21, LPPC22, LPPC24 e
200 LPPC26) para a realização desse experimento. Discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro
201 foram retirados da borda da colônia de cada isolado fúngico com 10 dias de crescimento e
202 transferidos para o centro de placas de Petri contendo meios de cultura BDA e MA (Extrato
203 de Malte – Ágar). Cinco placas de cada isolado foram dispostas em incubadoras tipo
204 Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.), com temperaturas controladas a 15, 20, 25, 30 e 35

205 °C no escuro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco
206 repetições, totalizando 25 placas por isolado.

207 A avaliação foi feita pela medição do diâmetro das colônias, em duas direções
208 perpendiculares anotando os valores das médias em mm, a cada 48 h, durante 10 dias, a contar
209 do momento em que o disco de micélio foi disposto na placa contendo os meios de cultura.

210 Os níveis ótimos das variáveis que propiciaram os maiores crescimentos miceliais e os
211 crescimentos miceliais máximos foram estimados usando os modelos de regressão e os
212 sumários numéricos com o auxílio do programa TableCurve™ 2D 5.01 (Systat Software Inc.,
213 Chicago, EUA). O ajuste do modelo de regressão utilizado foi baseado nas repetições das
214 variáveis analisadas. O modelo foi estabelecido de acordo com o maior valor do coeficiente
215 de determinação (R^2), distribuição dos resíduos e quadrado médio dos erros.

216 **Teste de patogenicidade**

217 Cenouras cultivar Brasília foram selecionadas pela uniformidade do tamanho e
218 ausência de injúrias. Inicialmente, as raízes foram lavadas com detergente e água corrente,
219 enxaguadas duas vezes em água destilada e colocadas para secar em uma bancada do
220 laboratório sob papel toalha.

221 As cenouras foram feridas com furador contendo agulhas de 3 mm de profundidade e a
222 inoculação consistiu na deposição de disco de micélio de 5 mm de diâmetro com dez dias de
223 crescimento, cultivado em meio BDA. Para o controle, foram utilizados discos de BDA não
224 colonizados pelo fungo. As mesmas foram colocadas em câmara úmida por 48 h e mantidos
225 em condições de laboratório (25 ± 2 °C/ 80% UR).

226 Seis isolados (LPPC11, LPPC17, LPPC21, LPPC22, LPPC24 e LPPC26) foram
227 selecionados aleatoriamente para avaliação da agressividade, com diâmetros das lesões
228 mensurados em direções perpendiculares em cada cenoura após 48 h da inoculação. Os dados
229 foram submetidos à análise de médias comparadas por teste de diferença mínima significativa

230 de Fisher's (LSD) em nível de 5% de significância usando Statistix 9.0 (Analytical Software,
231 Tallahassee, EUA).

232

233 **RESULTADOS**

234 **Isolamento e identificação**

235 Foram obtidos 18 isolados (Tabela 2) associados aos sintomas de podridão negra da
236 cenoura. Através de observações microscópicas, foi possível constatar que os isolados obtidos
237 neste estudo compartilham características morfológicas semelhantes a *Thielaviopsis* e
238 gêneros relacionados, apresentando colônias de coloração marrom, com variação na taxa de
239 crescimento (~ 33 a 42 mm de diâmetro) (Nel et al., 2018). Por meio das preparações
240 microscópicas foi observado a presença de conídios hialinos, cilíndricos, unicelulares,
241 produzidos isoladamente ou em cadeias. Clamidósporos, com várias cadeias de esporos
242 unicelulares de coloração marrom escuro presentes nas hifas de forma terminal ou
243 lateralmente.

244 A amplificação dos segmentos gênicos por PCR gerou produtos para as regiões LSU,
245 MCM7 e 60S de aproximadamente 870, 640 e 650 pb, respectivamente. Para cada conjunto de
246 dados (sequências das regiões LSU, MCM7 e 60S) foi gerado um alinhamento, assim como
247 para as três regiões em uma única matriz de dados (concatenado). Árvores filogenéticas
248 individuais derivadas de Inferência Bayesiana para cada um dos conjuntos de dados
249 das regiões gênicas LSU, MCM7 e 60S resultaram em topologias diferentes (Figura 1, 2, 3).
250 Entretanto, apesar da topologia diferente, os isolados obtidos neste estudo agruparam
251 filogeneticamente próximos a *Berkeleyomyces* nas três análises. O resultado das análises
252 utilizando a matriz de dados concatenada suportou as relações existentes entre indivíduos da
253 família Ceratocystidaceae. A árvore (Fig. 04) mostra as relações filogenéticas entre os
254 gêneros dessa família.

255 Apenas na árvore gerada a partir das análises do gene MCM7 e na árvore concatenada
256 foi possível distinguir consistentemente as duas espécies de *Berkeleyomyces*. Sendo que, os
257 isolados obtidos neste estudo agruparam com *B. basicola*. Em contrapartida, as regiões LSU e
258 60S não apresentaram suporte suficiente para separar as duas espécies. A árvore LSU
259 apresentou todas as espécies pertencentes ao mesmo clado (99% de probabilidade posterior),
260 adicionalmente, as árvores de 60S apesar de separar as espécies em clados distintos, não
261 apresentou suporte suficiente (probabilidade posterior de 0,66) para a distinção das espécies.

262

263 **Influência da temperatura no crescimento de *B. basicola***

264 Houve diferença significativa na taxa de crescimento micelial para os seis isolados
265 testados. Em função das temperaturas, houve acréscimo no desenvolvimento da maioria dos
266 isolados entre as temperaturas de ~20 a 24 e ~22 a 24 °C, bem como, a temperatura ótima para
267 cada isolado variou entre 19,82 e 23,39 (média de 22,35 °C) e 22 e 23,54 °C (média de 22,9
268 °), para BDA e MA, respectivamente (Tabela 3).

269 Os isolados LPPC11 e LPPC22, sob temperatura de 25 °C, obtiveram as maiores
270 médias de crescimento micelial nos dois meios de cultura utilizados, sendo BDA (42,2 e 43,9
271 mm) e MA (35,4 e 37,5 mm) (Tabela 3), respectivamente. O crescimento micelial dos
272 isolados LPPC21 e LPPC11, diminuíram acentuadamente a partir de 30 °C, sendo que, para
273 35 °C em meio de cultura BDA não houve crescimento evidente, o mesmo aconteceu em meio
274 MA para o isolado LPPC21 (Tabela 2).

275 A regressão utilizada possui o modelo polinomial de terceiro grau ($y=a+bx+cx^2+dx^3$),
276 nesta, os dados de crescimento micelial foram ajustados de forma excelente em função da
277 temperatura para todos os isolados e os valores de R^2 variaram entre 0.976 e 0.999. Na
278 equação, y representa o crescimento micelial em determinada temperatura (x), enquanto a , b ,
279 c e d são parâmetros da regressão. Com o cálculo das derivadas desses parâmetros é possível

280 estimar o pico máximo de x em função de y, sendo interpretado como a temperatura ótima
281 para o crescimento micelial. Desta forma, o pico máximo de y em função de x, sendo
282 interpretado como o crescimento micelial máximo (Figura 5, 6).

