

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

LOUYNE VARINI SANTOS DOS ANJOS

**COMPLEXO CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA: INFLUÊNCIA DA
TEMPERATURA E PERÍODO DE MOLHAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DA
DOENÇA EM FOLÍOLOS DE SERINGUEIRA.**

Ilha Solteira
2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LOUYNE VARINI SANTOS DOS ANJOS

**COMPLEXO CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA: INFLUÊNCIA DA
TEMPERATURA E PERÍODO DE MOLHAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DA
DOENÇA EM FOLÍOLOS DE SERINGUEIRA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira – Unesp como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Especialidade:
Sistemas de Produção.

Ana Carolina Firmino
Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

A599c Anjos, Louyne Varini Santos dos.
Complexo crosta negra em seringueira: influência da temperatura e período de molhamento no desenvolvimento da doença em folíolos de seringueira / Louyne Varini Santos dos Anjos. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2023

Orientador: Ana Carolina Firmino
Inclui bibliografia

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Temperatura. 3. Molhamento. 4. *Rosenscheldiella heveae*. 5. *Cladosporium Cladosporioides*.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Complexo crosta negra em seringueira: Influência da temperatura e período de molhamento no desenvolvimento da doença em folíolos de seringueira

AUTORA: LOUYNE VARINI SANTOS DOS ANJOS

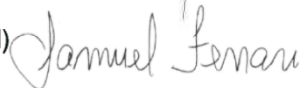
ORIENTADORA: ANA CAROLINA FIRMINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia, especialidade: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA CAROLINA FIRMINO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAT / UNESP - Dracena



Prof. Dr. SAMUEL FERRARI (Participação Virtual)
Agronomia / FCAT UNESP Dracena/SP



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)
Proteção de Plantas / Universidade Estadual Paulista - câmpus Botucatu



Ilha Solteira, 20 de janeiro de 2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Claudio Varino dos Anjos, Silvana Monteiro dos Santos dos Anjos, ao meu irmão Luis Claudio Varini dos Anjos e a minha orientadora Ana Carolina Firmino, todos vocês serão para sempre lembrados pois fizeram parte da minha formação. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana Carolina Firmino, pelos ensinamentos, orientação e confiança, fundamentais para o meu aperfeiçoamento pessoal e profissional;

Aos meus pais Silvana e Claudio e ao meu irmão, pelo amor e apoio em todos os sentidos;

Aos meus colegas de laboratório Izabela Ponso Magalhaes, Marcela Eloí Gomes, Thais Lopes de Oliveira e Jhonata Marcos;

Aos professores Prof. Dr. Evandro Pereira Prado, Prof^a Dra Pâmela Gomes Nakada Freitas, Prof. Associado Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo e Prof. Associado Diego Cunha Zied pela disponibilização de seus equipamentos para meus estudos;

A todos os professores, técnicos e servidores da UNESP/FCAT - Dracena que disponibilizaram tempo e conhecimento para me ajudar na execução dos meus experimentos;

Aos professores, técnicos e servidores da UNESP - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/Unesp – Ilha Solteira), pelos ensinamentos e auxílios durante o mestrado.

A todos que direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

O meu muito obrigada!!!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2020/11518-4, pelo apoio financeiro.

“O futuro é construído pelas nossas decisões diárias, inconstantes e mutáveis, e cada evento influencia todos os outros”. **Alvin Toffler**

RESUMO

A crosta negra, causada por *Rosenscheldiella heveae*, tornou-se uma preocupação na produção da seringueira, pois avança rapidamente nas áreas de cultivo no Brasil, causando queda precoce das folhas e consequentemente reduzindo a produção de látex. Este trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de *R. heveae*, em sua forma sexuada e assexuada (*Cladosporium*) em folíolos de seringueira do clone comercial RRIM600, sob influência de diferentes temperaturas e períodos de molhamento. Os experimentos realizados com esporos sexuais e assexuados foram montados separadamente. Em ambos os experimentos, os folíolos de seringueira foram previamente desinfestados superficialmente e inoculados com alíquotas contendo 30 µL de suspensão de esporos (10^5 conídios. mL⁻¹). Após a inoculação dos esporos, os folíolos foram mantidos em câmara úmida a 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40±1 °C no escuro com período de molhamento de 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Os estudos foram avaliados por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV) para observação do desenvolvimento do fungo fora da folha e também verificou-se a colonização e reprodução do fungo na parte interna da folha por meio do microscópio eletrônico de luz. As imagens obtidas em MEV, observou-se que os esporos assexuados, *Cladosporium*, tem seu desenvolvimento rápido, pois 4 horas após a inoculação do fungo é possível verificar a germinação e penetração dos conídios nas temperaturas de 10 a 20 °C. Verificou-se nesta fase, nas temperaturas de 10 a 25 °C, a formação de fiálides, a partir de seis horas após a inoculação, indicando que o fungo já está em período reprodutivo. Na fase sexuada, *R. heveae*, em MEV, a partir das 4 horas após a inoculação, foi possível verificar a formação de pequenos protuberâncias, que devem ser o início da formação dos estromas, nas temperaturas entre 10 e 20 °C. Estas pontuações negras, nestas temperaturas, evoluem no decorrer dos períodos avaliados, para manchas negras protuberantes circulares, similares aos sintomas de crosta negra, com aparente formação de esporos sobre elas. Os dados obtidos a partir das análises em microscópio UV corroboram com o que foi observado em MEV, mostrando que o fungo tem bom desenvolvimento nas suas duas fases entre as temperaturas de 20 a 25 °C.

Palavras-chave: *Hevea brasiliensis*; temperatura; molhamento; *Rosenscheldiella heveae*; *Cladosporium Cladosporioides*.

