

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Thielaviopsis
paradoxa* EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Carolina de Cássia Pani Medeiros

Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Thielaviopsis
paradoxa* EM CANA-DE-AÇÚCAR**

Carolina de Cássia Pani Medeiros

Orientador: Prof. Dr. Dilermando Perecin

Coorientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2015

M488d Medeiros, Carolina de Cássia Pani
Diversidade genética de isolados de *Thielaviopsis paradoxa* em
cana-de-açúcar / Carolina de Cássia Pani Medeiros. -- Jaboticabal,
2015
vii, 49 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Dilermando Perecin
Banca examinadora: Andréia da Silva Meyer, Paula Macedo Nobile
Bibliografia

1. AFLP. 2. Saccharum. 3. Podridão abacaxi. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.61

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAROLINA DE CÁSSIA PANI MEDEIROS - nascida em 28 de julho de 1991 na cidade de Ribeirão Preto, SP. Realizou o curso de Engenharia Agrônômica na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, concluindo-o em 2013. Fez estágio no Instituto Agronômico de Campinas – IAC – Centro de Cana, em Ribeirão Preto - SP. Em agosto de 2013 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, nível de mestrado, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) sob a orientação do Prof. Dr. Dilermando Perecin e da Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza (coorientadora).

“Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a desilusão de um quase...Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Sarah Westphal

DEDICATÓRIA

À Deus, pela saúde e oportunidade que foram concebidas a mim para a concretização desse sonho.

À minha família, não apenas pelo apoio, mas, principalmente, pelo amor e confiança depositados em mim. Dedico especialmente aos meus queridos pais Rita e Adilson, irmã Camila e avó Ignêz.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) – Centro de cana em Ribeirão Preto - SP, pela oportunidade de estágio e auxílio para realização desse projeto.

Ao Prof. Dilermando Perecin, pela orientação, confiança e estímulo ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, pelo suporte e conhecimento transmitido para a concretização desse projeto.

À Dra. Luciana Rossini, pelo auxílio na execução de análise com marcadores moleculares e pelo conhecimento transmitido.

À colega de pós-graduação Débora Maria Sansoli Chanquini, pelo auxílio na obtenção de isolados e extração de DNA de *Thielaviopsis paradoxa*.

Aos funcionários do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) – Centro de cana em Ribeirão Preto - SP, pela colaboração nesse projeto.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse projeto

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar.....	6
2.2. Podridão abacaxi da cana-de-açúcar.....	8
2.3. Marcadores moleculares.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> e extração de DNA.....	13
3.2. Análise com marcadores moleculares AFLP.....	15
3.3. Análise dos dados.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS.....	41

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Thielaviopsis paradoxa* EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - Uma vez que a mecanização possibilita o plantio da cana-de-açúcar em épocas desfavoráveis e também estimula a ocorrência de ferimentos nos toletes, o aumento na utilização desse tipo de plantio favorece algumas podridões, como a podridão abacaxi, a qual pode ser considerada uma das mais importantes doenças da cultura da cana-de-açúcar. No entanto, há poucos estudos sobre a variabilidade genética do seu agente causal, *Thielaviopsis paradoxa*, fato que dificulta os programas de melhoramento genético da cultura para essa doença. Assim sendo, esse estudo teve como objetivo avaliar, por meio de marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado) a diversidade genética existente em 11 isolados de *T. paradoxa* provenientes de cinco diferentes regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil. Foram obtidas 298 bandas polimórficas, mas, excluindo isopolimorfismos restaram 174 bandas com correlações diferentes de (1) ou (-1) nos 11 isolados, evidenciando diversidade entre os isolados de *T. paradoxa* em estudo, a qual pode ser explicada, principalmente pela característica polífaga do patógeno e sua conseqüente baixa especificidade. Os valores médios de PIC (Conteúdo Informativo de Polimorfismo) de cada combinação de “primers” apresentaram uma média de 0,406, valor que pode ser considerado alto, ou seja, informativo, tratando-se de marcador dominante. O fenograma construído com as 174 bandas reuniu os 11 isolados em três diferentes grupos. O grupo I incluiu cinco isolados e três Estados (BA, GO e SP), o grupo II incluiu cinco isolados e três Estados (SP, PR e MG) e o grupo III incluiu apenas um isolado e um Estado (SP). Portanto, o presente estudo demonstrou haver alto polimorfismo entre os isolados de *T. paradoxa*, fato que sinaliza a existência de alta variabilidade genética dessa espécie de fitopatógeno.

Palavras-chave:

AFLP, fungo, Saccharum, Podridão abacaxi

GENETIC DIVERSITY AMONG *Thielaviopsis paradoxa* ISOLATES FROM SUGARCANE

ABSTRACT - Once mechanization allows sugarcane planting in almost all year and increases mechanical injuries, this type of planting provides the occurrence of many diseases, as pineapple disease, which is an economically important sugarcane disease that occurs in almost all sugarcane commercial planting areas. The genetic improvement of sugarcane to this disease is affected because of the lack of studies about genetic diversity of *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of pineapple disease. Thus, the genetic diversity study of 11 isolates of *T. paradoxa* from five different sugarcane commercial planting areas was accomplished using AFLP technique. A total of 298 polymorphic bands were obtained, but only 174 polymorphic bands had correlation different than (1) or (-1) in the 11 isolates of *T. paradoxa*. Based on our result was possible to infer genetic variation among *T. paradoxa* isolates. Once *T. paradoxa* is parasitic on a range of economic and food crops, this fact can explain the detected genetic variation among *T. paradoxa* isolates. The medium values of PIC (Polymorphism Information Content) of each primers combination revealed an average of 0,406, which can be considered high (informative), once the molecular marker is dominant. The phenogram, obtained by 174 polymorphic bands, separated the 11 isolates in three different groups. The group I contained five isolates and three Brazilian States (BA, GO e SP), the group II contained five isolates and three Brazilian States (SP, PR e MG) and the group III contained only one isolate and one Brazilian State (SP). Therefore, this study showed high polymorphism among *T. paradoxa* isolates, what reveal high genetic variability in this phytopathogenic specie.

Keywords:

AFLP, fungus, Saccharum, Pineapple disease

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Segundo o levantamento realizado pela Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a área cultivada com cana-de-açúcar na safra 2013/14 foi estimada em 8.799.150 hectares, a qual estava distribuída, principalmente, entre os Estados de São Paulo, permanecendo como o maior produtor (51,31% da área plantada), Minas Gerais (8,0%), Goiás (9,3%), Paraná (7,04%), Mato Grosso do Sul (7,09%), Alagoas (5,02%) e Pernambuco (3,25%) (CONAB, 2013). Já na safra 2015/2016, estima-se produzir aproximadamente 655,16 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em cerca de 8,95 milhões de hectares (CONAB, 2015).

As condições mais adequadas ao cultivo da cana-de-açúcar encontram-se no Brasil, como disponibilidade de recursos naturais, clima e solo adequados e suporte tecnológico (EMBRAPA, 2008). Em virtude disso, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) vem sendo cultivada e industrializada no Brasil desde o ano de 1532 para a produção de açúcar. No entanto, algumas mudanças no cenário atual promoveram alterações no panorama canavieiro no Brasil.

A escassez de chuvas e o aumento do consumo de energia foram responsáveis pela ocorrência da crise energética em 2001 e, conseqüentemente, pelo aparecimento de um novo panorama de incertezas quanto à garantia de oferta de energia no Brasil (JUNIOR, 2009). Nesse sentido, a contribuição energética do setor sucroalcooleiro, por meio da utilização da biomassa de cana-de-açúcar no processo de cogeração, consiste em uma importante alternativa para suprir esse déficit de eletricidade (CORRÊA; RAMON, 2002).

Além disso, no Estado de São Paulo, foi aprovada em 2002, a Lei n.11.241, que trata sobre a eliminação da queima da palha da cana-de-açúcar e estabelece um cronograma para esse novo cenário. Esse cronograma teve início no ano 2002 e finaliza em 2031, sendo que dispõe sobre as porcentagens de áreas plantadas em que a queima deve ser eliminada, as quais variam de 20% no primeiro ano a 100% em 2021, para áreas mecanizáveis, e até 2031 para áreas não mecanizáveis

(RIBEIRO; PESQUEOR, 2010). A proibição da queima de cana-de-açúcar consiste tanto em um problema socioambiental quanto em uma oportunidade de aproveitamento da palha para geração de energia. Assim, há alguns anos, passou a ser discutido o melhor aproveitamento da biomassa da cana de açúcar como um potencial econômico.

Nesse cenário, o plantio mecanizado de cana-de-açúcar tem aumentado de importância nos canaviais brasileiros. As principais vantagens desse sistema de plantio são o menor custo, quando comparado ao sistema convencional, e a possibilidade da realização do plantio em praticamente qualquer época do ano (SEGATO et al., 2006).

Assim sendo, esse sistema viabiliza o plantio das mudas inclusive em períodos com condições desfavoráveis (solo seco e baixas temperaturas) à brotação das gemas. Por outro lado, favorece a ocorrência de ferimentos nos toletes, levando ao atraso na brotação das mudas, as quais, conseqüentemente, sofrem maior incidência de podridões. A podridão-abacaxi destaca-se entre essas podridões que atacam as mudas recém-plantadas de cana-de-açúcar (ALFONSI et al., 1987; CASAGRANDE, 1991; GHELLER, 1995).

A podridão abacaxi da cana-de-açúcar é uma doença que prejudica o desenvolvimento das gemas e dos brotos, causando falhas no estande de plantas, redução na produção e produtividade do canavial e, em situações mais severas, antecipa a necessidade de replantio das mudas de cana (WISMER, 1961; MATSUOKA et al., 1981; TOKESHI; RAGO, 2005; RAID, 2009). O agente causal dessa doença, *Thielaviopsis paradoxa*, é um fungo que ocorre no solo, fato que facilita tanto sua sobrevivência em restos culturais, quanto a infecção de toletes de cana-de-açúcar. Além disso, o fungo é polífago, sendo que já foi observado em várias espécies tropicais, como o coqueiro, a bananeira, o abacaxi, entre outras plantas (WISMER, 1961; TOKESHI, 1980).