283

284 **Teste de patogenicidade**

285 Os 18 isolados identificados como *B. basicola* foram patogênicos quando inoculados
286 em raízes de cenouras. Destes, seis isolados (LPPC11, LPPC17, LPPC21, LPPC22, LPPC24 e
287 LPPC26) foram selecionados aleatoriamente para avaliar a agressividade. Nesse estudo, o
288 modelo de regressão polinomial foi escolhido para seguir com as análises.

289 Houve diferença significativa entre os isolados quanto à agressividade, estando
290 representada pelo tamanho do diâmetro das lesões. As maiores lesões foram induzidas pelos
291 isolados LPPC22 e LPPC26, que demonstraram maior agressividade (1,18 e 1,23 cm) aos sete
292 dias após a inoculação, respectivamente, quando comparados com os demais isolados
293 utilizados. Em contrapartida, o isolado LPPC21, causou as menores lesões (0,5 cm),
294 evidenciando menor agressividade. Os demais isolados (LPPC11, LPPC17 e LPPC24),
295 causaram lesões de comprimentos médios, e com isso, não diferiram entre si quanto a
296 agressividade (Figura 7).

297

298 **DISCUSSÃO**

299 As semelhanças morfológicas entre membros da família Ceratocystidaceae gerou, ao
300 longo do tempo, inúmeras reclassificações, mudanças taxonômicas e confusões quanto a
301 etiologia da podridão negra da cenoura. Por muito tempo os gêneros *Thielaviopsis* e *Chalara*
302 foram associados como o agente causal desta doença. Embora *Thielaviopsis basicola* (= *Berkeleyomyces basicola*) seja a principal espécie associada a podridão negra da cenoura,
303 outras espécies como *T. punctulata* (Hennebert) A. E. Paulin, T. C. Harr. & McNew (= *T.*

305 *radicicola* (Bliss) Z.W. (De Beer & W. C. Allen) (Van Wyk et al., 2009), *Chalara*
306 *thielavioides* (Peyronel) (= *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau), (Nag Raj; Kendrick,
307 1975) e *Chalaropsis thielavioides* Peyronel (Kastelein et al., 2007; Milosavljevic et al., 2015)
308 já foram relatadas causando o mesmo sintoma nesse hospedeiro.

309 Neste estudo, através de análises filogenéticas com 18 isolados, aponta-se que *B.*
310 *basicola* é o principal agente etiológico associado aos sintomas de podridão negra da cenoura
311 no Brasil. Atualmente, os estudos filogenéticos, representam uma importante ferramenta para
312 analisar a similaridade entre espécies e permitem a identificação bem-sucedida.
313 *Berkeleyomyces* é um recente gênero proposto por Nel et al., (2018), para acomodar
314 indivíduos que apresentavam características distintas das outras espécies da família
315 Ceratocystidaceae,

316 Por muito tempo a identificação de espécies dentro de Ceratocystidaceae foi bastante
317 confusa, principalmente devido à falta de marcadores consistentes. A busca por marcadores
318 moleculares consistentes vem sendo um desafio para esclarecer as relações entre indivíduos
319 desta família. Em nossas análises, o uso de sequências de DNA concatenadas das regiões
320 LSU, MCM7 e 60S em Inferência Bayesiana suportou as relações existentes entre membros
321 de Ceratocystidaceae (Figura 4) propiciando a distinção filogenética entre os gêneros. Nossos
322 resultados corroboram com o proposto por de Beer et al., (2014) para esclarecer as relações
323 dentro desta família.

324 Embora filogenia usando dados concatenados das regiões LSU, MCM7 e 60S revelem
325 as relações em Ceratocystidaceae e suportem a distinção entre as espécies de *Berkeleyomyces*.
326 Para identificação de espécies em *Berkeleyomyces* o uso individual da região MCM7 como
327 marcador molecular já propicia a distinção entre *B. basicola* e *B. rouxiae* (Figura 2). Os
328 cladogramas suportados da árvore MCM7 também foram congruentes com a topologia da árvore

329 concatenada, baseado nos três genes estudados, a utilização de uma única região apresenta
330 grande vantagem por possibilitar uma análise menos laboriosa, mais rápida e econômica.

331 Raja et al., (2011) utilizaram esse marcador para analisar filogeneticamente
332 Ascomycota e mostraram que MCM7 apresentava maior informatividade e suporte em
333 comparação com o LSU, um dos principais genes utilizados para esse filo. Em análises das
334 regiões ITS, TEF1 e β -tubulina, MCM7 e TSR1, para a identificação de *Pestalotiopsis*,
335 MCM7 foi o mais relevante em termos filogenéticos e suporte estatístico, que resolve melhor
336 a topologia com o máximo de nós suportados (Judith-Hertz, 2016). Resultados semelhantes
337 foram observados em espécies de *Penicillium*, onde MCM7 mostrou-se mais informativo para
338 a identificação das espécies neste gênero (Peterson et al., 2011, Peterson et al., 2015, Gillot et
339 al., 2015).

340 A identificação correta com a adição de componentes epidemiológicos das doenças
341 como crescimento micelial e agressividade tendem a refletir muito do genoma, e, mais
342 importante, é que a investigação desses caracteres também permite o estudo da variação
343 genética dentro das populações (Brasier, 1999).

344 Neste estudo, a similaridade das temperaturas ótimas para os crescimentos miceliais
345 dos isolados (~ 20-24 °C) indica que a adaptação de um indivíduo pode ser influenciada por
346 sua origem genética, bem como, pelo ambiente em que foi encontrado (Antonovics &
347 Alexander, 1989; Zhan & McDonald, 2013). A variação dessas temperaturas pode estar
348 relacionada com a origem dos isolados (LPPC21 e 24), uma vez que, São Gotardo - MG
349 possui altitude acima de 1000 m, possuindo temperatura média de 20 °C. Enquanto, os
350 isolados (LPPC11, 17, 22 e 26) são oriundos de Irecê – Bahia, que possui temperaturas
351 médias superiores a 25 °C durante quase todo o ano. Adicionalmente, por ser uma doença pós
352 colheita, o ambiente encontrado no processo de beneficiamento das cenouras com
353 temperaturas amenas, a proliferação do fungo pode estar adaptada a esta condição.

354 A similaridade das temperaturas ótimas próximas a 23 °C para expressão da máxima
355 agressividade dos isolados em raízes de cenoura variando entre 0,5 e 1,23 cm, confirma a
356 observação de que os danos causados pela podridão negra aumentam consideravelmente
357 quando o ambiente de acondicionamento das raízes está semelhante ao ambiente de origem. A
358 agressividade é um fator que afeta o desenvolvimento de uma epidemia. Patógenos com alta
359 agressividade estão relacionados com eficiência em infectar o hospedeiro com menor período
360 de incubação, agressividade, rápida e alta produção de inóculo que acarreta em maior período
361 infeccioso potencializando o desenvolvimento da epidemia (Agrios, 2005; Milgroom, 2015).