ABSTRACT

Black scab, caused by *Rosenscheldiella heveae*, has become a concern in rubber tree production, as it is rapidly advancing in growing areas in Brazil, causing early leaf fall and consequently reducing latex production. This work aimed to evaluate the development of *R. heveae*, in its sexual and asexual form (*Cladosporium*) in rubber tree leaflets from the commercial clone RRIM600, under the influence of different temperatures and wetting periods. Experiments performed with sexual and asexual spores were set up separately. In both experiments, the rubber tree leaflets were previously superficially disinfested and inoculated with aliquots containing 30 μL of spore suspension (10^5 conidia. mL^{-1}). After inoculation of the spores, the leaflets were kept in a humid chamber at 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 ± 1 °C in the dark with wetting period of 4, 6, 12, 24, 48 e 72 hours. The studies were evaluated using a scanning electron microscope (SEM) for observing fungus development outside the leaf and it was also verified the colonization and reproduction of the fungus in the inner part of the leaf by means of the electronic light microscope. The images obtained in SEM, it was observed that the asexual spores, *Cladosporium*, has a fast development, because 4 hours after the fungus inoculation it is possible to verify the germination and penetration of the conidia at temperatures from 10 to 20 °C. It was verified in this phase, at temperatures from 10 to 25 °C, the formation of phialides, from six hours after inoculation, indicating that the fungus is already in the reproductive period. In the sexual phase, *R. heveae*, in SEM, from four hours after inoculation, it was possible to verify the formation of small protuberances, which must be the beginning of the formation of stromas, at temperatures between 10 and 20 °C. These black dots, at these temperatures, evolve over the periods evaluated, to circular protuberant black spots, similar to the symptoms of black crust, with apparent formation of spores on them. The data obtained from the UV microscope analyzes corroborate with what was observed in SEM, showing that the fungus has good development in its two phases between temperatures of 20 to 25 °C.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; temperature; wetness; *Rosenscheldiella heveae*; *Cladosporium Cladosporioides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sintomas de crosta negra em folhas de seringueira, na face adaxial (A) e abaxial (B)	26
Figura 2 – Ascósporos de <i>R. heveae</i> liberados pelo estroma que foram coletados para obtenção dos isolados.....	26
Figura 3 – Colônias assexuada de <i>R. heveae</i> em meio de cultura BDA.	27
Figura 4 – Inoculação dos folíolos de seringueira com a suspensão de esporos.....	27
Figura 5 – Desenvolvimento do <i>Cladosporium</i> na superfície de folhas de seringueira em microscópio eletrônico de varredura, com 4, 6 e 12 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas	31
Figura 6 – Formação de fiálides de 12 horas a 15°C após a inoculação a partir da inoculação de esporos de <i>Cladosporium</i> e formação de novos esporos a partir delas (A) e elevação da superfície das folhas infectadas com possível início de formação de estromas (B).....	32
Figura 7 – Desenvolvimento do <i>Cladosporium</i> na superfície de folhas de seringueira em microscópio eletrônico de varredura, com 24, 48 e 72 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas.....	34
Figura 8 – Reprodução intensa do fungo na superfície de folhas de seringueira 72 horas após a inoculação a 20°C (A) e colonização e reprodução na folha pelo fungo abaixo da crosta negra (B).	35
Figura 9 – Desenvolvimento dos ascósporos na superfície de folhas de seringueira em microscópio eletrônico de varredura, com 4, 6 e 12 horas de período de molhamento submetidos diferentes temperaturas.....	37
Figura 10 – Desenvolvimento dos ascósporos na superfície de folhas de seringueira em microscópio eletrônico de varredura, com 24, 48 e 72 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas.....	38
Figura 11 – Manchas similares a crosta negra, com características circulares, após 4 horas de período de molhamento submetidos as temperaturas de 25 °C.....	39
Figura 12 – Observação da formação de conídios 24 horas após a inoculação a a 20°C na superfície de folha de seringueira inoculadas com ascósporos (A e B).	40
Figura 13 – Observação de ascósporos 48 horas após a inoculação a 20°C na superfície de folha de seringueira inoculadas (A e B).	41

Figura 14 – (A) Desenvolvimento de esporos assexuados na superfície de folhas de seringueira em UV a 25 °C submetidos a diferentes períodos de molhamento (B) Desenvolvimento de esporos sexuados na superfície de folhas de seringueira em UV a 25 °C submetidos a diferentes períodos de molhamento.....	42
Figura 15 – Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas sob período de molhamento de 72 horas após a inoculação.....	44
Figura 16 – Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas na temperatura de 25 °C.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas por esporos sexuais sob diferentes condições ambientais443

Tabela 2 – Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas por esporos assexuais sob diferentes condições ambientais43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BDA	Batata-dextrose-ágar
g	Gramas
M	Molar
MEV	Microscópio de Varredura
mL	Mililitros
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
USD	Dólares
UV	Ultravioleta
UR	Umidade Relativa
Vol	Volume
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivo específico	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	Produção de látex	19
3.2	A seringueira.....	20
3.3	Ocorrência da crosta negra	20
3.4	Sintomas da crosta negra	21
3.5	Etiologia da crosta negra: <i>P. huberie</i> e <i>R. heveae</i>	22
3.6	Ambiente e patógeno.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	Obtenção de esporos sexuais e isolamento da fase sexual de <i>R. heveae</i>	25
4.2	Avaliação do desenvolvimento de <i>R. heveae</i> em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas e períodos de molhamento.	27
4.2.1.	Preparação e avaliação de amostras em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	28
4.2.2	Preparação e avaliação de amostras em microscopia de luz ultravioleta (UV).....	28
4.3	Análise de dados	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Avaliação da penetração e desenvolvimento de <i>R. heveae</i> na forma assexuada (<i>Cladosporium</i>) em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas em MEV.....	30

5.2	Avaliação da penetração e desenvolvimento de <i>R. heveae</i> na forma sexuada (ascósporos) em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas em MEV.....	36
5.3	Avaliação de amostras em microscopia de luz ultravioleta (UV)	42
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é nativa da região amazônica, pertence à família Euphorbiaceae. Esta planta tem grande importância econômica devido ao látex, fonte para a produção de borracha natural (ALVARENGA; CARMO, 2008). Em relação à produção mundial de borracha natural, a região da Ásia-Pacífico produz 91,2%, a África 6,8% e América Central e América do Sul produzem 2,0% (IRSG, 2019). A produção brasileira de borracha natural produz apenas um terço da demanda nacional pelo produto, existindo a necessidade de importação, resultando em reflexos negativos na balança comercial do país (SIERRA-HAYER, 2014).

No Brasil, a seringueira é cultivada em 17 estados, que compreende a região Norte até o norte do Estado do Paraná (GASPAROTTO *et al.*, 2012). No ano de 2021, o Brasil produziu 399.751 toneladas de borracha, com 176.373 hectares de área colhida e o valor de produção foi de R\$ 1.495.091,00 sendo o estado de São Paulo o maior produtor (IBGE, 2021).

Os problemas fitossanitários são um fator limitante para o cultivo da seringueira no Brasil. Dentre as doenças foliares de maior importância da seringueira situa-se o mal-das-folhas, a antracnose, o oídio e a mancha areolada, causadas por *Pseudocercospora*, *Colletotrichum* ssp., *Oidium heveae* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente (FURTADO *et al.*, 2016).