O método mais viável economicamente para o controle de doenças é o uso de variedades resistentes. No entanto, de acordo com Comstock et al. (1984), a quantidade de inóculo, em ensaios de campo, muitas vezes não é suficiente para

realizar testes com os genótipos de cana-de-açúcar de resistência ao patógeno. Além disso, uma vez que o patógeno é polífago, aumenta a dificuldade de obtenção de materiais resistentes. Dessa forma, não há relatos de variedades resistentes ou tolerantes a *T. paradoxa*. Por outro lado, informações sobre a extensão da diversidade genética dentro da população do agente causal são de fundamental importância para o desenvolvimento varietal e estabelecimento de sistemas de manejo. No entanto, é importante destacar que, apesar da importância dessa doença para a cana-de-açúcar, as referências sobre esse patógeno nessa cultura são escassas.

Nesse contexto, os marcadores moleculares apresentam-se como ferramentas valiosas para estudos da dinâmica de patógenos, em virtude da precisão, rapidez e sensibilidade (WARD; DE BOER, 1990), sendo os marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado) adequados para o estudo da diversidade genética de *T. paradoxa*.

Na técnica de AFLP, descrita por Vos et al. (1995), enzimas de restrição são responsáveis por clivar o DNA de interesse em inúmeros fragmentos, os quais são posteriormente ligados a adaptadores (sequências de DNA) em suas extremidades, permitindo que as etapas de pré-amplificação e amplificação seletiva ocorram por meio do anelamento de “primers” específicos. Os fragmentos gerados após todas essas etapas são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Sendo assim, a análise AFLP reúne os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. Além disso, a técnica de AFLP apresenta vantagens comparativas, como detecção de maior número de *loci*, cobertura ampla do genoma e baixo custo (LOPES et al., 2002).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar, por meio de marcadores AFLP, a variabilidade genética em 11 isolados de *T. paradoxa* provenientes de cinco regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil e mantidos na coleção de isolados do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) – Centro de Cana, de modo a contribuir com o estabelecimento de estratégias de manejo da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica da cana-de-açúcar

Apesar de ser uma cultura típica de climas tropicais e subtropicais, atualmente, a cana-de-açúcar é plantada e comercializada no mundo como um todo. Especialmente no Brasil, a cultura exerce enorme influência na economia, sendo que a estimativa para a safra 2015/2016 é de que haja um aumento de 3,2% na produção do país e de 3,8% na produtividade, passando de 70.495 kg/ha para 73.163 kg/ha quando comparado à safra passada (CONAB, 2015).

Segundo os dados do último monitoramento agrícola realizado pela CONAB, a área cultivada no Brasil com cana-de-açúcar na safra 2015/16 é de aproximadamente 9 milhões de hectares. Atualmente, oito estados são responsáveis por 94,7% da produção nacional, sendo que o estado de São Paulo, maior produtor, possui 51,8% (4.648,2 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 8% (715,3 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 8% (713,7 mil hectares), Paraná com 6,8% (613,4 mil hectares), Alagoas com 4,2% (380,3 mil hectares), Pernambuco com 3,1% (273,4 mil hectares) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares).

O setor sucroalcooleiro apresenta e sempre apresentou uma importante função no agronegócio brasileiro, produzindo não apenas açúcar e álcool combustível, mas também outros subprodutos com destaque de utilização na economia nacional (DIAS NETO, 2001).

Até meados de 1970, o cultivo de cana-de-açúcar era destinado, principalmente, à produção de açúcar. A criação do PROÁLCOOL e o aumento mundial nos preços do petróleo de 1973 a 1979 proporcionaram o aumento da participação do etanol na produção das usinas, sendo que entre as décadas de 80 e 90, essa produção de álcool superou a de açúcar, em virtude do aumento do uso de veículos movidos a álcool. Segundo Veiga et al. (2006), entre 1983 a 1989, as vendas de veículos movidos a etanol foram maiores que as de veículos movidos a gasolina, fato que influenciou diretamente no consumo de álcool hidratado.

Atualmente, as empresas sucroalcooleiras vêm diversificando seus produtos e utilizando subprodutos, sendo a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para cogeração de energia elétrica uma dessas possibilidades. Em decorrência da crise no setor de energia elétrica em 2001, a cogeração de energia, a partir do bagaço de cana, apresenta-se como uma boa alternativa para matriz energética brasileira.

No Estado de São Paulo, as usinas produzem, atualmente, cerca de 700 MW de energia e o excedente vendido é de apenas 40 MW, o que é suficiente para iluminar uma cidade de 600 mil habitantes. As 240 milhões de toneladas de cana moídas anualmente no estado resultam em, aproximadamente, 60 milhões de toneladas de bagaço. Se totalmente aproveitadas, esse subproduto poderia render 2.000 MW, correspondente a 16,5% da capacidade instalada do setor elétrico em São Paulo (MANFRIN; SEVERI, 2000).

Associada à utilização da biomassa de cana-de-açúcar no processo de cogeração, a proibição da queimada da cana-de-açúcar favorece a colheita de cana crua. Segundo IEA (2008), a Lei nº 11.241 de 19/09/2002 impõe a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar em um prazo de 20 anos para áreas mecanizáveis e de 30 anos para áreas não mecanizáveis. Esse fato provoca reflexos diretos no aumento da área de colheita mecanizada de cana-de-açúcar crua no País, sendo que àquelas usinas que cumprirem as regras estabelecidas será garantido o selo ambiental, o qual facilitará a comercialização do etanol.

Dessa forma, atualmente, a colheita e também o plantio mecanizados têm aumentado suas participações nos canaviais brasileiros. Uma vez que o plantio mecanizado possibilita a mecanização de todas as operações de plantio (sulcação, adubação, distribuição de rebolos e cobrimento), esse sistema favorece a eliminação de mão de obra, reduzindo os custos e aumentando a facilidade de gerenciamento do sistema (PINTO; MORAES, 1997).

Como, atualmente, os produtores realizam o plantio de cana-de-açúcar em diversas épocas do ano, de modo a escalonar a colheita da cultura e a melhorar o aproveitamento dos recursos tecnológicos e humanos (FERREIRA et al., 2008), a incidência de pragas e doenças têm aumentado nos canaviais. Além disso, no

plântio mecanizado, a cana é colhida mecanicamente e picada em toletes, proporcionando o aumento de ferimentos nas mudas (EMBRAPA, 2012). Aqueles patógenos que são incapazes de penetrar diretamente em tecidos íntegros ou por aberturas naturais da planta, colonizando a planta somente por ferimentos são favorecidos por esse sistema de plântio mecanizado.

Sendo assim, esse sistema contribui para o aumento da ocorrência de doenças no canavial, sendo que a podridão abacaxi é uma das mais importantes doenças favorecidas por esse sistema, principalmente, quando o plântio da cana-de-açúcar é realizado nas épocas mais secas do ano (ALFONSI et al., 1987; CASAGRANDE, 1991).

2.2. Podridão abacaxi da cana-de-açúcar

A podridão abacaxi é uma doença economicamente importante para o setor canavieiro devido ao fato do seu agente causal ser um fungo polífago, o qual pode ser encontrado em praticamente todas as regiões onde a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente.

A podridão abacaxi da cana-de-açúcar é causada pelo fungo *Thielaviopsis paradoxa* na sua fase anamórfica, correspondente a *Ceratocystis paradoxa* na fase teleomórfica, na qual são produzidos peritécios (EDGERTON, 1958). Nas condições brasileiras, o fungo nunca foi encontrado na sua fase teleomórfica, sendo encontrado na sua fase anamórfica (TOKESHI; RAGO, 2005).

Os primeiros relatos de *T. paradoxa* são datados de 1886 na França, onde foi estudado por de Seynes causando doença em frutos de abacaxi (WISMER, 1961). Já em 1893, Went verificou em Java uma podridão em cana-de-açúcar e classificou o fungo causador dessa doença *Thielaviopsis ethaceticus* Went. Como, nos primeiros estádios da doença, a cana-de-açúcar liberava um odor semelhante ao odor de abacaxi, o pesquisador nomeou a doença como “podridão abacaxi”. Von Hohnel, enquanto estudava uma doença em coqueiro em 1904, suspeitou que o fungo isolado de plantas doentes era idêntico a *Thielaviopsis ethaceticus*, suspeita que foi confirmada por Went, sendo que o fungo foi reclassificado como

Thielaviopsis paradoxa (de Seynes) v. Hohn. A fase sexual do patógeno foi descrita por Dade em 1928, sendo classificada como *Ceratostomella paradoxa* (de Seynes) Dade. Essa classificação foi alterada em 1952 por Moreau que transferiu *Ceratostomella paradoxa* para o gênero *Ceratocystis*.

O gênero *Thielaviopsis* abrange fungos saprófitas causadores de podridão preta de raízes em diversas espécies. *T. paradoxa* é considerado patógeno nas culturas *Plumeria* sp. e *Saccharum officinarum* (Gonsalves & Ferreira, 2002b) e está classificado na divisão eumicota, subdivisão deuteromicota, classe hifomicetes e ordem hifales (moniliales). O gênero *Ceratocystis* contempla várias espécies consideradas patogênicas em diversos hospedeiros. Por exemplo, *C. paradoxa* é patógeno em *Cocos nucifera*, *Musa acuminata*, *S. officinarum*, entre outros. Esse gênero está classificado na divisão eumicota, subdivisão ascomicotina, classe pirenomicetes e ordem esfaeriales (Gonsalves & Ferreira, 2002a).

Uma vez que a podridão abacaxi afeta gravemente a brotação das gemas e o desenvolvimento dos brotos, os canaviais afetados por essa doença apresentam muitas falhas, as quais podem atingir grandes extensões e, em determinadas situações, toda a operação de plantio deve ser refeita (SORDI, 1983). No entanto, quando a doença afeta a brotação inicial, os prejuízos podem ultrapassar as falhas no estande de plantas, ocasionando o menor desenvolvimento das plantas (CHAPOLA, 2010). A brotação da cana-de-açúcar pode ser reduzida em até 47%, fato que terá reflexo na produtividade final, a qual pode sofrer uma redução de 31% a 35% (RAHMAN; MONDAL, 2010).