362 De acordo com os nossos estudos *B. basicola* é o principal agente causal da podridão
363 negra da cenoura no Brasil. Apesar da falta de marcadores morfológicos que permitam a
364 distinção entre espécies de *Berkeleyomyces*, o uso concatenado das regiões (LSU, MCM7 e
365 60S) e individual da região MCM7 como marcador molecular, permite a identificação das
366 espécies. A temperatura ótima de crescimento para *B. basicola* em BDA é 22,35 e MA 22,90.

367 **AGRADECIMENTOS**

368 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio
369 financeiro, e à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo suporte científico e
370 tecnológico.

371 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

372 Abbas SQ, Niaz M, Ghaffar A (2007) *Thielaviopsis basicola*: a potential threat to agriculture
373 and forestry in Pakistan. Pakistan Journal of Botany 39:985-990.

374 Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Academic
375 Press.

376 Alfenas AC, Mafia RG (2007) Métodos em Fitopatologia, Ed. UFV, Viçosa.

377 Antonovics J, Alexander HM (1989) The concept of fitness in plant fungal pathogen systems.
378 In: Leonard KJ, Fry WE (eds.) Plant disease epidemiology 2:185-214.

379 Boiteux LS, Reis A, Fonseca MDN, Lourenço Junior V, Costa AF, Melo AG, Borges RCF
380 (2017). Powdery mildew caused by *Erysiphe heraclei*: a novel field disease of carrot (*Daucus*
381 *carota*) in Brazil. Plant Disease 101:1544.

382 Bonfield JK, Staden R (1996) Experiment files and their application during large-scale
383 sequencing projects. DNA Sequence 6:109-117.

384 Brasier CM (1999) Fitness, continuous variation and selection in fungal populations: na
385 ecological perspective. In: Worrall JJ (ed.) Structure and dynamics of fungal populations.
386 European Journal Plant Pathology 25:307-337.

387 Dalbosco M, El Tassa SOM, Duarte V (2004) Ocorrência de Podridão Negra, causada por
388 *Chalara elegans*, em raízes de cenoura no Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 29:336.

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

391 Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

392 Dumbra JGR (2015) Cenoura – Tempo seco favorece produção em boa parte do ano.
393 Hortifruti Brasil 13:33.

394 Figueiredo MB (1967) Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação
395 de fungos patógenos em plantas. O Biológico 33:9-13.

396 Fontes RR, Vilela NJ (2001). The current status of brazilian vegetable crops and future
397 opportunities. In IX International Symposium on Timing of Field Production in Vegetable
398 Crops, Piracicaba, SP. p. 135-141.

399 Gillot G, Jany JL, Coton M, Le Floch G, Debaets S et al. (2015) Insights into *Penicillium*
400 *roqueforti* morphological and genetic diversity. PLoS One 10:21.

401 Inácio CA, Lemes GP, Café-Filho AC, Lopes CA (2012) First report of *Thielaviopsis*
402 *basicola* causing black rot on carrot in Central Brazil. Tropical Plant Pathology 37:752.

403 Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL (2008) NCBI
404 BLAST: a better web interface. Nucleic acids research, 36:W5-W9.

405 Judith-Hertz C (2016) Systematics and species delimitation in *Pestalotia* and *Pestalotiopsis*
406 s.l. (Amphisphaeriales, Ascomycota). PhD Thesis, Goethe-Universität Frankfurt am Main,
407 Frankfurt, Germany.

408 Kastelein P, Tilma ESC, Elderson J, Kohl J (2007) Occurrence of *Rhexocercosporidium*
409 *carotae* on cold stored carrot roots in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology
410 117:293-305.

411 Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7:
412 improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution 30:772-780.

413 Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis
414 version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution 33:1870-1874.

415 Lopes CA, Reis A (2016) Doenças da cenoura. Brasília, Embrapa Hortaliças, p. 67.

- 416 Lourenço Junior V, Lopes CA, Reis A (2019) Podridão negra da cenoura. Brasília, Embrapa
417 Hortaliças, 8 p.
- 418 Mbenoun M, de Beer ZW, Wingfield MJ, Wingfield BD, Roux J, (2014) Reconsidering
419 species boundaries in the *Ceratocystis paradoxa* complex, including a new species from oil
420 palm and cacao in Cameroon. *Mycologia* 106:757-84.
- 421 Milgroom MG (2015) Population biology of plant pathogens: genetics, ecology and
422 evolution. APS Press.
- 423 Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for
424 inference of large phylogenetic trees. In: Gateway Computing Environments Workshop
425 (GCE). New Orleans, Louisiana. 1-8 p.
- 426 Milosavljević A, Trkulja N, Popović T, Ivanović Ž, Mitrović M, Jović J, Toševski I (2015)
427 First report of *Thielaviopsis thielavioides*, a causal agent of postharvest blackening on *Daucus*
428 *carota* in Serbia. *Plant Disease* 99:1274.
- 429 Nag Raj TR, Kendrick WB (1975) A Monograph of *Chalara* and Allied Genera. Waterloo.
430 Wilfrid Laurier University Press.
- 431 Nel WJ, Duong TA, Wingfield BD, Wingfield MJ, De Beer ZW (2018) A new genus and
432 species for the globally important, multihost root pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Plant*
433 *pathology*, 67:871-882.
- 434 Paulin AE, Harrington TC, (2000) Phylogenetic placement of anamorphic species of *Chalara*
435 among *Ceratocystis* and other ascomycetes. *Studies in Mycology* 45:169-86.

436 Paulin-Mahady AE, Harrington TC, Mcnew D (2002) Phylogenetic and taxonomic evaluation
437 of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with
438 *Ceratocystis*. *Mycologia* 94:62-72.

439 Peterson SW, Orchard SS, Menon S (2011) *Penicillium menonorum*, a new species related to
440 *P. pimiteouiense*. *IMA Fungus* 2:121-125.

441 Peterson SW, Jurjevič Ž, Frisvad JC (2015) Expanding the species and chemical diversity of
442 *Penicillium* section *Cinnamopurpurea*. *PLoSOne* 10:e0121987.

443 Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution.
444 *Bioinformatics* 14:817-818.

445 Punja ZK, Sun LJ (2000) Morphological and molecular characterization of *Chalara elegans*
446 (*Thielaviopsis basicola*), cause of black root rot on diverse plant species. *Canadian Journal of*
447 *Botany* 77:1801–1812.

448 Raja H, Schoch CL, Hustad V, Shearer C, Miller A (2011) Testing the phylogenetic utility of
449 MCM7 in the Ascomycota. *MycoKeys* 1:63-94.

450 Rambaut A (2009) FigTree 1.2.2. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
451 Acesso em 05 de fevereiro de 2020.

452 Rannala B, Yang Z (1996) Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new
453 method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution* 43:304-311.

454 Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, ... Huelsenbeck
455 JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a
456 large model space. *Systematic biology* 61:539-542.

457 Silva GS, Costa DLMM (2013) Ocorrência da podridão negra da cenoura no Estado do
458 Maranhão. *Summa Phytopathologica* 39:294.