A crosta negra também é uma doença que causa danos as folhas de seringueira, no entanto sempre foi considerada de pouca importância (GASPAROTTO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2016). Porém, com a expansão dos seringais para diversas regiões com diferentes condições ambientais, a ocorrência da crosta negra cresceu passando a causar prejuízos em razão à queda precoce das folhas (GONÇALVES; GOES, 2017).

Pesquisas envolvendo o clone IAN717 com sete anos de idade, na região de Manaus (AM), mostram que a crosta negra completa seu ciclo de dois a três meses após a troca de folhas da planta e que ela também pode provocar uma desfolha em épocas chuvosas, o que leva a planta a emitir novas folhas em épocas com condições favoráveis para o desenvolvimento de outras doenças como o mal-das-folhas e antracnose (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

Esta doença pode ser provocada por dois fungos que podem ocorrer de forma isolada ou em conjunto. O primeiro a fungo a ser associado à crosta negra na cultura

da seringueira foi *Phyllachora huberi* em 1899 na região amazônica. Em 1990 *Rosenscheldiella heveae*, foi associado a esta mesma doença, porém neste caso foi encontrado sua possível forma assexuada, *Cladosporium* (JUNQUEIRA; BEZERRA, 1990; GONÇALVES; GOES, 2017).

Sabendo que o ambiente tem influência sobre o desenvolvimento de qualquer doença e devido a escassez de trabalhos na literatura sobre as condições ambientais que favorecem a infecção e o desenvolvimento da crosta negra, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e período de molhamento na germinação, penetração, colonização e reprodução de *R. heveae* em folíolos de seringueira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da temperatura e período de molhamento no desenvolvimento de *R. heveae*, na sua forma sexuada e assexuada, *Cladosporium*, em folíolos de seringueira.

2.2 Objetivo específico

Analisar, por meio de diferentes técnicas de microscopia, as etapas da germinação, penetração, colonização e reprodução de *R. heveae*, na sua forma sexuada e assexuada, em folíolos de seringueira do clone RRIM600, sob efeito de diferentes temperaturas e períodos de molhamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de látex

A previsão é que o mercado global de borracha natural alcance USD 33,87 bilhões até 2027, segundo o relatório da Reports and Data (REPORTS AND DATA, 2020). Os países asiáticos são responsáveis por grande parte da produção mundial, que corresponde a 83%, do total produzido, sendo Tailândia, Indonésia e Malásia os principais produtores mundiais de borracha natural (BLAGODATSKY *et al.*, 2016).

A seringueira possui grande importância econômica como matéria-prima para a produção e extração de borracha natural (FURTADO; GASPAROTTO; PEREIRA, 2016). Ela é derivada da coagulação do látex, um composto coloidal constituído por partículas de borracha (30-40%) e meio aquoso (60-70%) (HWEE, 2014). O meio aquoso é formado por compostos inorgânicos, proteínas, carboidratos solúveis, ácidos orgânicos, aminoácidos, bases nitrogenadas e organelas (JACOB *et al.*, 1993).

O látex da seringueira é o conteúdo citoplasmático de células vegetais altamente especializadas, que são os laticíferos (HABIB; ISMAIL, 2021). Em *H. brasiliensis*, os laticíferos agem como dutos no vaso do floema e são a área primária para a síntese de borracha (HABIB; ISMAIL, 2021). Diversas substâncias presente no látex podem ser tóxicos para herbívoros e os insetos podem ficar presos nessa substância, o que pode conferir como um mecanismo de defesa para a planta, ele também fecha as feridas da árvore, o que evita a infecção por patógenos (KONNO, 2011).

A demanda por borracha seca natural é elevada em todo mundo, por ser de origem de fonte renovável além de possuir grande área de aplicação, como em produtos cirurgicos, produção de pneus e entre outros (SILVA *et al.*, 2021). Sua estrutura possui diversos atributos, como alta resiliência, elasticidade, resistência à abrasão e ao impacto, alta resistência a ruptura e menor aquecimento interno por esforço mecânico, essas características não podem ser alcançados em polímeros formados artificialmente a partir de combustíveis fósseis (FURTADO; GASPAROTTO; PEREIRA, 2016).

3.2 A seringueira

Apesar da Amazônia ser o centro de origem da seringueira, a cultura apresenta elevada adaptabilidade a diversos ambientes (BEVENUTO *et al.*, 2021). No início dos anos de 1900 ela foi introduzida no Sri Lanka, Singapura e Malásia (GASPAROTTO *et al.*, 2012). O clima desses territórios é muito parecido ao da região amazônica no Brasil, mas as doenças presente na América Latina está ausente nos países asiáticos, resultando em alta produtividade nessa região (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

A seringueira ocorre entre as latitudes de 3° Norte e 15° Sul do continente americano. Comercialmente, as áreas de produção abragem as latitudes de 24° Norte na China até 25° Sul no litoral do estado de São Paulo e norte do Paraná (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

No gênero *Hevea* as espécies conhecidas são: *H. brasiliensis*, *H. guianensis*, *H. benthamiana*, *H. nítida*, *H. rigidifolia*, *H. camporum*, *H. sipruceana*, *H. microphylla*, *H. camargoana*, *H. paludosa* e *H. pauciflora* (SECCO, 2008). Destas, a de maior importância econômica é a *H. brasiliensis*, por possuir maior capacidade produtiva e variabilidade genética de resistência ao *P. cercospora* (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

A partir do terceiro ano de idade, a seringueira passa por um período de senescência (amarelecimento) e queda das folhas, seguida de um novo enfolhamento após duas a seis semanas (GASPAROTTO *et al.*, 2012). A senescência ocorre no início da estação da seca, a duração, intensidade e velocidade da senescência muda de acordo com a espécie e com o clone (FURTADO, 1996).