Como *T. paradoxa* infecta a cana-de-açúcar por meio de ferimentos existentes nas mudas, uma vez que não é capaz de penetrar diretamente ou por meio de aberturas naturais, o patógeno aumenta de importância em plantio mecanizados, no qual os colmos são seccionados, facilitando a entrada do patógeno (WISMER, 1961; KILE, 1999; TOKESHI, 1980).

Os sintomas iniciais da doença consistem em um encharcamento que tem início nas extremidades das mudas e que se aprofunda com rapidez, sendo acompanhado, simultaneamente, pela formação de um tecido avermelhado, o qual

contém substâncias de defesa da planta. Apesar de os nós representarem uma barreira ao avanço do patógeno, em variedades altamente suscetíveis, as mudas inteiras podem ser colonizadas.

De acordo com o progresso da doença, a coloração dos tecidos é alterada, chegando a pardo-escura e negra, momento em que os feixes fibrovasculares internos encontram-se desprendidos e recobertos por uma massa negra de esporos. O sintoma característico da doença é a fermentação das mudas, as quais exalam um odor típico da essência de abacaxi, sendo que a fermentação é mais acentuada nas fases iniciais da infecção, uma vez que as mudas ainda possuem reservas de açúcar (WISMER, 1961; MATSUOKA et al., 1981; TOKESHI; RAGO, 2005; RAID, 2009).

Uma vez que o fator determinante para a manifestação da doença é o atraso na brotação das mudas, a ocorrência de baixas temperaturas, a utilização de gemas velhas no plantio, a cobertura muito profunda das mudas e os plantios realizados em solos secos ou encharcados favorecem o aumento da intensidade da doença (MATSUOKA et al., 1981; CROFT et al., 2000; TOKESHI; RAGO, 2005; RAID, 2009).

Dessa forma, medidas que estimulem a brotação rápida das gemas configuram ótimas alternativas no controle da podridão abacaxi, como por exemplo o uso de variedades com rápida brotação, já que não há relatos de variedades resistentes a *T. paradoxa*, o qual seria o método de controle mais adequado.

Em virtude da dificuldade na obtenção de materiais resistentes a *T. paradoxa*, o estudo da estrutura genética do patógeno, com o auxílio de marcadores moleculares, se faz necessário, de modo a determinar sistemas de manejo da doença mais eficientes.

2.3. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares consistem em *loci* cromossômicos, genes ou sequências de DNA que apresentam segregação mendeliana, podendo ter ação

dominante ou codominante e são usados em análises genéticas (FUNGARO; VIEIRA, 2001; BORÉM et al., 2009).

Devido à complexidade genética e diferentes níveis de ploidia da cana-de-açúcar, o estudo da variabilidade genética é essencial nos programas de melhoramento dessa espécie (*Saccharum* spp.) (STUPIELLO, 2002). Assim, o uso de ferramentas biotecnológicas, como os marcadores moleculares, nesse tipo de estudo auxilia na ampliação dos conhecimentos existentes sobre a estrutura e o comportamento de genomas complexos, reduzindo, significativamente, o tempo de desenvolvimento de novas variedades (FIGUEIRA, 2008).

Além de anteciparem a obtenção de genótipos desejáveis (FUGANTI et al., 2004), os marcadores moleculares, quando usados nos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, apresentam a vantagem de representarem o genótipo proveniente de um grande número de marcadores agronômicos e morfológicos (WUNSCH; HORMAZA, 2002). Segundo Leal et al. (2010), os marcadores moleculares RAPD e SSR podem ser citados como os mais utilizados para determinação da divergência genética em cana-de-açúcar. No entanto, técnicas como o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorfism”) (BOTSTEIN et al., 1980) e o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (VOS et al., 1995) foram amplamente utilizados em diversas culturas, incluindo a cana-de-açúcar.

Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os marcadores AFLP demonstram ser indicados ao estudo da diversidade genética de *C. paradoxa*, por fornecer muitos detalhes quanto à variabilidade genética dessa espécie de fungo, além de estarem sendo utilizados com sucesso para analisar o genoma de várias espécies de fungos, entre as quais *Fusarium* spp., *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (SILVA-MANN et al., 2002). Como exemplo, a técnica AFLP foi utilizada por Alvarez et al. (1997) no estudo da diversidade genética entre isolados de *T. paradoxa* obtidos da palma.

Marcadores AFLP também têm apresentado bons resultados no mapeamento genético (ZIMNOCH-GUZOWSKA et al., 2000; KATENGAM et al., 2002; STROMMER et al., 2002; KIDO, 2003), DNA *fingerprinting* (POWELL et al., 1996), estudos de diversidade genética (RUSSELL et al., 1997), entre outras aplicações, confirmando a importância dessa ferramenta biotecnológica na análise genética.

Apesar de ser trabalhosa, a técnica AFLP detecta um grande número de bandas polimórficas, com alto nível de polimorfismo, sendo mais confiável que outras técnicas como o RAPD. De acordo com Gerber et al. (2000), o alto número de *loci* polimórficos revelados pelo AFLP compensa a perda de informação resultante da dominância. Sabe-se também que a técnica AFLP tem custo inicial baixo e é mais transferível entre as espécies que o método SSR (GERBER et al., 2000).

Na técnica de AFLP, desenvolvida por Zabeau e Vos em 1993, após a digestão e amplificação do DNA genômico, os polimorfismos genéticos são identificados no gel pela presença ou ausência de fragmentos de DNA (DINIZ, 2007). Essa técnica envolve quatro etapas básicas, as quais consistem em digestão do DNA genômico, ligação de adaptadores, amplificação e análise dos fragmentos através de gel.

Na etapa de digestão do DNA genômico, fragmentos de restrição são gerados por meio da utilização de endonucleases, as quais são enzimas com alto nível de especificidade (BACHEM et al., 1996). Na etapa seguinte, nucleotídeos complementares às extremidades cortadas são ligados a esses fragmentos com o auxílio da T4 DNA ligase. Após as reações de restrição e ligação, um número limitado de fragmentos é amplificado seletivamente por iniciadores AFLP, os quais, posteriormente, são separados em gel e padrões típicos de AFLP são visualizados por autorradiografia ou por coloração com prata (BLEARS et al., 1998).

Dessa forma, uma das principais vantagens da técnica de AFLP consiste na capacidade de detectar inúmeras bandas polimórficas, mais do que qualquer outra técnica disponível baseada em PCR, as quais são analisadas simultaneamente, fazendo com que a técnica seja muito eficiente (BLEARS et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Thielaviopsis paradoxa* e extração de DNA

Neste trabalho, uma coleção de 11 isolados de *T. paradoxa*, obtida de colmos de cana-de-açúcar infectados¹, provenientes de cinco diferentes estados do Brasil, mantida no Centro de Cana - Instituto Agronômico - Ribeirão Preto-SP, foi utilizada para análise de diversidade genética (Tabela 1 e Figura 1). Três isolados foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Fitopatologia, ESALQ, USP. Para extração do DNA, cada isolado foi plaqueado em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubado a 28°C, por cinco dias (MILANES et al., 1986). Após esse período, o micélio, que foi coletado por raspagem e macerado com nitrogênio líquido, foi utilizado para a extração de DNA (ALJANABI et al., 1999).

¹ Débora Maria Sansoli Chanquini, Ribeirão Preto-SP, 2012. Dado não publicado.

Tabela 1. Variedade hospedeira, origem e ano do isolamento dos isolados de *T. paradoxa* utilizados neste estudo.

Isolados	Variedade	Cidade/Região	Ano
1	n.r.*	n.r. /BA	2004
2	n.r.	Buritizal/SP	2006
3	RB 72-454	Barrinha/SP	2004
4	n.r.	Pradópolis/SP	n.r.
5	RB 86-7515	Água Emendada/GO	2012
6	SP 81-3250	Santa Juliana/MG	2012
7	SP 81-3250	Guaíra/SP	2012
8	SP 81-3250	Guaíra/SP	2012
9	SP 81-3250	Guaíra/SP	2012
10	RB 86-7515	Conceição das Alagoas/MG	2012
11	RB86-7515	Colorado/PR	2012

*n.r. informação não registrada

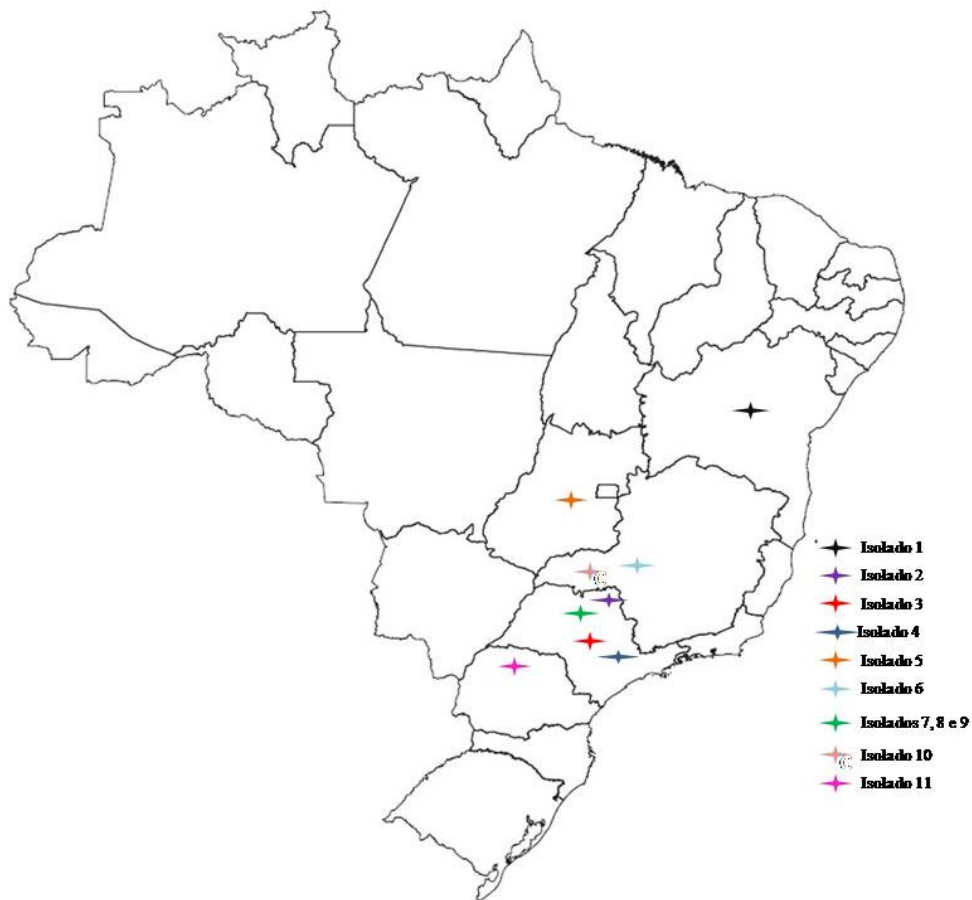


Figura 1. Localização no mapa do Brasil dos isolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados brasileiros.