459 Simon PW, Freeman RE, Vieira JV, Boiteux LS, Briard M, Nothnagel T, Michalik B, Kwon
460 YS (2008) Carrot. In: Prohens J, Nuez F *Vegetables II*. New York, USA. Springer. pp. 327-
461 357.

462 Stielow JB, Levesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D, ..., Lomascolo A (2015)
463 One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential
464 secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of*
465 *Fungi* 35:242.

466 Vaidya G, Lohman DJ, Meier R (2011) SequenceMatrix: Concatenation Software for the Fast
467 Assembly of Multi-Gene Datasets with Character Set and Codon Information. *Cladistics*
468 27:171-180.

469 Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically
470 amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172:
471 4238-4246.

472 Zhan J, McDonald BA (2013) Experimental measures of pathogen competition and relative
473 fitness. *Annual Review of Phytopathology* 51:131-153.

474 **Tabela 1** Relação dos isolados e número de acesso do GenBank das sequências utilizadas como referência.

| Espécie | Código | Hospedeiro | Local | Autor | Código de acesso de GenBank | | |
|----------------------------------|----------|---|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| | | | | | LSU | MCM7 | 60S |
| <i>C. eucalyptica</i> | CMW11536 | <i>Eucalyptus</i> sp. | África do Sul | M. Van Wyk & J. Roux; 2002 | KM495428 | KM495339 | KM495516 |
| <i>C. fimbriata</i> | CMW15049 | <i>Ipomoea batatas</i> | E.U.A. | C. F. Andrus; 1937 | KM495432 | KM495343 | KM495520 |
| <i>C. piriliformis</i> | CMW6579 | <i>Eucalyptus nitens</i> | Austrália | M. J. Wingfield; 2000 | KM495453 | KM495365 | KM495542 |
| <i>C. diversiconidia</i> | CMW22445 | <i>Terminalia ivorensis</i> | Equador | M. J. Wingfield; 2004 | KM495423 | KM495334 | KM495511 |
| <i>C. platoni</i> | CMW14802 | <i>Platanus occidentalis</i> | E.U.A. | T. C. Harrington; 1998 | KM495454 | KM495366 | KM495543 |
| <i>Ch. thielavioides</i> | CMW22736 | <i>Lupinus albus</i> | Itália | R. Ciferri; 1937 | KM495489 | KM495402 | KM495579 |
| <i>Ch. ovoidea</i> | CMW22733 | <i>Quercus petraea</i> | Alemanha | H. Kleinhempel; 1987 | KM495487 | KM495400 | KM495577 |
| <i>Endoconidiophora douglasi</i> | CMW26367 | <i>Pseudotsuga taxifolia</i> | E.U.A | R. W. Davidson; 1951 | KM495424 | KM495335 | KM495512 |
| <i>E. coerulescens</i> | CMW26365 | <i>Picea abies</i> | Alemanha | T. Rohde; 1937 | KM495418 | KM495329 | KM495506 |
| <i>Davidsoniella eucalypti</i> | CMW3254 | <i>Eucalyptus sieberi</i> | Austrália | M. J. Dudzinski; 1989 | KM495427 | KM495338 | KM495515 |
| <i>Ambrosiella xylebori</i> | CBS11061 | <i>Coffea canephora</i> | Costa do Marfim | L.Brader;1961 | KM495407 | KM495318 | KM495495 |
| <i>Huntia chineucensis</i> | CMW24658 | <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>E. urophylla</i> | China | M. J. Wingfield & S. F. Chen; 2006 | KM495416 | KM495327 | KM495504 |
| <i>H. oblonga</i> | CMW23803 | <i>Acacia mearnsii</i> | África do Sul | R. N. Heath; 2006 | KM495447 | KM495359 | KM495536 |
| <i>H. moniliformis</i> | CMW10134 | <i>Eucalyptus grandis</i> | África do Sul | M. van Wyk; 2002 | KM495443 | KM495355 | KM495532 |
| <i>G. laricis</i> | CMW5601 | Coleóptero | Áustria | T. Kirisits & P. Baier; 1995 | KM495476 | KM495389 | KM495566 |
| <i>G. pseudormiticu</i> | CMW503 | <i>Pinus</i> sp. | África do Sul | M. J. Wingfield;1984 | KM495477 | KM495390 | KM495567 |

Continuação Tabela 1

| | | | | | | | |
|----------------------|-----------|--|---------------|---------------------------------|------------|------------|------------|
| <i>B. rouxiae</i> | CMW5472 | Amendoim | Etiópia | N. Geldenhuis | MF967080.1 | MF948657 | MF967074.1 |
| <i>B. rouxiae</i> | CBS413.52 | <i>Lathyrus odoratus</i> | Holanda | G. A. Van Arkel | MF967106.1 | MF948662 | MF967077.1 |
| <i>B. rouxiae</i> | CMW14219 | Cenoura / <i>Eucalyptus regnans</i> | Chile | J. Roux & R. Ahumada | MF967086.1 | MF948660 | MF967076.1 |
| <i>B. basicola</i> | CMW6714 | Cenoura | Austrália | M. J. Wingfield | MF967079.1 | MF948658 | MF967072.1 |
| <i>B. basicola</i> | CMW49352 | <i>Betula</i> sp. | Holanda | Desconhecido | MF967102.1 | MF948659.1 | MF967075.1 |
| <i>B. basicola</i> | CMW25440 | <i>Styrax</i> sp. | Indonésia | M. J. Wingfield & M. van Wyk | MF967088.1 | MF948661.1 | MF967073.1 |
| <i>T. cerberus</i> | CMW36668 | <i>Elaeis guineensis</i> | Camarões | M. Mbenoun & J. Roux; 2010 | KM495415.1 | KM495326 | KM495503.1 |
| <i>T. ethacetica</i> | CMW37775 | <i>Ananas comosus</i> | Malásia | A. Johnson; 1952 | KM495426 | KM495337 | KM495514.1 |
| <i>T. paradoxa</i> | CMW36689 | <i>Theobromae cacao</i> | Camarões | M. Mbenoun & J. Roux; 2010 | KM495451.1 | KM495363 | KM495540.1 |
| <i>T. musarum</i> | CMW1546 | <i>Musa</i> sp. | Nova Zelândia | T. W. Canter- Visscher | KM495445.1 | KM495357 | KM495534.1 |
| <i>T. radícicola</i> | CMW1032 | <i>Phoenix dactylifer</i> | E.U.A | D. E. Bliss | KM495459 | KM495371 | KM495548 |

475 **Tabela 2** Lista de isolados de *B. basicola* obtidos no presente trabalho.