O período de reenfolhamento dos seringais, é o momento mais importante para a fitopatologia, já que que nessa fase a cultura apresenta folíolos de coloração antociânica intensa, em que ocorre a maior parte dos ataques das doenças foliares (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

3.3 Ocorrência da crosta negra

Essa doença já foi identificada na Venezuela, Trinidad, Colômbia, Bolívia, Peru e Suriname (STERLING; RODRIGUEZ, 2018). No Brasil, ocorre no Acre,

Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso (GASPAROTTO *et al.*, 2012). No entanto, em 2011 a crosta negra foi relatada em São Paulo, na Região de Tupã. Em seguida, no ano de 2012, ela foi identificada na região de Votuporanga e em 2017, diversas áreas, em diferentes regiões foram atacadas pela doença (GONÇALVES E GOES, 2017). Em 2017 foram relatados casos em: Palestina, Olímpia, Barretos, Colômbia, Colina, Guaraci, Guaíra, São José do Rio Preto, Paulo de Faria, Tanabi, Bebedouro, Bálsamo, José Bonifácio, Ipiguá, Mirassolândia, Mendonça (GONÇALVES E GOES, 2017). O aumento da incidência da crosta negra em seringais comerciais também vem sendo relatado em outros países, como na Colômbia, em especial na região de Caquetá (STERLING; RODRIGUEZ, 2018).

O desenvolvimento da doença e do patógeno está diretamente ligado à fenologia da seringueira, afetando a folhagem madura (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

Antes da expansão do plantio de seringueiras, a queda das folhas com sintomas de crosta negra, no período após o reeenfolhamento, era associada a senescência natural da planta, descartando a relação com o patógeno (GASPAROTTO *et al.*, 2012). Porém, após a década de 1980, com a ampliação do cultivo da seringueira, explorando diferentes condições ecológicas, o fungo se disseminou e os sintomas observados no campo se tornaram mais frequentes (GASPAROTTO *et al.*, 2012).

3.4 Sintomas da crosta negra

As infecções de *P. huberi* e *R. heveae* acontecem em folíolos jovens, porém a doença se desenvolve de forma lenta, assim seus sintomas são observados em folhas com mais de um mês de idade (GASPAROTO *et al.*, 2012).

Os sintomas na face adaxial ou superior do limbo da folha são áreas amareladas e manchas necróticas que correspondem as placas circulares negras na parte abaxial ou inferior da folha, coincidente com as incrustações estromáticas do fungo, sendo estes os sintomas e sinais característicos desta doença (GASPAROTO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2016).

No período de desfolha, o fungo sobrevive como estroma (massa de hifas de aspecto firme, pode ter ou não a presença de tecido hospedeiro, com o objetivo de abrigar ou dar origem as estruturas reprodutivas) nas folhas que caem no chão. Os estromas por sua vez dão origem aos ascósporos, que se tornam a principal fonte

de inoculação para o microorganismo começar o ciclo novamente nas folhas recém-formadas (MASSOLA JÚNIOR, 2019; GASPAROTO *et al.*, 2012).

A presença de crosta negra em seringueira também facilita a entrada de outros patógenos como *Colletotrichum*, já que com o decorrer do tempo, as placas negras ressecam, ocasionando a ruptura do tecido foliar (PEARCE *et al.*, 1999; GASPAROTO *et al.*, 2012), agravando desta maneira a situação sanitária da cultura.

3.5 Etiologia da crosta negra: *P. huberi* e *R. heveae*

O fungo *P. huberi* pertence a família Phyllachoraceae composta por fungos biotróficos (PEARCE *et al.*, 1999). O número de gêneros reconhecidos nessa família é muito discutido, sendo que atualmente, Phyllachoraceae contém 59 gêneros (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2015, MARDONES *et al.*, 2017). Esse fungo pertence a ordem Phyllachorales, este grupo possui peritécios de parede fina, que ficam imersos no tecido do hospedeiro e unidos sob placas estromática, normalmente negra, achatada, nomeada clipeo (MASSOLA JÚNIOR, 2019). As espécies de fungos que compreendem a esta família foram documentadas a partir do isolamento de uma variedade de espécies de plantas e pressupõe que estes isolados sejam hospedeiros específicos (CANNON 1997; PEARCE *et al.*, 1999; PEARCE *et al.*, 2000). Atualmente, *Phyllachora* é reconhecido como o maior gênero desta família, com cerca de 1500 epítetos de espécies (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2015; INDEX FUNGORUM, 2016). Várias espécies de *Phyllachora* recebeu nomes a partir da associação de hospedeiros e isso pode não refletir o número efetivo de espécies. Além disso, a maior parte dos estudos que foram realizados para identificação das espécies deste gênero foram embasada em dados morfológicos, o que pode ter levado a alguma confusão taxonômica, assim muitos dos grupos de espécies são polifiléticas (SANTOS *et al.*, 2016).

As espécies de *Phyllachora* por terem sido identificadas com base na morfologia, como consequência acabou gerando escassas informações genéticas sobre este fungo, o que levou a existência poucas sequências presentes no GenBank para estudos comparativos, sendo que a maior parte das espécies estudadas possuem apenas dados da região ITS (DAYARATHNE *et al.*, 2017). A região ITS está posicionada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA e é possível ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS; DIXON, 1991).

Enquanto as regiões dos genes ribossomais são muito conservadas dentro da espécie, já as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rápido, pode ter uma variação intraespecífica na sequência de bases e no comprimento (MENEZES *et al.*, 2010), sendo assim muito usadas para taxonomia de espécies e gêneros (GOMES *et al.*, 2002). Isso revela a instabilidade taxonômica ainda presente na família Phyllachoraceae.

A espécie de fungo *R. heveae* pertence ao gênero *Rosenscheldiella* que é membro da família Mycosphaerellaceae e pertence a ordem Capnodiales (MASSOLA JÚNIOR, 2019; WIJAYAWARDENE *et al.*, 2014).

No Brasil, o patógeno de maior relevância na família Mycosphaerellaceae, é o *Pseudocercospora*, agente causal do mal-das-folhas em seringueira (MASSOLA JÚNIOR, 2019). Os integrantes desta família tem a capacidade de colonizar vários nichos e variam no estilo de vida, podendo ser de patógenos a endófitos, sapróbios e epífitas (VIDEIRA *et al.*, 2017). Com o objetivo de facilitar invasão no hospedeiro, algumas espécies de fungos dessa família são conhecidas por produzir toxinas, que suprimem as respostas de defesa do hospedeiro, facilitando seu desenvolvimento biotrófico (BRADSHAW; ZHANG, 2006; CHEN *et al.*, 2007; De WIT 2016).