3.2. Análise com marcadores moleculares AFLP

A análise com marcadores moleculares AFLP foi realizada segundo a metodologia proposta por Vos et al. (1995), com modificações. As sequências dos “primers” e dos adaptadores utilizados estão descritas na Tabela 2. O DNA genômico (400 ng) foi digerido com 4 unidades de cada enzima *EcoRI* (Invitrogen) e *MseI* (New England Biolabs, USA) e mantido a 37 °C por 3 h. Após, as amostras digeridas foram incubadas a 70 °C por 5 min para desativar as enzimas de restrição. Após a digestão, os adaptadores [(*EcoRI* (5 pmol) e *MseI* (50 pmol))] foram ligados às extremidades coesivas dos fragmentos de DNA digeridos usando 0,51 µl de T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA) e incubados a 37 °C por 3 h. O DNA ligado e diluído (6 vezes) foi pré-amplificado com “primers” (complementares ao

adaptadores de *EcoRI* e *MseI*) em termociclador [BIO-RAD thermocycler (My Cycler)] programado com 29 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s e 72 °C por 60 s. Após, os produtos amplificados foram diluídos 10 vezes e utilizados na amplificação seletiva, a qual foi realizada com 12 combinações de “primers” seletivos de *EcoRI* (marcados com Dyl 700 e 800) e *MseI* (Tabela 3), sendo que a mistura das reações com Dyl 700 e 800 foi realizada na proporção de 4 µl de cada uma delas. As amplificações foram conduzidas em termociclador BIO-RAD thermocycler (My Cycler), programado por 12 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C, e 60 s a 72 °C, reduzindo-se 0,7° C a cada ciclo, seguido por 23 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 56 °C e 60 s a 72 °C. Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de poliacrilamida a 6.5% e a eletroforese conduzida em analisador automático de DNA Li-Cor 4300 DNA Analyzer (LI-COR Biosciences).

Tabela 2. Sequências dos adaptadores e “primers” usados na análise com marcadores moleculares AFLP.

Nome	Código	Sequência
EcoRI adapter		5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3' 3'-CC ATG CGT CAG ATG CTC-5'
MseI adapter		5'-TAC TCA GGA CTC AT-3' 3'-G AGT CCT GAG TAG GAG-5'
EcoRI “primer”		5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C A-3'
MseI “primer”		5'-GAT GAG TCC TGA GTA A C-3'
EcoRI +3-AAC	E-AAC*	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AAC-3'
EcoRI +3-AGA	E-AGA*	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AGA-3'
EcoRI +3-ACA	E-ACA*	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C ACA-3'
EcoRI +3-AGC	E-AGC*	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AGC-3'
EcoRI +3-ACG	E-ACG	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C ACG-3'
EcoRI +3-AGG	E-AGG	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C AGG-3'
EcoRI +3-ACC	E-ACC	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C ACC-3'
EcoRI +3-ACT	E-ACT	5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT C ACT-3'
MseI + 3-CGC	E-CGC	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGC-3'
MseI + 3-CGT	E-CGT	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A CGT-3'

* “Primers” marcados com IR 700 e IR 800.

3.3. Análise dos dados

Os fragmentos amplificados foram categorizados para presença ou ausência de bandas em todos os 11 isolados. Inicialmente foram eliminadas as bandas não polimórficas (mesmo valor, 1 ou 0, nos 11 isolados) e elas foram enumeradas para cada combinação de “primers”, conforme Tabela 3. Foram calculados o Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC), de cada combinação de “primers”, usando a seguinte fórmula: $PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$, onde PIC_i é o conteúdo informativo de polimorfismo do marcador i (variando de 1 a 11), f_i é a frequência das bandas presentes e $1 - f_i$ é a frequência das bandas ausentes (ROLDAN-RUIZ et al., 2000).

Na sequência, foram determinadas as correlações lineares entre os valores (1 ou 0), classificando os fragmentos como isopolimórficos, quando apresentavam a mesma polimorfia nos 11 isolados, ou seja, correlação (1) ou (-1). As isopolimorfias de bandas foram classificadas dentro da combinação de “primers” ou com bandas de outras combinações de “primers” (Tabela 3).

Com as bandas polimórficas (grupos isopolimórficos representados por uma só banda polimórfica) (Tabela 4), a similaridade genética entre os isolados foi estimada usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1908): $GS_{jk} = a/(a+b+c)$, onde GS_{jk} é a medida da similaridade genética entre os indivíduos j e k , a é o número de bandas polimórficas presentes em ambos os indivíduos, b é o número de bandas presentes em j e ausentes em k , e c é o número de bandas presentes em k e ausentes em j . A dissimilaridade genética (D) foi estimada pelo complemento da similaridade (GS_{jk}), ou seja, $D = 1 - GS_{jk}$. As relações entre os isolados foram exploradas por meio de uma análise filogenética, usando o método UPGMA e o resultado foi expresso em um dendrograma utilizando o software NTSYS-PC version 2.0j (Exeter Software, Setauket, NY, USA). A estabilidade dos nós do dendrograma foi verificada pelo programa DBOOD versão 1.1 (COELHO, 2001). Também foi realizada análise de componentes principais, sendo que as coordenadas principais PCoA foram determinadas pelo programa DARwin5. As coordenadas principais PCoA foram extraídas do primeiro eixo segundo a fórmula $\sum_{i,j} (d_{ij} - \bar{\delta}_{ij})^2$, em que d_{ij} é a distância observada entre i e j e $\bar{\delta}_{ij}$ é a distância das projeções de i e j sobre esse

eixo. Em seguida, as coordenadas principais PCoA foram extraídas do segundo eixo, ortogonal ao anterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização molecular de 11 isolados de *Thielaviopsis paradoxa* com 12 combinações de “primers” gerou um total de 330 bandas (Figura 2), sendo que 32 são monomórficas e 298 são polimórficas, as quais foram denominadas de X1 a X298, conforme descrito na Tabela 3. Dessas bandas, 49 mostraram igual polimorfismo nos 11 isolados, com correlação linear (1), e, assim, foram denominadas bandas isopolimórficas (Tabela 4). Fixando cada um dos grupos que contêm bandas com isopolimorfismos, como uma banda, restaram 174 bandas (Tabela 4), as quais são polimórficas, com correlações diferentes de (1). É importante ressaltar que a coleção de *T. paradoxa* utilizada foi composta por poucos isolados, o que pode ser explicado, em parte, pelo fato de os trabalhos com esse patógeno serem recentes. Portanto, essa informação deve ser considerada para a análise e interpretação dos resultados desse estudo.

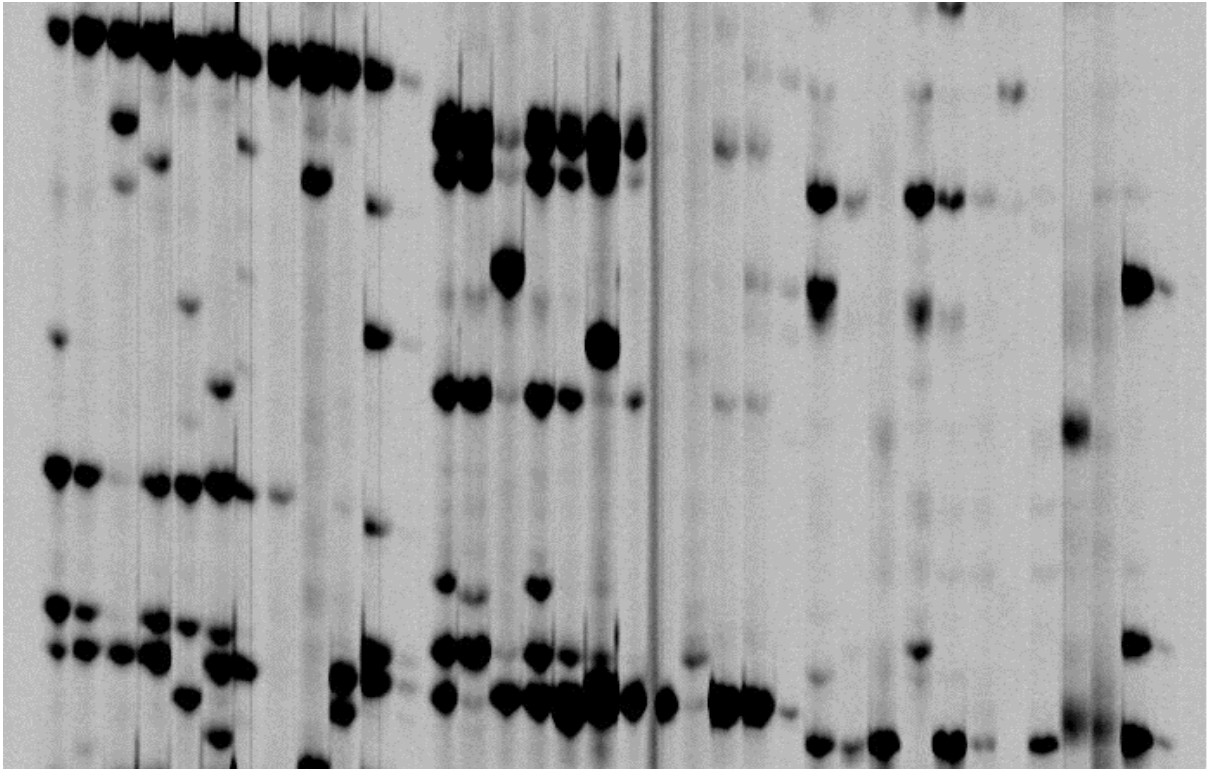


Figura 2. Bandas em gel de poliacrilamida obtidas por meio de análise AFLP com os isolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados brasileiros.