| Código | Fungo | Ano | Cidade | Estado | Código da coleção |
|---------------|--------------------------------|------------|---------------|---------------|--------------------------|
| TW5 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC10 |
| TW7 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC11 |
| TW8 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC12 |
| TW10 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC13 |
| TW12 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC14 |
| TW13 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC15 |
| TW15 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC16 |
| TW16 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC17 |
| TAM1 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC18 |
| TAM2 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC19 |
| TAM3 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC20 |
| TAM4 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC21 |
| TW11 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC22 |
| TW20 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC23 |
| TAM10 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC24 |
| TAM6 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC25 |
| TW14 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC26 |
| TW6 | <i>Berkeleyomyces basicola</i> | 2019 | Recife | PE | LPPC27 |

476

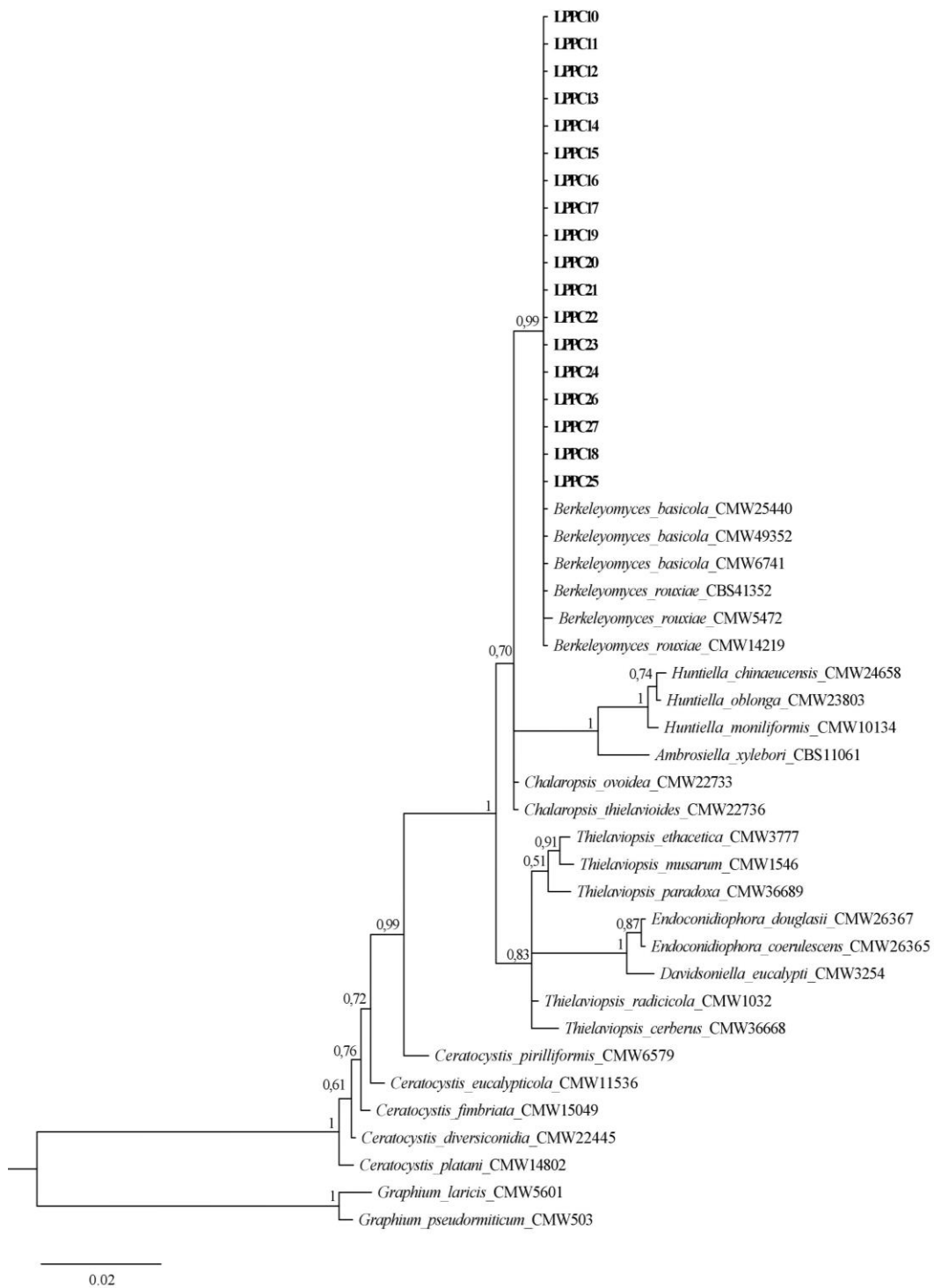
477 **Tabela 3** Efeito da temperatura no crescimento micelial (CM) de *B. basicola* associada com a
 478 podridão negra da cenoura sob dois meios de cultura.

| Isolado | C.M. | T. Ótima ² (° C) | C.M | T. Ótima ² (° C) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Máximo ¹ (mm) | | Máximo ¹ (mm) | |
| | BDA | | MA | |
| LPPC11 | 41,19ba | 22,74b ³ | 36,56c | 22,74c |
| LPPC17 | 41,04ba | 22,46c | 35,58d | 23,23ba |
| LPPC21 | 39,64dc | 19,82d | 33,63e | 21,99d |
| LPPC22 | 42,35a | 23,29a | 38,19 ^a | 22,99cb |
| LPPC24 | 38,07d | 22,40c | 36,12d | 23,54a |
| LPPC26 | 39,99cb | 23,39a | 37,44b | 22,92cb |
| MÉDIA | 40,38 | 22,34 | 36,25 | 23,07 |

479 ^{1,2} Valores estimados pelo ajuste do modelo de regressão polinomial de terceiro grau:
 480 $y=a+bx+cx^2+dx^3$, onde y = crescimento micelial (mm); a , b , c e d são parâmetros da
 481 regressão; x = temperatura.