Bem como o família Phyllachoraceae, a família Mycosphaerellaceae tem grupos polifiléticos, uma vez que a identificação dos indivíduos era baseada em conhecimentos morfológicos. Esses fungos compõem um grupo heterogêneo muito grande para os quais os trabalhos existentes precisam ser revisados e as espécies redefinidas se necessário (BRAUN *et al.*, 2015; VIDEIRA *et al.*, 2017), assim como o fungo *R. heveae*, que foi caracterizado no Brasil 30 anos atrás associado a crosta negra (JUNQUEIRA; BEZERRA, 1990). Com base no levantamento realizado de espécies de fungos associados a crosta negra de seringueira no estado de São Paulo entre os anos de 2021 a 2022, *R. heveae* vem predominando, principalmente sua forma assexuada, *Cladosporium* sp. (GOMES, 2023).

3.6 Ambiente e patógeno

O surgimento e evolução de uma doença são produtos da interação entre planta suscetível, patógeno e ambiente favorável (VELÁSQUEZ; CASTROVERDE; YANG HE, 2018). Porém, desses três fatores, apenas o ambiente possui alterações constantes no decorrer do ciclo de uma cultura, isso porque a agressividade do

patógeno e a suscetibilidade do hospedeiro variam muito pouco nesse pequeno espaço de tempo (BEDENDO; AMORIM; MATTOS JÚNIOR, 2019).

Para cada patógeno existe uma condição ambiental ótima para o seu crescimento e reprodução, quanto mais as condições ambientais desviarem do “ótimo para o patógeno”, menor serão os sintomas da doença na planta (VELÁSQUEZ; CASTROVERDE; YANG HE, 2018).

A umidade possui um papel importante sobre os diversos agentes infecciosos que afetam as plantas. Na forma de chuva, orvalho ou irrigação, a água modifica a umidade do ar e solo, podendo favorecer ou prejudicar o desenvolvimento de fungos, bactérias e nematoides (BEDENDO; AMORIM; MATTOS JÚNIOR, 2019). A água, em forma de orvalho é fundamental no processo de infecção, ela é indispensável na germinação e penetração da maioria dos esporos de fungos (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Grande parte dos patógenos de clima tropical e subtropical tem a capacidade de se desenvolver em um amplo espectro de temperatura, porém, temperaturas muito elevadas podem ocasionar o dessecamento de células bacterianas e estruturas fúngicas na fonte de inóculo (BEDENDO; AMORIM; MATTOS JÚNIOR, 2019). Além disso, para os fitopatógenos existe uma temperatura máxima e mínima, no qual conseguem sobreviver, porém são incapazes de se desenvolver (VALE; ZAMBOLIM, 1996). Dessa forma, certas doenças são mais severas em baixas temperaturas e outras em altas temperaturas, ainda que o agente causal consiga se desenvolver com uma ampla faixa de temperatura (ESCANFERLA, 2007). Por esse motivo, tanto a temperatura como outros fatores ambientais, podem agir sobre o patógeno ou sobre o hospedeiro, ou na interação patógeno-hospedeiro (ESCANFERLA, 2007).

Trabalhos referentes à influência do ambiente em relação ao *Pseudocercospora* contribuíram com o zoneamento climático para a implantação da cultura da seringueira no Brasil com o objetivo de fugir das condições propícias para ocorrência do mal-das-folhas, o que contribuiu para a região sudeste se destacar na implantação de seringais e produção de borracha natural (PINHEIRO *et al.*, 2002; GASPAROTTO *et al.*, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de esporos sexuados e isolamento da fase sexuada de *R. heveae*

Foi utilizado esporos de *R. heveae*, na sua forma sexuada e assexuada (que corresponde ao fungo *Cladosporium* sp.) (JUNQUEIRA; BEZERRA, 1990, GOMES, 2023).

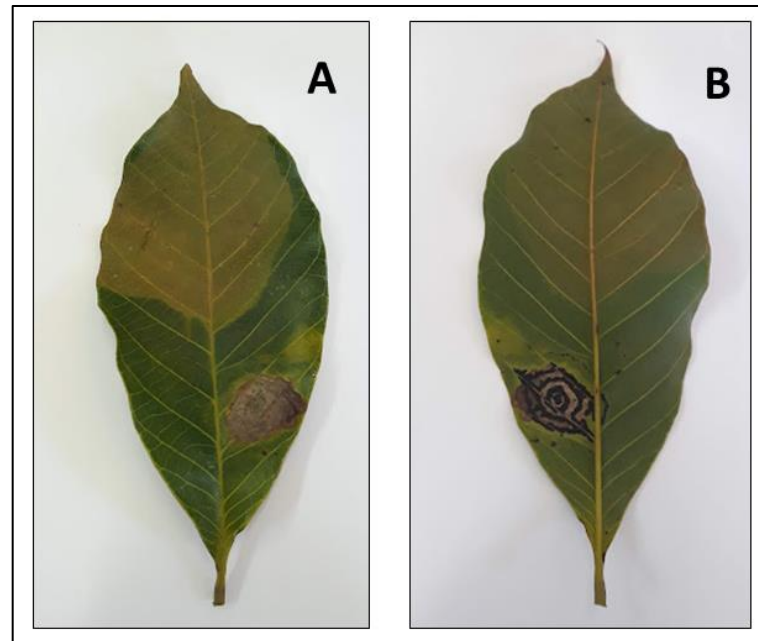
Os materiais foliares utilizados foram provenientes do clone de seringueira RRIM 600, coletadas em um plantio comercial, localizado na cidade de Campina Verde - MG, com sintomas e estromas típicos do fungo. Um estudo prévio indica que neste local foi encontrada a espécie *R. heveae*, e que sua forma assexuada corresponde a *C. cladosporioides* (Gomes, 2023).

Para a obtenção de esporos sexuados (ascósporos) e isolamento da fase assexuada do fungo *R. heveae* (*Cladosporium* sp.) foi realizada a metodologia descrita por Junqueira e Bezerra (1990) e Gasparotto *et al.* (2012). Para isso, folhas de seringueira contendo sintomas de crosta negra (Figura 1), foram desinfestadas superficialmente, pela submersão por um minuto em álcool (70%), seguido da submersão por 2 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2%), lavados em água autoclavada estéril e secos em papel toalha estéril no interior de câmara de fluxo laminar. Após estas etapas, as folhas desinfestadas foram colocadas em câmara úmida formada em placas de Petri e colocadas a 15 °C por 12 horas. Após este período, devido as condições ambientais fornecidas, os estromas liberam os ascósporos, sob a forma de microgotículas (Figura 2), sendo estas coletadas com o auxílio de uma agulha (sob condições assépticas) e depositadas em 1mL de água destilada esterilizada contendo clorafenicol a 50ppm. Posteriormente, a suspensão do fungo obtida foi usada de duas formas. A primeira, para montagem do experimento para verificar a germinação, penetração, colonização e reprodução do fungo nesta fase sob diferentes condições ambientais.