Tabela 3. Bandas detectadas (X1 a X298) na análise com marcadores moleculares AFLP nas 12 combinações de “primers” utilizadas e seus respectivos valores de PIC médio.

Combinações de “primers”	Bandas detectadas	PIC médio da combinação	Isopolimorfismo na combinação	Isopolimorfismo com outras combinações
MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-ACC	X1 a X30	0,348	5/30	268/144
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-AGG	X31 a X55	0,390	4/25	273/149
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACC	X56 a X85	0,368	7/30	268/144
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACT	X86 a X103	0,439	3/18	280/156
MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-AAC	X104 a X123	0,406	2/20	278/154
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-AGC	X124 a X150	0,427	5/27	271/147
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACG	X151 a X173	0,383	2/23	275/151
MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-AGG	X174 a X202	0,364	4/29	269/145
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACA	X203 a X223	0,443	2/21	277/153
MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-AGC	X224 a X245	0,430	2/22	276/152
MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-AAC	X246 a X268	0,441	2/23	275/151
MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-AGA	X269 a X298	0,438	1/30	268/144

Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórfica	Bandas isopolimórficas
X1	X1 = X14 = X53 = X54 = X94 = X128 = X147 = X151 = X177 = X199 = X249 = X259 = X261
X2	X2 = X8 = X155 = X225
X3	X3 = X18
X4	X4 = X150
X5	X5 = X6
X7	X7 = X52 = X101 = X102 = X116 = X169 = X198
X9	X9 = X24 = X40 = X105 = X149
X10	X10
X11	X11 = X232 = X242
X12	X12 = X93 = X99 = X136 = X196 = X224
X13	X13
X15	X15
X16	X16 = X80
X17	X17 = X255
X19	X19 = X34 = X95 = X153 = X222 = X223
X20	X20 = X129 = X178
X21	X21
X22	X22 = X194
X23	X23
X25	X25 = X62 = X85 = X87 = X100 = X120
X26	X26 = X51 = X71 = X98 = X132 = X135 = X138 = X205
X27	X27
X28	X28
X29	X29
X30	X30 = X220
X31	X31
X32	X32 = X44 = X204
X33	X33 = X65 = X154 = X208
X35	X35
X36	X36

Continuação Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórficas	Bandas isopolimórficas
X37	X37 = X256
X38	X38 = X46 = X163 = X170 = X176 = X206 = X228 = X229 = X251 = X279
X39	X39 = X41
X42	X42 = X82
X43	X43
X45	X45
X47	X47
X48	X48 = X144
X49	X49 = X56 = X207
X50	X50
X55	X55
X57	X57 = X58 = X59 = X61 = X124 = X148 = X193 = X212 = X214 = X226
X60	X60 = X74 = X91 = X158 = X286
X63	X63
X64	X64
X66	X66
X67	X67 = X103 = X125 = X126 = X266
X68	X68 = X133 = X230
X69	X69 = X72 = X167 = X227 = X292
X70	X70
X73	X73 = X76 = X143 = X246
X75	X75 = X239
X77	X77 = X250
X78	X78
X79	X79
X81	X81
X83	X83
X84	X84
X86	X86
X88	X88 = X115
X89	X89
X90	X90
X92	X92
X96	X96

Continuação Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórficas	Bandas isopolimórficas
X97	X97
X104	X104
X106	X106 = X108 = X123 = X160
X107	X107
X109	X109
X110	X110
X111	X111 = X183
X112	X112
X113	X113 = X202
X114	X114
X117	X117
X118	X118
X119	X119
X121	X121 = X215
X122	X122
X127	X127
X130	X130
X131	X131
X134	X134
X137	X137
X139	X139
X140	X140
X141	X141
X142	X142
X145	X145
X146	X146
X152	X152
X156	X156
X157	X157
X159	X159
X161	X161
X162	X162
X164	X164 = X173
X165	X165

Continuação Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórficas	Bandas isopolimórficas
X166	X166
X168	X168
X171	X171
X172	X172
X174	X174 = X175
X179	X179
X180	X180
X181	X181 = X235
X182	X182 = X248
X184	X184
X185	X185 = X187
X186	X186 = X192
X188	X188
X189	X189
X190	X190
X191	X191
X195	X195
X197	X197
X200	X200
X201	X201 = X257
X203	X203
X209	X209
X210	X210
X211	X211 = X294
X213	X213 = X243
X216	X216
X217	X217
X218	X218
X219	X219
X221	X221
X231	X231
X233	X233
X234	X234
X236	X236

Continuação Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórfica:	Bandas isopolimórficas
X237	X237
X238	X238
X240	X240
X241	X241
X244	X244
X245	X245 = X297
X247	X247
X252	X252
X253	X253
X254	X254
X258	X258
X260	X260
X262	X262
X263	X263
X264	X264
X265	X265
X267	X267
X268	X268
X269	X269
X270	X270 = X272
X271	X271
X273	X273
X274	X274
X275	X275
X276	X276
X277	X277
X278	X278
X280	X280
X281	X281
X282	X282
X283	X283
X284	X284
X285	X285
X287	X287

Continuação Tabela 4. Bandas polimórficas e seus isopolimorfismos identificados na análise dos 11 isolados de *T. paradoxa* com marcadores moleculares AFLP.

Bandas polimórfica:	Bandas isopolimórficas
X288	X288
X289	X289
X290	X290
X291	X291
X293	X293
X295	X295
X296	X296
X298	X298

Os valores de PIC (variabilidade potencial do material) médio de cada combinação de “primers” utilizada na análise AFLP variaram de 0,348 (MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-ACC) a 0,443 (MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACA), com média de 0,406, conforme descrito na Tabela 3. Esses valores de PIC calculados segundo o critério próprio para marcadores dominantes, no caso AFLP, são valores altos e podem ser considerados informativos, uma vez que o máximo valor possível é 0,5 (ROLDAN-RUIZ et al., 2000; DE RIEK et al., 2001). O polimorfismo genético dos *loci* em análise pode ser quantificado por meio do PIC, possibilitando a otimização do número de marcadores utilizados nos estudos moleculares, uma vez que os maiores valores de PIC estão associados a maior conteúdo de informação de ligação (LIU, 1997).

A combinação MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACA foi a que proporcionou maior conteúdo de polimorfismo para os isolados de *T. paradoxa* em estudo, com valor de PIC de 0,443. No mesmo sentido, a combinação MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-ACC foi a que proporcionou o menor conteúdo de polimorfismo para os isolados de *T. paradoxa* avaliados (PIC = 0,348).

É interessante destacar que o isopolimorfismo pode ocorrer entre bandas da mesma combinação de “primers” (Tabela 3) e isso afeta o PIC, reduzindo-o, ou com bandas de outras combinações de “primers” (Tabela 3). Esse segundo tipo dificulta interpretações de possíveis associações com atributos fenotípicos, como, por exemplo, a severidade, pois a associação medida será a mesma com qualquer uma

das bandas do grupo isopolimórfico e a causa-efeito, mais provavelmente se deve a apenas uma das bandas.

Sendo assim, com base na Tabela 3, é possível inferir que as combinações de “primers” MseI + 3-CGC/ EcoRI +3-ACT e MseI + 3-CGT/ EcoRI +3-AGA podem ser consideradas mais discriminatórias com relação ao PIC, uma vez que possuem menor isopolimorfismo entre bandas da mesma combinação e com bandas de outras combinações de “primers”.

As matrizes de dissimilaridade entre os 11 isolados obtidas a partir da 174 bandas polimórficas e a partir das 298 bandas polimórficas estão apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Matriz de dissimilaridade genética entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa*, provenientes de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados, obtida a partir das 174 bandas polimórficas, por meio da técnica de AFLP.

	Cp1-BA (G I)*	Cp2-SP (G I)	Cp3-SP (G II)*	Cp4-SP (G I)	Cp5-GO (G I)	Cp6-MG (G II)	Cp7-SP (G I)	Cp8-SP (G II)	Cp9-SP (G III)*	Cp10-MG (G II)	Cp11-PR (G II)
Cp1-BA (G I)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp2-SP (G I)	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp3-SP (G II)	0,808	0,862	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp4-SP (G I)	0,515	0,553	0,768	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp5-GO (G I)	0,658	0,640	0,810	0,580	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp6-MG (G II)	0,678	0,759	0,694	0,670	0,694	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp7-SP (G I)	0,685	0,711	0,755	0,716	0,752	0,699	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp8-SP (G II)	0,735	0,787	0,768	0,798	0,743	0,654	0,800	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp9-SP (G III)	0,787	0,837	0,725	0,835	0,868	0,732	0,775	0,789	0,000	0,000	0,000
Cp10- MG (G II)	0,733	0,785	0,755	0,764	0,729	0,650	0,656	0,690	0,761	0,000	0,000
Cp11-PR (G II)	0,704	0,766	0,660	0,722	0,698	0,682	0,755	0,709	0,828	0,731	0,000

*G I: Grupo I, G II: Grupo II, G III: Grupo III, conforme os dendrogramas de dissimilaridade genética que serão apresentados nas Figuras 3 e 4.

Tabela 6. Matriz de dissimilaridade genética entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa*, provenientes de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados, obtida a partir das 298 bandas polimórficas, por meio da técnica de AFLP.

	Cp1-BA (G I)*	Cp2-SP (G I)	Cp3-SP (G II)*	Cp4-SP (G I)	Cp5-GO (G I)	Cp6-MG (G II)	Cp7-SP (G III)*	Cp8-SP (G II)	Cp9-SP (G III)	Cp10-MG (G III)	Cp11-PR (G II)
Cp1-BA (G I)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp2-SP (G I)	0,427	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp3-SP (G II)	0,863	0,884	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp4-SP (G I)	0,456	0,489	0,823	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp5-GO (G I)	0,674	0,651	0,847	0,602	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp6-MG (G II)	0,769	0,810	0,718	0,741	0,746	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp7-SP (G III)	0,755	0,759	0,766	0,771	0,784	0,736	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp8-SP (G II)	0,784	0,806	0,789	0,814	0,759	0,703	0,831	0,000	0,000	0,000	0,000
Cp9-SP (G III)	0,853	0,877	0,736	0,873	0,892	0,743	0,792	0,817	0,000	0,000	0,000
Cp10- MG (G III)	0,809	0,833	0,769	0,818	0,778	0,696	0,696	0,737	0,723	0,000	0,000
Cp11-PR (G II)	0,778	0,809	0,686	0,787	0,753	0,712	0,782	0,735	0,838	0,757	0,000

*G I: Grupo I, G II: Grupo II, G III: Grupo III, conforme os dendrogramas de dissimilaridade genética que serão apresentados nas Figuras 3 e 4.