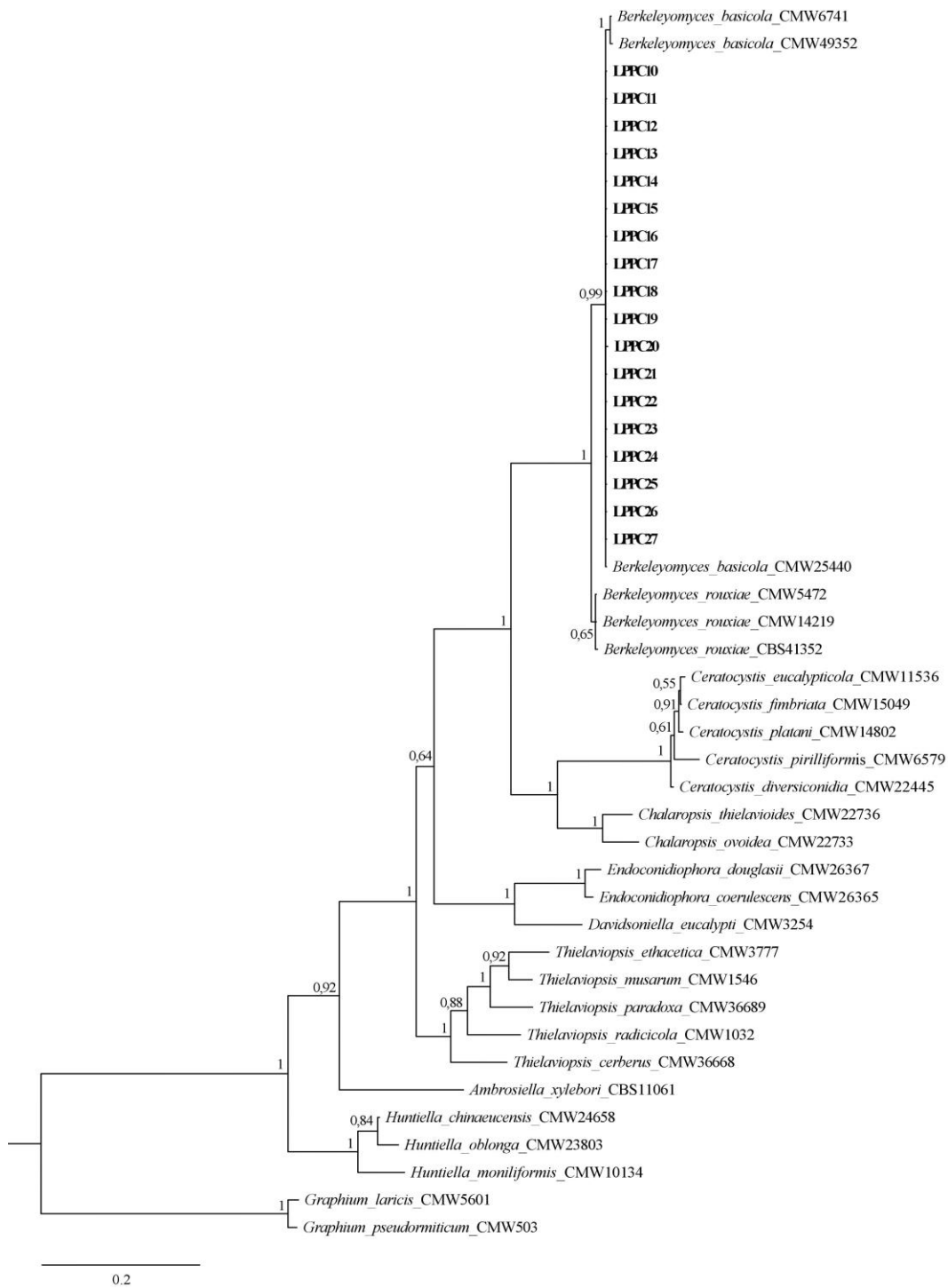
482 ³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo
 483 teste LSD de Fisher ($P=0,05$).

484



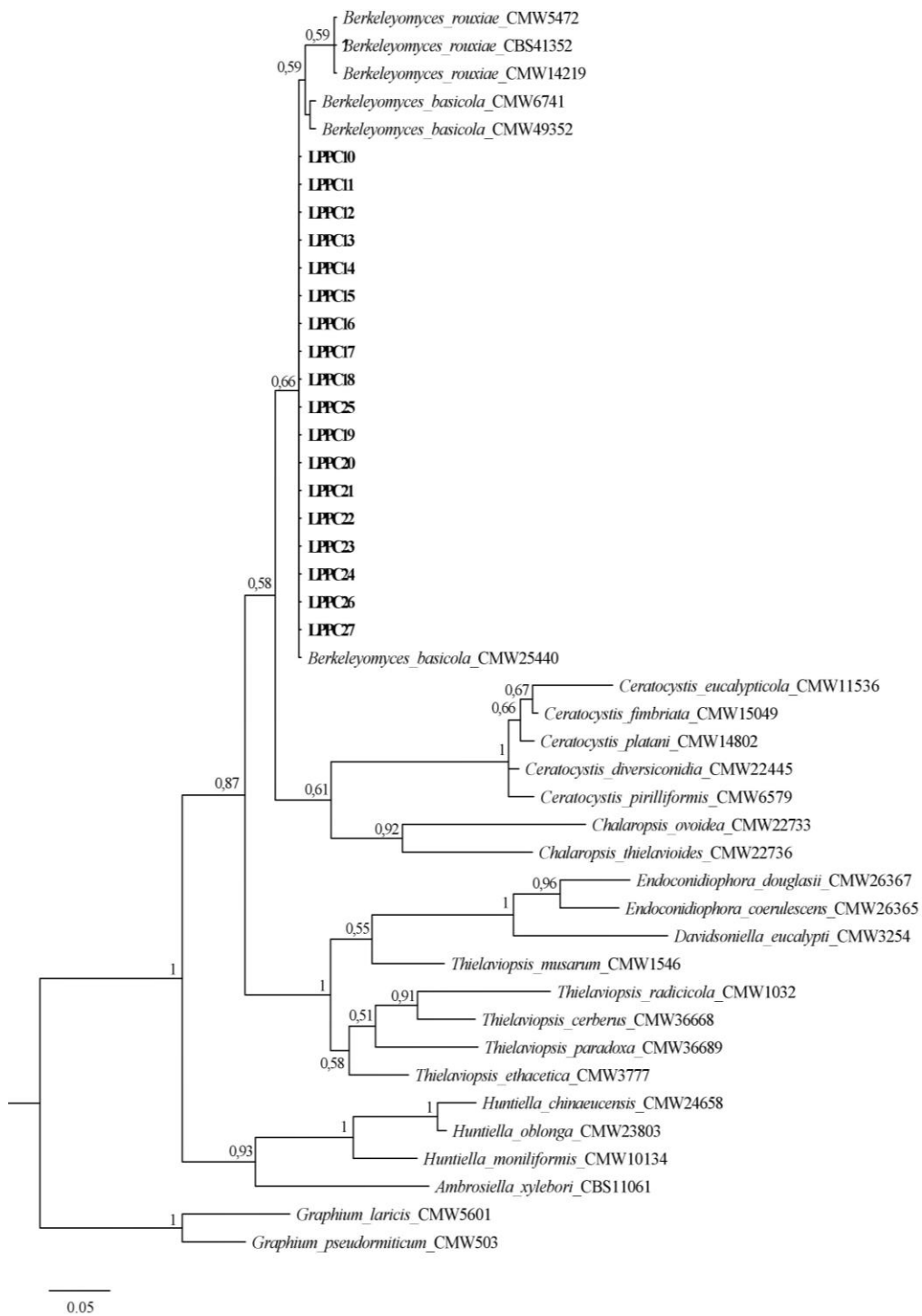
485

486 **Figura 1** Árvore filogenética derivada a partir de Inferência Bayesiana baseada nas
 487 sequências dos dados da região LSU para espécies selecionadas da família Ceratocystidaceae.
 488 Os isolados utilizados neste trabalho estão destacados em negrito. *Graphium laricis* e *G.*
 489 *pseudormiticum* foram utilizados como *outgroup*.



490

491 **Figura 2** Árvore filogenética derivada a partir de Inferência Bayesiana baseada nas
 492 sequências dos dados da região MCM7 para espécies selecionadas da família
 493 Ceratocystidaceae. Os isolados utilizados neste trabalho estão destacados em negrito.
 494 *Graphium laricis* e *G. pseudormiticum* foram utilizados como *outgroup*.