A segunda forma de uso desta suspensão foi para isolamento da forma assexuada do fungo em meio de cultura. Para isso parte da suspensão obtida foi distribuída em placas contendo meio de cultura BDA (Difco ®), e posteriormente foram incubadas a 24 °C, sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e escuro. Estes fungos são de crescimento lento e começam a se desenvolver na placa cerca de 8 dias após os procedimentos descritos (Figura 3). Neste caso, as colônias

obtidas, foram armazenados em ultra freezer a -80 °C para a manutenção do fungo se necessário.

Figura 1: Sintomas de crosta negra em folhas de seringueira, na face adaxial (A) e abaxial (B)



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 2: Ascósporos de *R. heveae* liberados pelo estroma que foram coletados para obtenção dos isolados.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 3: Colônias assexuada de *R. heveae* em meio de cultura BDA.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

4.2 Avaliação do desenvolvimento de *R. heveae* em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas e períodos de molhamento.

Folíolos destacados de seringueira dos clones RIMM 600, mantidas em casa de vegetação em vasos com idade um ano e previamente desinfestados superficialmente, foram inoculados com alíquotas contendo 30 μL de suspensão de esporos (10^5 conídios. mL^{-1}) (Figura 4). A área inoculada foi demarcada com auxílio de adesivos plásticos. Como controle foram utilizados folíolos inoculados somente com água destilada autoclavada. Os experimentos realizados com esporos sexuais e assexuais foram montados separadamente.

Figura 4: Inoculação dos folíolos de seringueira com a suspensão de esporos



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Após a inoculação dos esporos, os folíolos foram mantidos em câmara úmida a 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40±1 °C no escuro. Amostras circulares, com 5 mm de diâmetro, foram obtidas das áreas inoculadas em intervalos de tempo pré-determinados (4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) e fixadas em solução de “Karnovsky” (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2).

4.2.1. Preparação e avaliação de amostras em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

O desenvolvimento do fungo em diferentes clones de folha de seringueira foi avaliado a partir de fragmentos foliares de aproximadamente 5 mm de diâmetro, coletados de cada clone e fixados em “Karnovsky” (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0% e tampão fosfato 0,05 M pH 7,2). por um período mínimo de 24 horas. Em seguida, as amostras foram retiradas do fixador, fragmentadas e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo tampão fosfato de sódio 0,05M por dez minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série crescente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos cada e secas em aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030). Após a secagem das amostras, as mesmas foram processadas conforme metodologia descrita por Firmino *et al.* (2022). Foram montados em stubs com fita dupla face de carbono e recobertos com ouro 20nm em aparelho Bal-Tec SCD 050 sputter coater, para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) LEO435-VP, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil.

4.2.2 Preparação e avaliação de amostras em microscopia de luz ultravioleta (UV)

Para complementar o estudo, foi observado a colonização e reprodução do fungo na parte interna da folha através da técnica de luz ultravioleta, em microscópio de luz, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

Ao final de cada intervalo de tempo predeterminado, amostras circulares de folhas que foram expostas a 25 °C (temperatura escolhida por proporcionar o melhor

desenvolvimento fúngico) foram coletadas e processadas de acordo com a metodologia descrita por Celio e Hausbeck (1997), modificada. Os discos de folha foram fixados, colocando-os em papel de filtro saturado com solução de formalina / álcool / ácido acético (1: 18: 1 vol / vol / vol) em uma placa de Petri de plástico selada com Parafilme por 2 horas. Após este período os discos foram clarificados por 42 a 48 horas em uma solução que consiste em hidrato de cloral (200 g), H₂O (80 mL), etanol (250 mL) e quatro gotas de Tween- 20. A coloração em solução de lactofenol azul de algodão, foi substituído por Calcofluor White (Sigma®). Este reagente (aproximadamente 50 µL) foi colocado sobre as amostras que, após um minuto, foram lavadas em água destilada (duas vezes por 30 segundos) e montadas em água destilada para observação em microscópio de luz.

4.3. Análise de dados

Para as imagens captadas em MEV, foi adotada uma metodologia descritiva, baseada na observação do desenvolvimento do fungo nas diferentes temperaturas e períodos de molhamento. A avaliação quantitativa da colonização e reprodução fúngica, com base nas estruturas produzidas pelo fungo (micélio e esporos) na parte interna da folha, foi realizada com o software Basic Intensity Quantification with ImageJ (LABNO, 2019) no caso de imagens capturadas sob um microscópio ultravioleta. A porcentagem média de área foliar afetada pelo fungo em cada condição ambiental testada foi analisada pelo software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Com base nestas análises foi encontrado o melhor período em que o fungo se desenvolveu e então foi realizada uma análise de regressão para encontrar a faixa de temperatura em que o fungo tem seu maior desenvolvimento, usando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da penetração e desenvolvimento de *R. heveae* na forma assexuada (*Cladosporium*) em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas em MEV

As figuras 5 e 3 mostram o progresso da doença iniciada por *Cladosporium* em diferentes temperaturas até 72 horas depois da inoculação.