Com base na Tabela 5, é possível inferir que a menor dissimilaridade (0,5) ocorreu entre os isolados 1 e 2, provenientes dos estados da Bahia e de São Paulo, respectivamente. A maior dissimilaridade (0,868) ocorreu entre os isolados 5 e 9, provenientes dos estados de Goiás e de São Paulo, respectivamente, sendo que a dissimilaridade genética média foi de, aproximadamente, 0,74.

Com base na Tabela 6, é possível inferir que a menor dissimilaridade (0,427) ocorreu entre os isolados 1 e 2, provenientes dos estados da Bahia e de São Paulo, respectivamente. A maior dissimilaridade (0,892) ocorreu entre os isolados 5 e 9, provenientes dos estados de Goiás e de São Paulo, respectivamente, sendo que a dissimilaridade genética média foi de, aproximadamente, 0,76.

O agrupamento dos isolados, baseado no polimorfismo molecular obtido com as 174 bandas polimórficas, está representado na Figura 3. Os isolados agruparam-se em três grupos principais (Grupo I, Grupo II e Grupo III).

O grupo I foi formado por cinco isolados, sendo um deles proveniente do estado da Bahia, um deles proveniente do estado de Goiás e os outros três provenientes do estado de São Paulo. O grupo II foi constituído por cinco isolados, sendo dois provenientes do estado de São Paulo, um do estado do Paraná e dois provenientes do estado de Minas Gerais. Finalmente, o grupo III foi composto por apenas um isolado (isolado 9), sendo ele proveniente do estado de São Paulo, o qual mostrou-se distante dos demais no que se refere às características genéticas discriminadas pela análise AFLP.

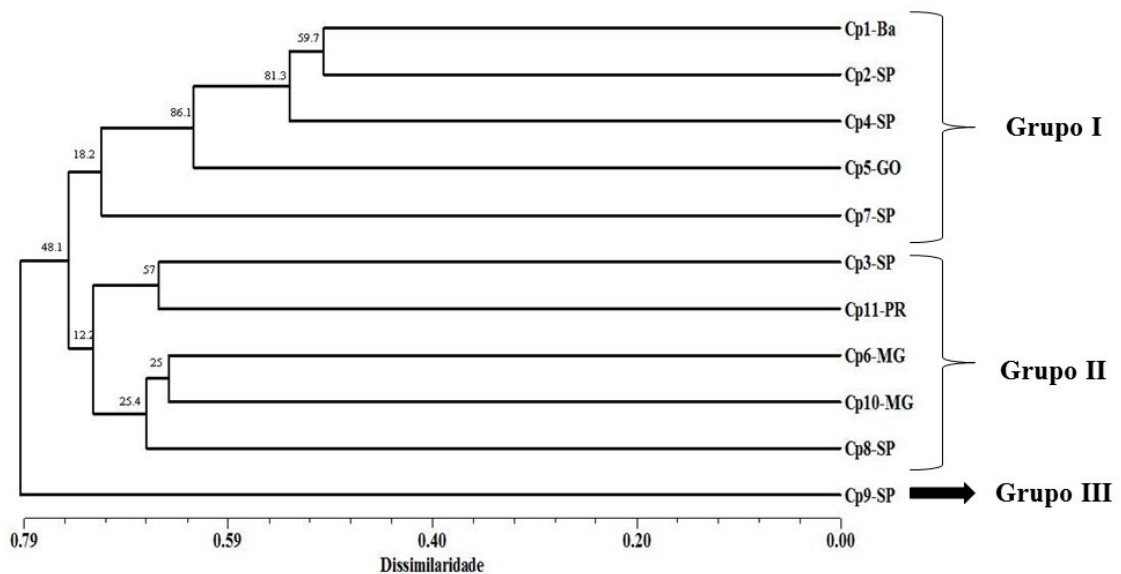


Figura 3. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido a partir das 174 bandas polimórficas por meio de análise AFLP, usando o método UPGMA, entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados brasileiros.

O agrupamento dos isolados, baseado no polimorfismo molecular obtido com as 298 bandas polimórficas, está representado na Figura 4. Os isolados agruparam-se em três grupos principais (Grupo I, Grupo II e Grupo III).

O grupo I foi formado por quatro isolados, sendo um deles proveniente do estado da Bahia, um deles proveniente do estado de Goiás e os outros dois provenientes do estado de São Paulo. O grupo II foi constituído por quatro isolados, sendo dois provenientes do estado de São Paulo, um do estado do Paraná e um proveniente do estado de Minas Gerais. Finalmente, o grupo III foi composto por três isolados, sendo dois provenientes do estado de São Paulo e um proveniente do estado de Minas Gerais.

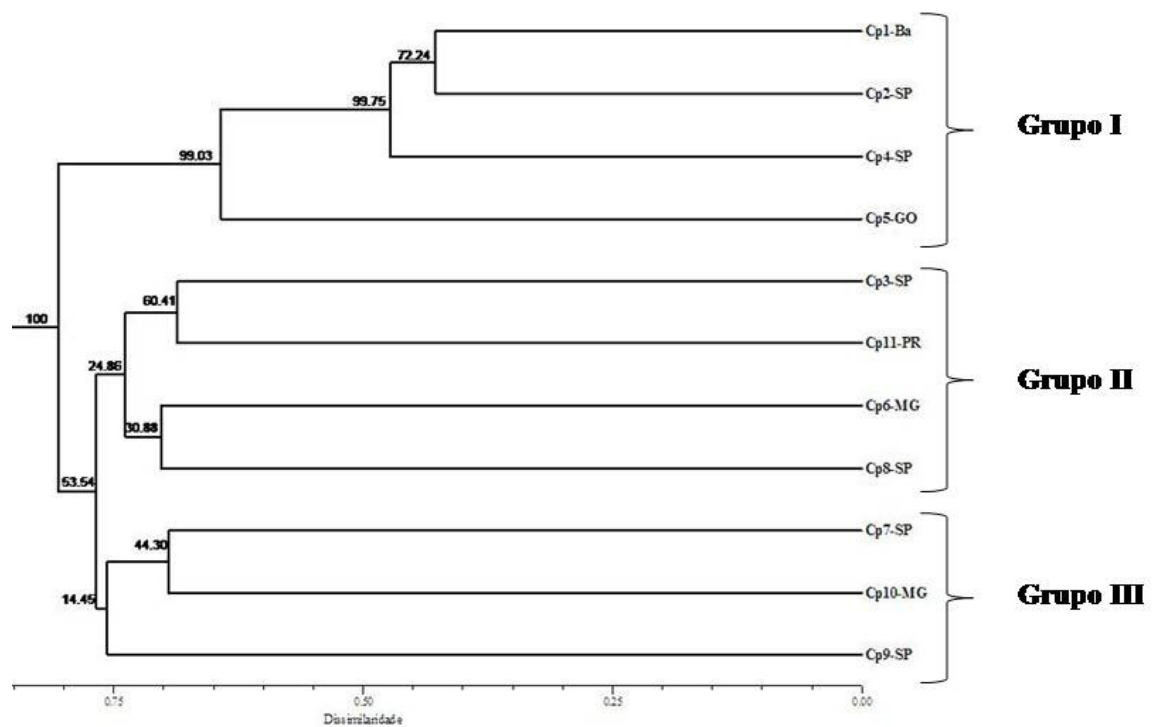


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido a partir das 298 bandas polimórficas por meio de análise AFLP, usando o método UPGMA, entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa* coletados de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados brasileiros.

De acordo com as Figuras 3 e 4, é possível inferir que os dendrogramas apresentaram padrão relativamente semelhante de dissimilaridade entre os isolados de *T. paradoxa*. A principal diferença presente entre esses dendrogramas consistiu nos isolados Cp7-SP e Cp10-MG, sendo que, enquanto na Figura 3 o isolado Cp7-SP pertencia ao Grupo I e o isolado Cp10-MG pertencia ao Grupo II, na Figura 4 ambos os isolados pertenciam ao Grupo III. Sendo assim, analisando tanto a Figura 3 quanto a Figura 4, evidencia-se a formação de grupos entre os 11 isolados de *T. paradoxa*, sendo que existe similaridade genética dentro do grupo e dissimilaridade genética entre os grupos.

As coordenadas foram calculadas para os dois primeiros eixos com autovalores positivos, os quais estão descritos na Tabela 7. As coordenadas principais obtidas para os dois primeiros eixos estão descritas na Tabela 8 e o

gráfico com dois eixos obtido pela análise de componentes principais está apresentado na Figura 5.

Tabela 7. Autovalores e porcentagem de retenção obtidos para os dois primeiros eixos na análise de componentes principais entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa*, provenientes de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados.

Eixos	Autovalores	Porcentagem de retenção	Porcentagem de retenção total
PCo(1)	0,09076	27,33	41,07
PCo(2)	0,04562	14,74	

Tabela 8. Coordenadas principais obtidas para os dois primeiros eixos na análise de componentes principais entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa*, provenientes de colmos de cana-de-açúcar de cinco diferentes estados.