495

496 **Figura 3** Árvore filogenética derivada a partir de Inferência Bayesiana baseada nas

497 seqüências dos dados da região 60S para espécies selecionadas da família Ceratocystidaceae.

498 Os isolados utilizados neste trabalho estão destacados em negrito. *Graphium laricis* e *G.*

499 *pseudormiticum* foram utilizados como *outgroup*.

500



501

502 **Figura 4** Árvore derivada de análise de Inferência Bayesiana do conjunto de dados
 503 concatenados (LSU, MCM7 e 60S), para espécies selecionadas da família Ceratocystidaceae.
 504 Os isolados utilizados neste trabalho estão destacados em negrito. *Graphium laricis* e *G.*
 505 *pseudormiticum* foram utilizados como *outgroup*.

506

507

508

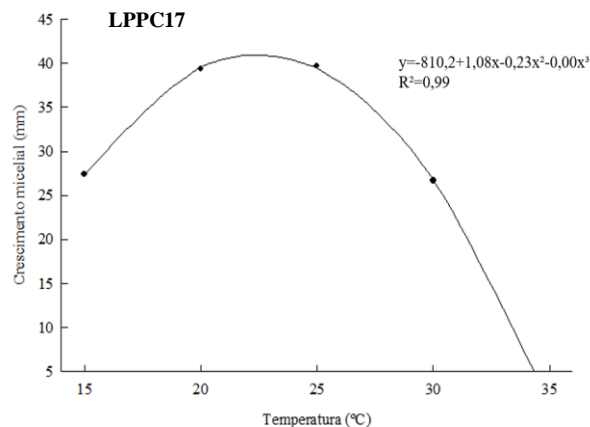
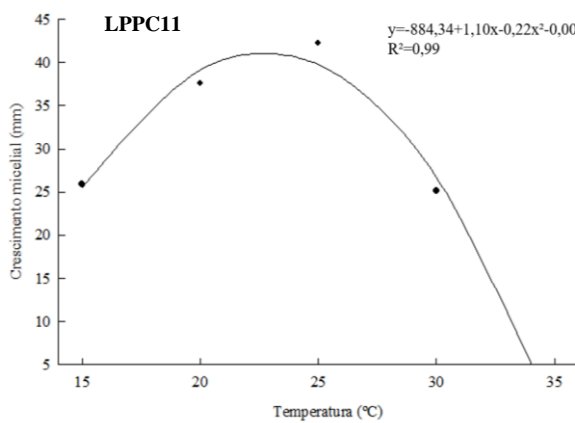
509

510

511

512

513



514

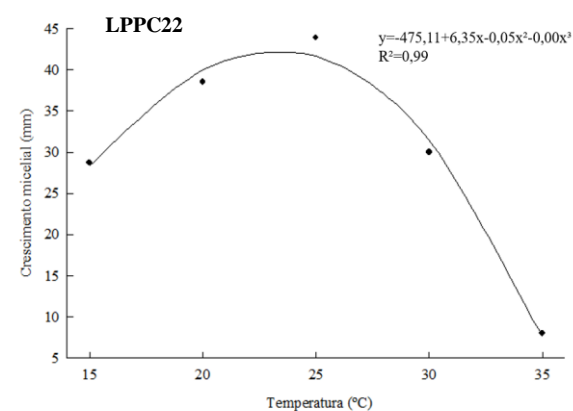
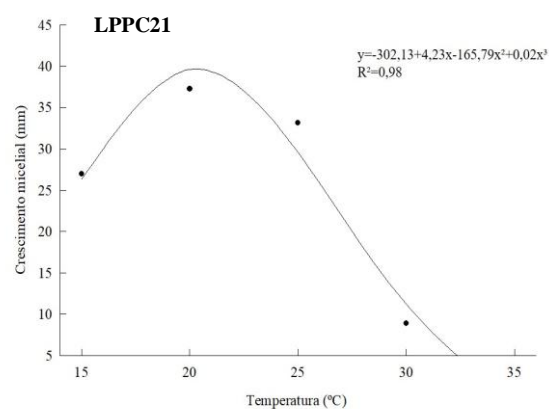
515

516

517

518

519



520

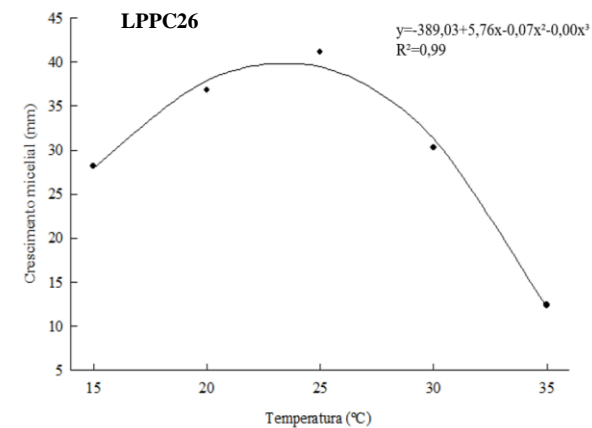
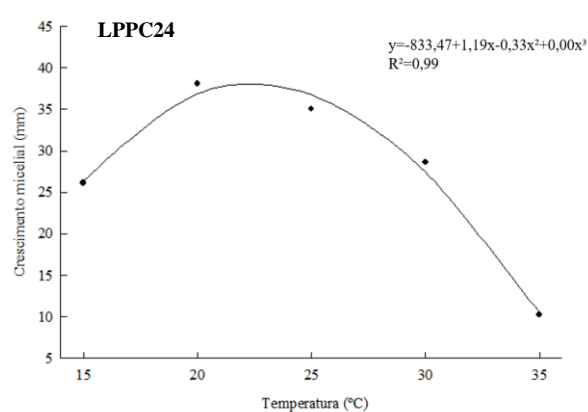
521