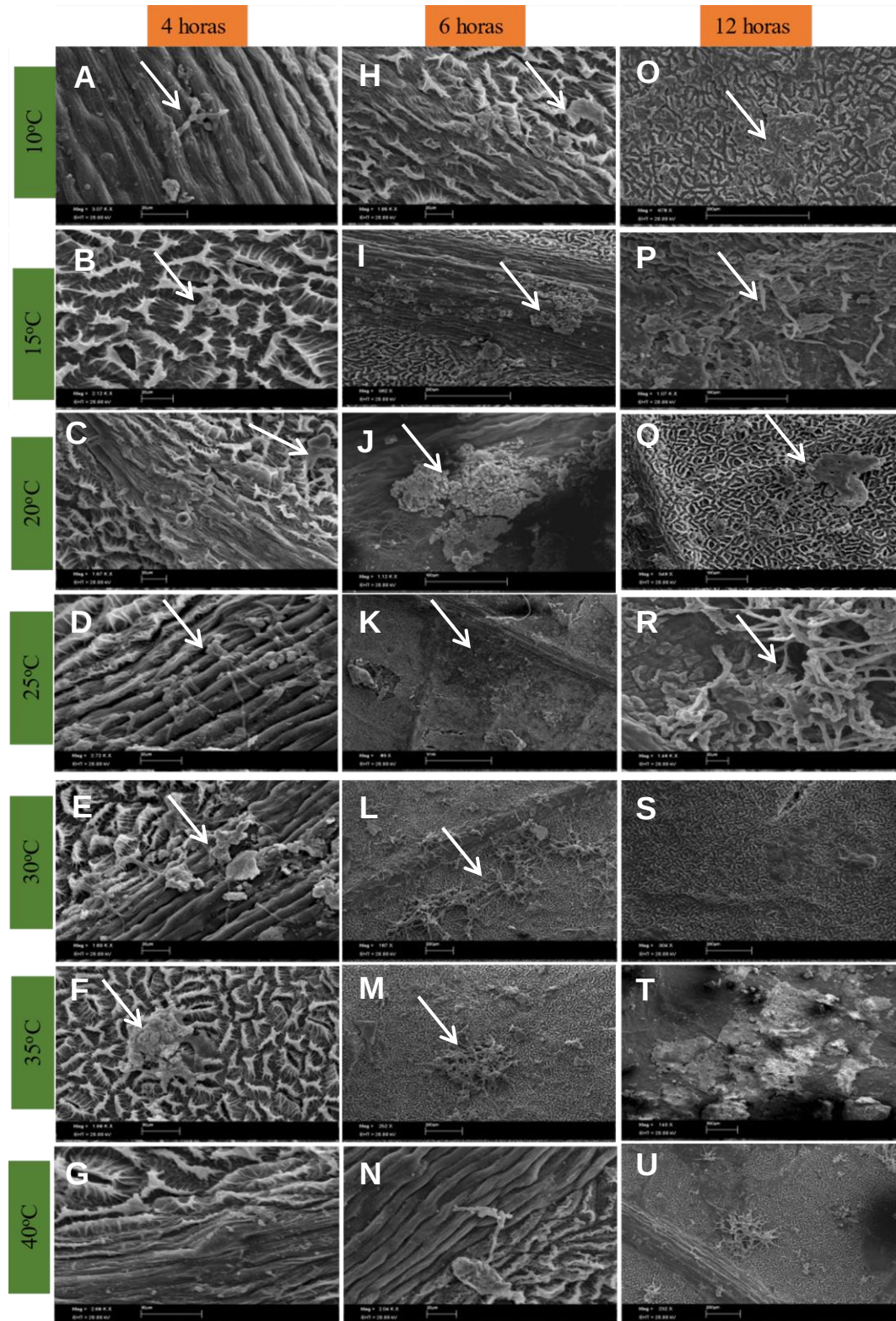
Observou-se que o *Cladosporium* teve um desenvolvimento rápido, pois 4 horas após a inoculação do fungo é possível verificar a germinação e penetração dos conídios nas temperaturas de 10 a 20°C (Figura 5A, 5B e 5C). Nas temperaturas de 25 e 30°C já é visto o desenvolvimento do micélio do fungo e o início da formação de uma crosta sob o ponto de inoculação (Figura 5D e 5E). Este início de crosta também é percebido a 35°C (Figura 5F). Aos 40°C não foi observado nenhuma germinação dos esporos (Figura 5G).

Observando o desenvolvimento do fungo durante os períodos analisados, verifica-se na fase assexuada, nas temperaturas de 10 a 25°C a partir das seis horas ocorre formação de uma crosta que vai ficando mais escura com o passar do tempo (Figura 5H, 5I, 5J e 5K).

Foi possível observar a formação de fiálides a partir de seis horas após a inoculação, indicando que o fungo já está em período reprodutivo (Figura 5P, 5R e 6A). A fiálide é uma célula conidiógena que tem a função de formar os conídios que são esporos assexuais (MASSOLA JÚNIOR, 2019).

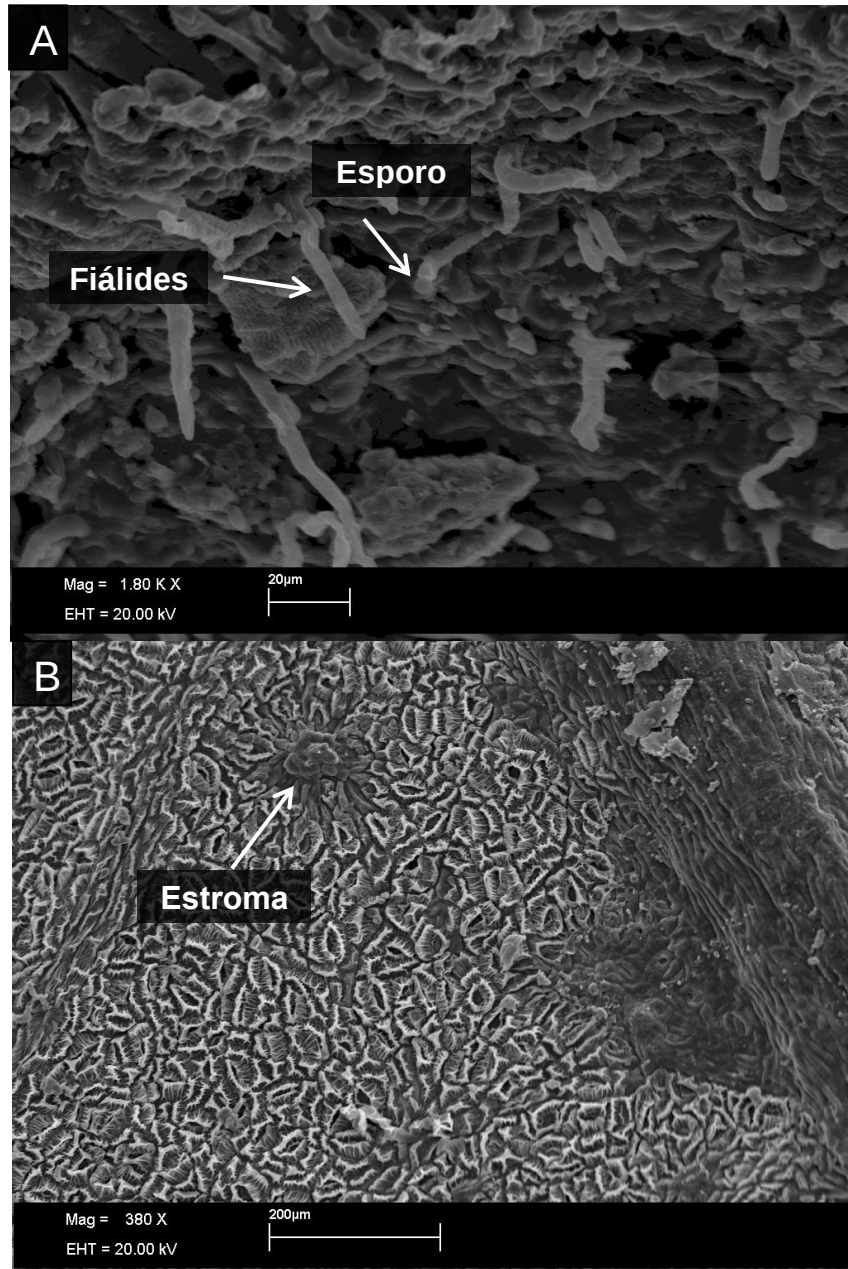
Com a figura 6B, verifica-se a presença do estroma sobre tecido degradado, as células do tecido estromático aparecem bem definidos com a forma arredondada.