Acessos	Eixo 1	Eixo 2
1	0,411412984796114	0,0841231259019415
2	0,45299580161856	0,0968309936239551
3	-0,347600076350924	-0,0603868418615944
4	0,406539677150854	0,0336173202103681
5	0,250114704672482	-0,176642405581853
6	-0,187258333030488	-0,0831513851818635
7	-0,0852045568376906	0,289347767175235
8	-0,13859326351613	-0,327928014529851
9	-0,353348502512917	0,351564747040769
10	-0,255544530816585	0,126682881461662
11	-0,153513905173276	-0,334058188258768

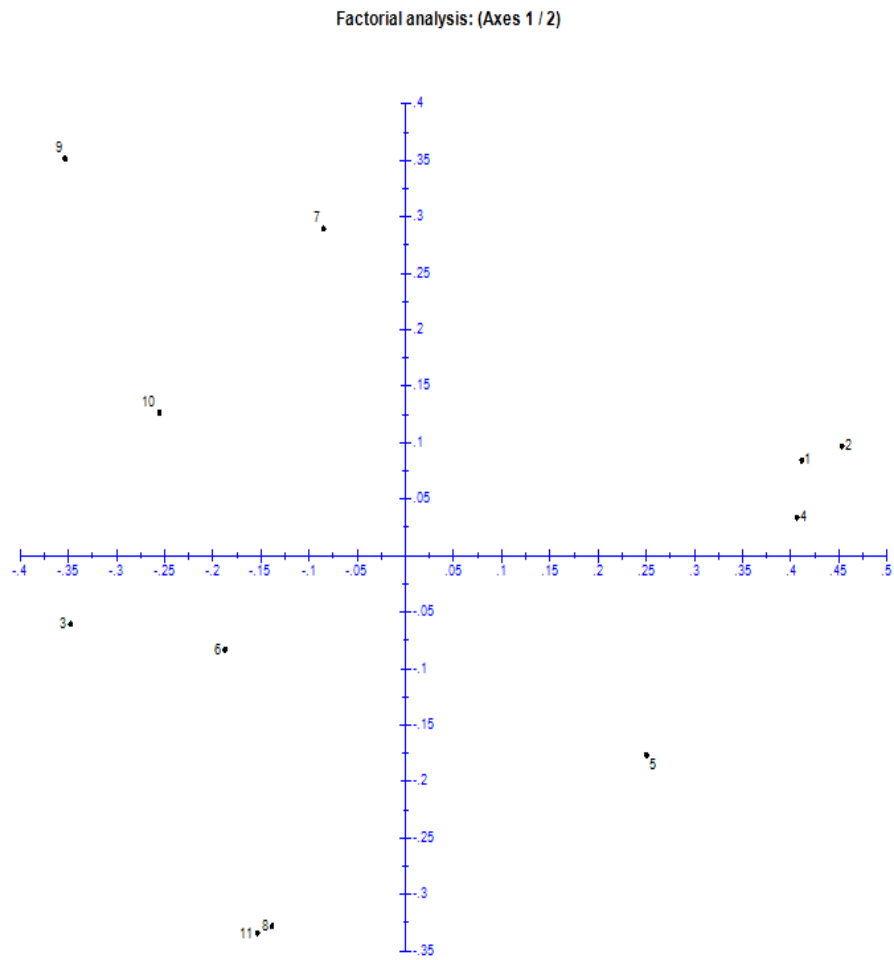


Figura 5. Diversidade dos acessos em função das duas coordenadas principais.

Por meio da análise da Tabela 7, é possível inferir que os dois eixos explicam 41,07% da diversidade existente. Analisando a Figura 5, nota-se um grupo similar formado pelos acessos 1, 2 e 4, com valores superiores a 0,4 no eixo 1 e valores inferiores a 0,1 no eixo 2. Relativamente perto, embora em outro quadrante, está o acesso 5. Ou seja, há relativa concordância com o Grupo I da Figura 4.

Destaca-se o acesso 9, com valor mais negativo (-0,35) no eixo 1 e valor positivo (0,35) no eixo 2. Relativamente próximos, mais para o centro, estão os acessos 7 e 10, concordando relativamente com o Grupo III da Figura 4.

Outros dois destaques similares são os acessos 11 e 8 com valores negativos (-0,33) no eixo 2 e respectivamente (-0,15 e -0,14) no eixo 1. Os acessos 6 e 3 estão no mesmo quadrante, mostrando relativa concordância com o Grupo II da Figura 4.

Em resumo, tanto o dendograma (Figura 4) quanto as coordenadas principais (Figura 5) mostram diversidade dos acessos com formação de pelo menos três grupos.

Estudos moleculares evidenciaram que a espécie *Thielaviopsis paradoxa* está relacionada de maneira próxima às espécies *Ceratocystis fimbriata*, *C. adiposa*, *C. radicola*, *C. coerulescens* e *C. fagacearum* (HAUSNER et al., 1993).

Análises RFLPs usando DNA nuclear e mitocondrial de *C. fagacearum* indicaram que essa espécie do gênero *Ceratocystis* apresenta baixos níveis de diversidade genética (KURDYLA et al., 1995), ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho para *T. paradoxa* usando a técnica AFLP.

No entanto, em espécies de fungos que possuem genomas mitocondriais grandes, como ocorre com *C. fagacearum*, é comum encontrar variação genética em populações geograficamente distintas (KURDYLA et al., 1995).

Grande parte da variação detectada em análises RFLP provém de pequenas inserções ou deleções (estimadas em 20 a 200 pb). Assim sendo, muitas das diferenças entre os isolados poderiam ser detectadas apenas quando os fragmentos

hibridizados tivessem de 500 a 4000 pb, gerando condições de resolução ótima para a eletroforese.

Uma vez que na técnica AFLP são produzidos fragmentos de 80 a 500 pb e grande número de polimorfismos por reação (FALEIRO et al., 2001), fica constatada a eficiência da técnica AFLP no estudo da diversidade genética entre isolados de espécies do gênero *Ceratocystis*, em detrimento da técnica RFLP para esse uso em específico. Tal fato pode explicar, em parte, a baixa diversidade genética encontrada em *C. fagacearum* quando foi utilizada a técnica de RFLP por Kurdyla et al. (1995).

Na literatura não há trabalhos sobre a variabilidade genética de *T. paradoxa* em cana-de-açúcar. No entanto, Alvarez et al. (1997) relataram haver alta variabilidade genética entre isolados de *T. paradoxa* obtidos da palma quando fizeram uso da técnica de AFLP, em contraste com uma menor variabilidade obtida por meio das técnicas de PCR e RAPD.

A caracterização molecular, realizada no presente trabalho por meio da técnica de AFLP, evidenciou a existência de alta variabilidade genética entre os isolados de *T. paradoxa* obtidos das regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil. No entanto, não foi possível estabelecer uma conexão entre a similaridade genética e a região do País de onde esses isolados foram obtidos. Essa questão pode ser explicada, em parte, pelo fato de o patógeno ser polífago e ocorrer no solo, sendo encontrado em praticamente todas as regiões em que a cana-de-açúcar é cultivada.

Em 1960, George L. McNew apresentou uma classificação para doenças de plantas, que tinha como base os processos fisiológicos vitais da planta interferidos pelo patógeno, de modo que foram propostos seis grupos de doenças segundo essa classificação. Segundo Bedendo (1995), por meio dessa classificação também é possível identificar graus de agressividade, parasitismo e especificidade entre os agentes causais de doenças, de modo que os patógenos que constituem o grupo VI são menos agressivos, com maior evolução do parasitismo e maior especificidade em relação ao hospedeiro quando comparados aos patógenos constituintes do grupo I.

Visto que a podridão abacaxi afeta, principalmente, o desenvolvimento de tecidos jovens (brotação das gemas), causando falhas na brotação, e, conseqüentemente, o processo de absorção de água e elementos minerais, podendo retardar ou inibir o desenvolvimento das raízes (WISMER, 1961; MATSUOKA et al., 1981; TOKESHI; RAGO, 2005; RAID, 2009), ela pode ser enquadrada tanto no grupo de doenças II – “damping-off” ou tombamento de plântulas - quanto no III – podridões de raízes e de colo - , segundo a classificação proposta por McNew em 1960.

Ambos os grupos de doenças abrigam parasitas facultativos, os quais, por apresentarem baixa especificidade em relação ao hospedeiro, podem infectar uma gama de diferentes espécies de plantas. Sendo assim, a alta variabilidade genética entre os isolados de *Thielaviopsis paradoxa* identificada por marcadores AFLP neste trabalho, pode ser explicada, entre outros fatores, pela baixa especificidade desse fungo em relação aos seus hospedeiros, visto que *T. paradoxa* é um patógeno polífago.

Os principais fatores que geram a variabilidade genética e amplificação da diversidade nas populações naturais são, respectivamente, a mutação e a recombinação, os quais possuem papel essencial no processo evolutivo das espécies (BRAMMER, 1993).

Uma vez que *T. paradoxa* pode sobreviver no solo por períodos superiores a 15 meses, segundo Rott et al. (2000), a variabilidade genética observada entre os isolados de *T. paradoxa* também pode ser explicada por uma recombinação, que pode ocorrer em regiões de cultivo, decorrente da permanência de estruturas do patógeno de uma safra para a outra .

Dessa forma, acredita-se que a recombinação genética entre os fitopatógenos pode ocorrer em regiões onde a produção de cana-de-açúcar é intensiva. Kaufmann e Weidmann (1996) propuseram que variabilidade em fitopatógenos pode ser decorrente de reprodução sexuada ou mesmo de outros mecanismos de recombinação genética.

Do ponto de vista evolutivo, essa variabilidade genética das populações é essencial na determinação do potencial de adaptação às diversas condições sob as quais um organismo se encontra (MCDONALD; LINDE, 2002). Nesse cenário, o desenvolvimento de variedades resistentes torna-se inviável, uma vez que a natureza virulenta do patógeno, associada à baixa especificidade em relação ao hospedeiro, proporciona alta variabilidade genética ao patógeno, dificultando a obtenção de materiais resistentes.

5. CONCLUSÃO

O estudo de diversidade genética de 11 isolados de *Thielaviopsis paradoxa* obtidos de regiões de cultivo comercial de cana-de-açúcar resultou na formação de 3 grupos entre esses isolados, com dissimilaridade genética entre os grupos, demonstrando alto polimorfismo entre esses isolados, fato que sinaliza a existência de alta variabilidade genética dessa espécie de fitopatógeno.

6. REFERÊNCIAS

ALFONSI, R. R.; PEDRO, J. R. M. J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V. Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas SP. Fundação Cargill. v.1, p. 42-55, 1987.

ALJANABI, S. M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, p. 1-8, 1999.

ALVAREZ, E.; CHACÓN, M. I.; LOKE, J. B.; GÓMEZ, P. L. Pathogenic and molecular characterization of *Thielaviopsis paradoxa* strains by RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, v. 87, p.6-23, 1997.

BACHEM, C. W. B.; van der HOEVEN, R. S.; de BRUJIN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. **Plant J**, v. 9, p. 745-753, 1996.