522

523

524

525

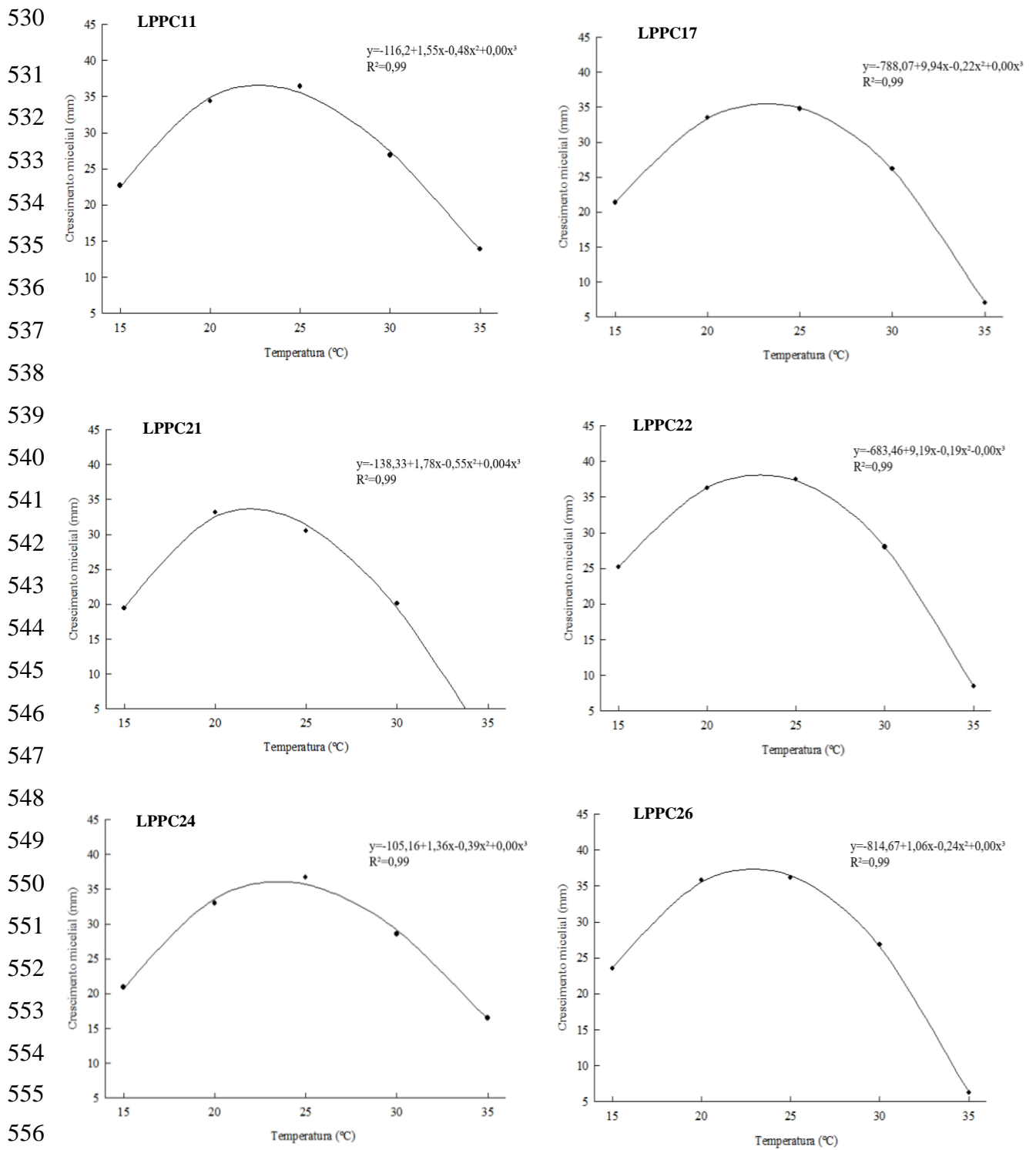


526

527 **Figura 5** Influência da temperatura no crescimento micelial de *B. basicola* em BDA

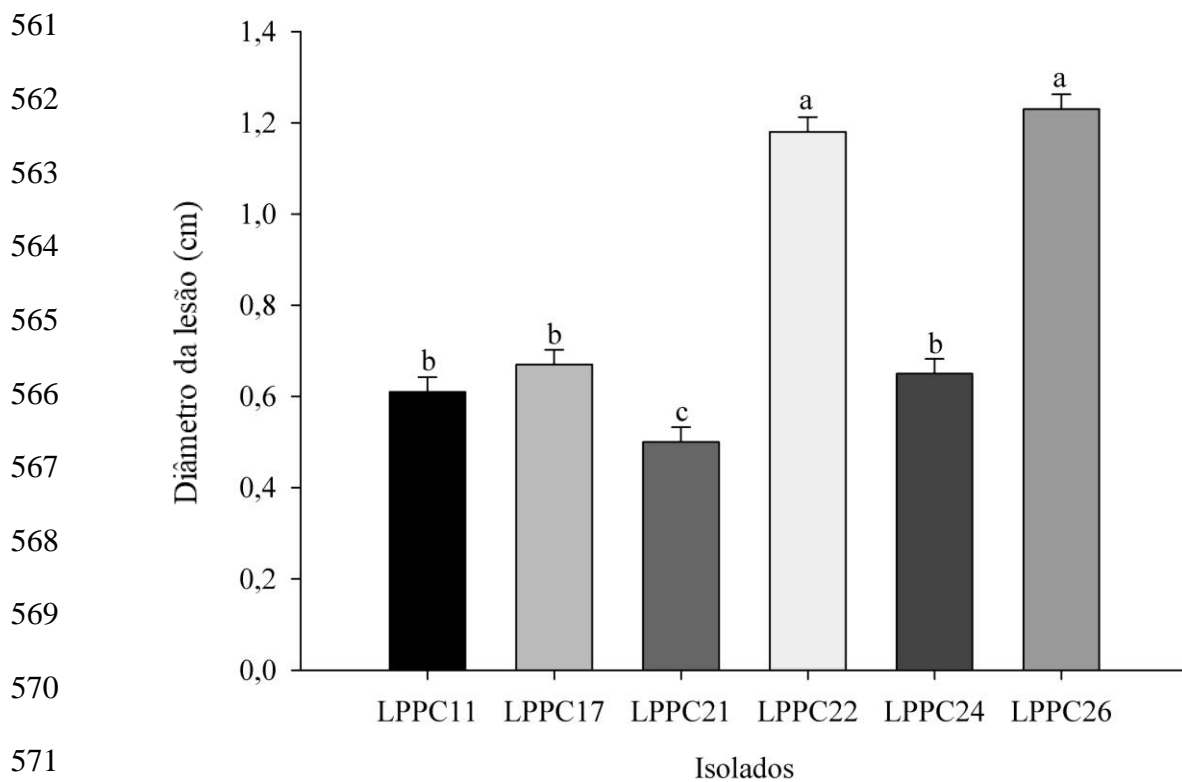
528 associadas com podridão negra em cenoura.

529



558 **Figura 6** Influência da temperatura no crescimento micelial de *B. basicola* em EMA
 559 associadas com podridão negra em cenoura.

560



572 **Figura 7** Médias dos diâmetros (cm) de lesões em cenoura (cv. Brasília) induzidas por *B.*
 573 *basicola* associadas com podridão negra das raízes no Brasil, aos sete dias após a inoculação.
 574 As barras representam o erro padrão da média e áreas de lesões significativamente diferentes
 575 ($P \leq 0,05$) apresentam uma letra diferente sobre a barra de erro.

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. O agente causal da podridão negra da cenoura no Brasil é *B. basicola*;
2. A combinação dos genes LSU, MCM7 e 60S foram eficientes para a identificação da espécie *B. basicola* associados a podridão negra da cenoura no Brasil;
3. O gene MCM7 possui suporte consistente para distinguir as espécies dentro do gênero;
4. Influência da temperatura foi uma variável eficiente para a taxa de crescimento micelial de *B. basicola*;
5. Os isolados de *B. basicola* apresentaram comportamento diferencial em relação aos níveis de agressividade em cenouras.