BEDENDO, I. P. Classificação de doenças. In: BERGAMIN, F. A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. v.1, p.805-809, 1995.

BLEARS, M. J.; De GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): a review of procedure and its applications. **J Ind Micro & Biotech**, v. 21, p. 99-114, 1998.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Amer J of Hum Genet**, v. 32, p. 314–332, 1980.

BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C.; COLLI, W. **Glossário de Biotecnologia**. 2. Ed. Viçosa: UFV, 2009.

BRAMMER, S. P. **Variabilidade isoenzimática em populações naturais de *Hordeum stenostachys* (Poaceae)**. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia de cana-de-açúcar**. Jaboticabal SP. FUNEP, 1991.

CHAPOLA, R. G. **Controle da podridão abacaxi da cana-de-açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas no sulco de plantio**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba SP, 2010.

COELHO, A. S. G. **DBOOD: Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, versão 1.1**. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia GO, Brasil, 2001.

COMSTOCK, J. C.; FERREIRA, S. A.; CHING, S. A.; HILTON, H. W. Control of pineapple disease of sugarcane with propiconazole. **Plant Disease**, v. 68, p. 1072-1075, 1984.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2013** – Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 5 de maio de 2015.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015** – Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em 24 de agosto de 2015.

CORRÊA, N. V.; RAMON, D. (2002) **Análise de opções tecnológicas para projetos de co-geração no setor sucro-alcooleiro**. Brasília DF. SETAP, 2002.

CROFT, B.; MAGAREY, R.; WHITTLE, P. Disease management. In: HOGARTH, D. M.; ALLSOPP, P. G. (Eds.). **Manual of canegrowing**. Brisbane: Bureau of Sugar Experiment Stations. p. 263-289, 2000.

DE RIEK, J.; CALSYN, E.; EVERAERT, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE LOOSE, M. AFLP-based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. **Theor Appl Genet**, v. 103, p. 1254–1265, 2001.

DIAS NETO, A. F. Aprimoramento de um mecanismo dosador de rebolos de cana-de-açúcar para o plantio mecanizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, p. 546-553, 2001.

DINIZ, M. C. **Associação de marcadores (AFLP) com caracteres de interesse agrônômico em clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

EDGERTON, C. W. (1958) Pineapple disease. In: **Sugar-cane and its diseases**. Louisiana State University Press: Baton Rouge. p. 103-106, 1958.

EMBRAPA. **A energia que vem da cana-de-açúcar, safra 2008**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/sala-de-imprensa-artigos>. Acesso em: 18 de março de 2015.

EMBRAPA. **Árvore do conhecimento - cana-de-açúcar 2012**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/>. Acesso em: 25 de junho de 2015.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, v. 13, p. 79-86, 2001.

FERREIRA, M. D. C.; WERNECK, C. F.; FURUHASHI, S.; LEITE, G. J. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para o controle da podridão abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v. 28, p. 263-273, 2008.

FIGUEIRA, A. Biotecnologia no melhoramento: mito ou realidade. **Revista Opiniões, Ribeirão Preto**, v. 3, n. 1, p.14, 2008.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. (2004) Identificação de marcadores moleculares de microssatélites para seleção de genótipos de soja resistentes a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 28: 125-130.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores Moleculares. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária. pp. 153-200, 2001.

GERBER, S.; MARIETTE, S.; STREIFF, R.; BODENES, C.; KREMER, A. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Mol Ecol**, v. 9, p. 1037-1048, 2000.

GHELLER, A. C. A. **Técnica cultural para o controle da podridão abacaxi em cana-de-açúcar e modelo para estimativas de perda**. Tese Doutorado em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba SP, Brasil, 1995.

GONSALVES, A.K. & FERREIRA, S.A. 2002a Disponível em: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/cera_prim.htm Acesso em: 12 de dezembro de 2015.

GONSALVES, A.K. & FERREIRA, S.A. 2002b Disponível em: http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/cera_prim.htm Acesso em: 12 de dezembro de 2015.

HAUSNER, G.; REID, J.; KLASSEN, G. R. Grouping of isolates and species of *Ceratocystis sensu lato* on the basis of molecular and morphological characters. In: WINGFIELD, M. J.; SIEFERT, K. A.; WEBBER, J. A. (Eds.) *Ceratocystis* and *Ophiostoma*, taxonomy, ecology, and pathogenicity. **Am Phytopathol Soc. St Paul**, Minnesota. p. 93-104, 1993.

IEA. INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Índice de mecanização na colheita da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo e nas regiões produtoras paulistas, Junho de 2007. **Análises e Indicadores do Agronegócio** v.3, n.3, março 2008.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles**. p. 223-270, 1908.

JUNIOR, R. A. R. **Análise da viabilidade do aproveitamento da palha da cana-de-açúcar para cogeração de energia numa usina sucroalcooleira**. Tese de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Ilha Solteira. Ilha Solteira SP, Brasil, 2009.

KATENGAM, S.; CRANE, J. M.; KNAPP, S. J. The development of a genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. **Theor Appl Genet**, v. 104, p. 92-96, 2002.

KAUFMANN, P. J.; WEIDMANN, G. J. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. **Plant Disease**, v. 80, p. 1289-1293, 1996.

KIDO, E. A. **Mapeamento de Marcadores Moleculares AFLP em população derivadas de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e suas associações com caracteres agrônômicos**. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2003.

KILE, G. A. Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara*. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology, and pathogenicity. **St. Paul: APS Press**, p. 173-183, 1999.

KURDYLA, T. M.; GUTHRIE, P. A. I.; MCDONALD, B. A.; APPEL, D. N. RFLPs in mitochondrial and nuclear DNA indicate low levels of genetic diversity in the oak wilt pathogen *Ceratocystis fagacearum*. **Curr Genet**, v. 27, p. 373 – 378, 1995.

LEAL, A. A.; MANGOLIN, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SCAPIM, C. A.; MOTT, A. S.; ELOI, I. B. O.; CORDOVÉS, V.; SILVA, M. F. P.

Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 9-18, 2010.

LIU, B. H. *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. Boca Raton. **CRC Press**, 1997.

LOPES, M. S.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, p. 56-60, 2002.

MANFRIM, L. F.; SEVERI, M. A. **Algumas Novidades no Setor da Cogeração de Energia**, 2000. Disponível em: [http://: www.jornalcana.com.br](http://www.jornalcana.com.br). Acesso em: 13 de junho de 2015.

MATSUOKA, S.; AGUILLERA, M. M.; MASUDA, Y.; ABRAMO, F. J. **Principais doenças da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba SP. IAA, Planalsucar, 1981.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potencial and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MILANES, G.; VIRELLES, P.; HERRERA, I. L. Effect of temperature on the growth and pathogenic activity of *Thielaviopsis paradoxa* (de Seynes) Moreau. **Centro Agrícola**, v.13, p. 24-28, 1986.

MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens. **Plant Disease**, v. 87, p. 608-617, 2003.

PINTO, A. C. P.; MORAES, E. E. **Equipamento distribuidor de toletes para plantio de cana-de-açúcar**. In: Seminário COOPERSUCAR de Tecnologia Agrônômica. Piracicaba SP, p. 213-231, 1997.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.

RAHMAN, M.; MONDAL, R. I. **Agricultural research priority: vision- 2030 and beyond; crops: cereals other than rice, sugarcane and jute**, 2010. Disponível em: <http://www.barc.gov.bd/> . Acesso em: 05 de abril de 2015.

RAID, R. N. Pineapple disease of sugarcane. **Florida Sugarcane Handbook**. Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2009.

RIBEIRO, H.; PESQUERO, C. Queimadas de cana-de-açúcar: avaliação de efeitos na qualidade do ar e na saúde respiratória de crianças. **Estudos avançados**, p. 24 - 68, 2010.

ROLDAN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Mol Breed**, v. 6, p. 125–134, 2000.

ROTT, P.; BAILEY, R. A.; COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. (Eds.) **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier. p. 339, 2000.

RUSSELL, R. J.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATS, B. G.; JAHOR, A.; POWELL, W.; WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theor Appl Genet**, v. 95, p. 714-722, 1997.

SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Eds.) **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba SP. p. 415, 2006.

SILVA-MANN, R.; MACHADO, J. C.; CARVALHO, K. C. S.; VIEIRA, M. G. C. Estudo da variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodão por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 27- 32, 2002.

SORDI, R. A. **Efeito da podridão abacaxi (*Thielaviopsis paradoxa* De Seynes-V. HOHN) em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. In: Congresso Paulista de Fitopatologia. Araras SP. IAA, Planalsucar, 1983.

STROMMER, J.; PETERS, J.; ZETHOF, J.; KENKELEIRE, P.; DE GERATS, T. AFLP maps of *Petunia hybrida*: building maps when markers cluster. **Theor Appl Genet**, v. 105, p. 1000-1009, 2002.

STUPIELLO, J. P. **Conversando com a cana**. STAB, v. 20, p. 38, 2002.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo SP. Agronômica Ceres, v. 2, p. 141-206, 1980.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum spp.*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN, F. A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo SP. Agronômica Ceres, v. 2, p. 185-196, 2005.

VEIGA, C. F. M.; VIEIRA, J. R. M.; IVAN, F. **Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro: relatório de pesquisa**. Rio de Janeiro RJ. Faerj - Sebrae/RJ, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, V. D. T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4.407-4.414, 1995.

WARD, L. J.; DE BOER, S. H. A DNA probe specific for serologically diverse strains of *Erwinia carotovora*. **Phytopathology**, v. 80, p. 665-669, 1990.

WISMER, C. A. Pineapple disease. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGHES, C. G. Sugar Cane Diseases of the World. **Elsevire Publishing Company**, v. 1, p. 223-235, 1961.

WUNSCH, A.; HORMAZA, J. I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. **Euphytica**, v. 125, p. 59-67, 2002.

ZIMNOCH-GUZOWSKA, E.; MARCZEWSKI, W.; LEBECKA, R.; FLIS, B.; SCHAFER-PREGL, R.; SALAMINI, F.; GEBHARDT, C. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora ssp atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP and resistance-gene-like markers. **Crop Sci**, v. 40, p. 1156-1167, 2000.