Figura 5: Desenvolvimento do *Cladosporium* na superfície de folhas de seringueira em MEV, com 4, 6 e 12 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 6: Formação de fiálides de 12 horas a 15°C após a inoculação a partir da inoculação de esporos de *Cladosporium* e formação de novos esporos a partir delas (A) e elevação da superfície das folhas infectadas com possível início de formação de estromas (B)



Fonte: Elaboração do próprio autor.

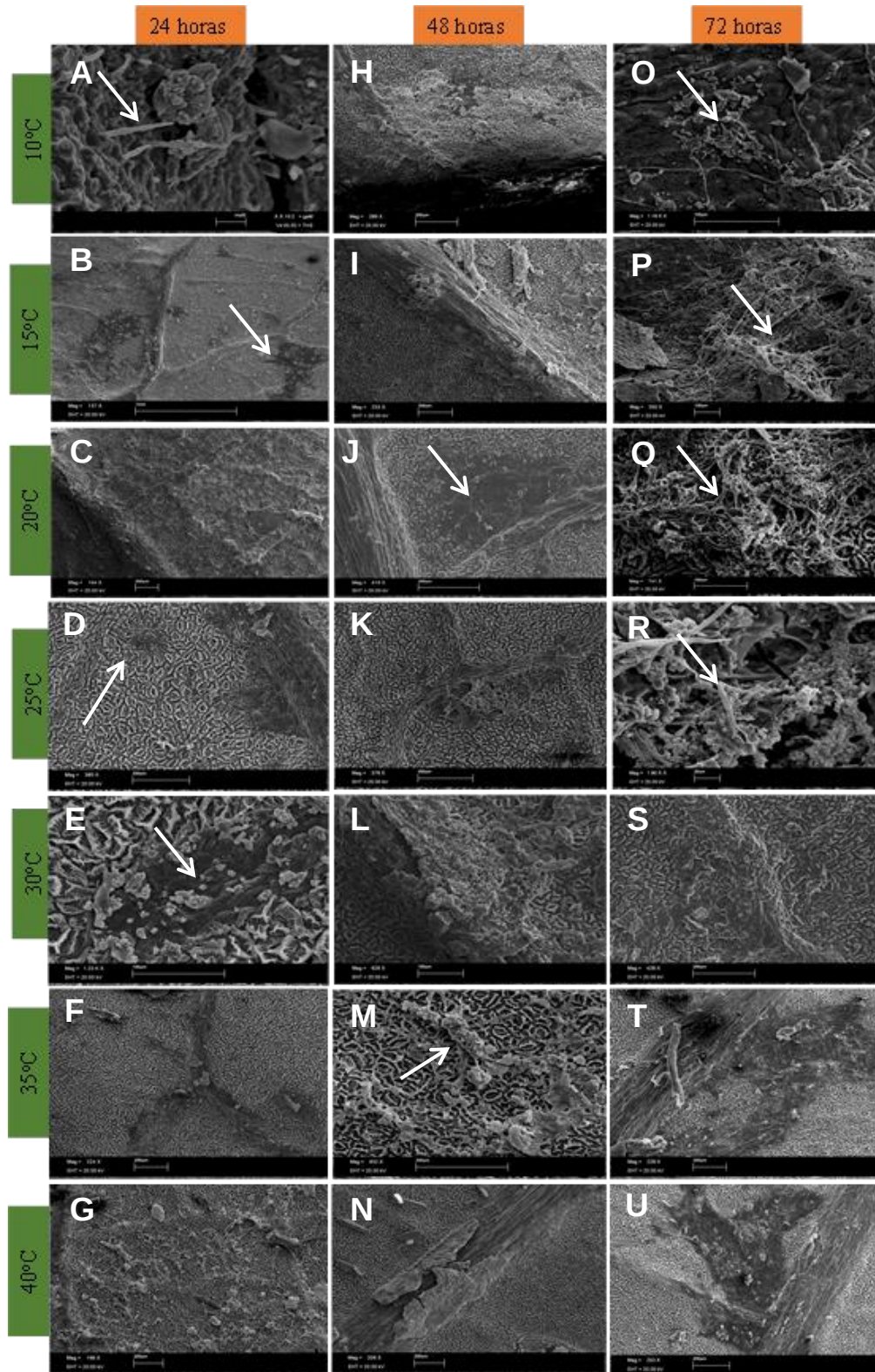
Vinte e quatro horas após a inoculação, na temperatura de 25°C foi possível observar a elevação de alguns pontos escuros, que acredita ser o início da formação dos estromas (Figura 7D). Com a observação das imagens, há indícios de que este fungo tem seu desenvolvimento afetado de modo negativo a 40°C (Figura 7G, 7N e

7U), o que pode explicar a baixa quantidade de crosta negra encontrada em locais em que há seringais e possuem temperaturas medias elevadas.

A formação de novas estruturas como fiálides e esporos é nítida 72 horas após a inoculação (Figura 7O, 7P, 7Q , 7R, 8A e 8B), o que pode indicar que o período de molhamento também tem influencia no desenvolvimento de *R. heveae* na fase assexuada. Sabendo-se que *Colletotrichum* de seringueira tem bom desenvolvimento nas faixas de temperatura estudas e que seu desenvolvimento é diretamente proporcional ao período de molhamento da folha (MAGALHAES *et al.*, 2021), fica mais clara a importância de monitoramento da ocorrência da crosta negra no campo, pois como já foi comentado, suas lesões servem de aberturas para a entrada do *Colletotrichum*, o que pode agravar a situação sanitária da cultura e dificultar o controle destas doenças.

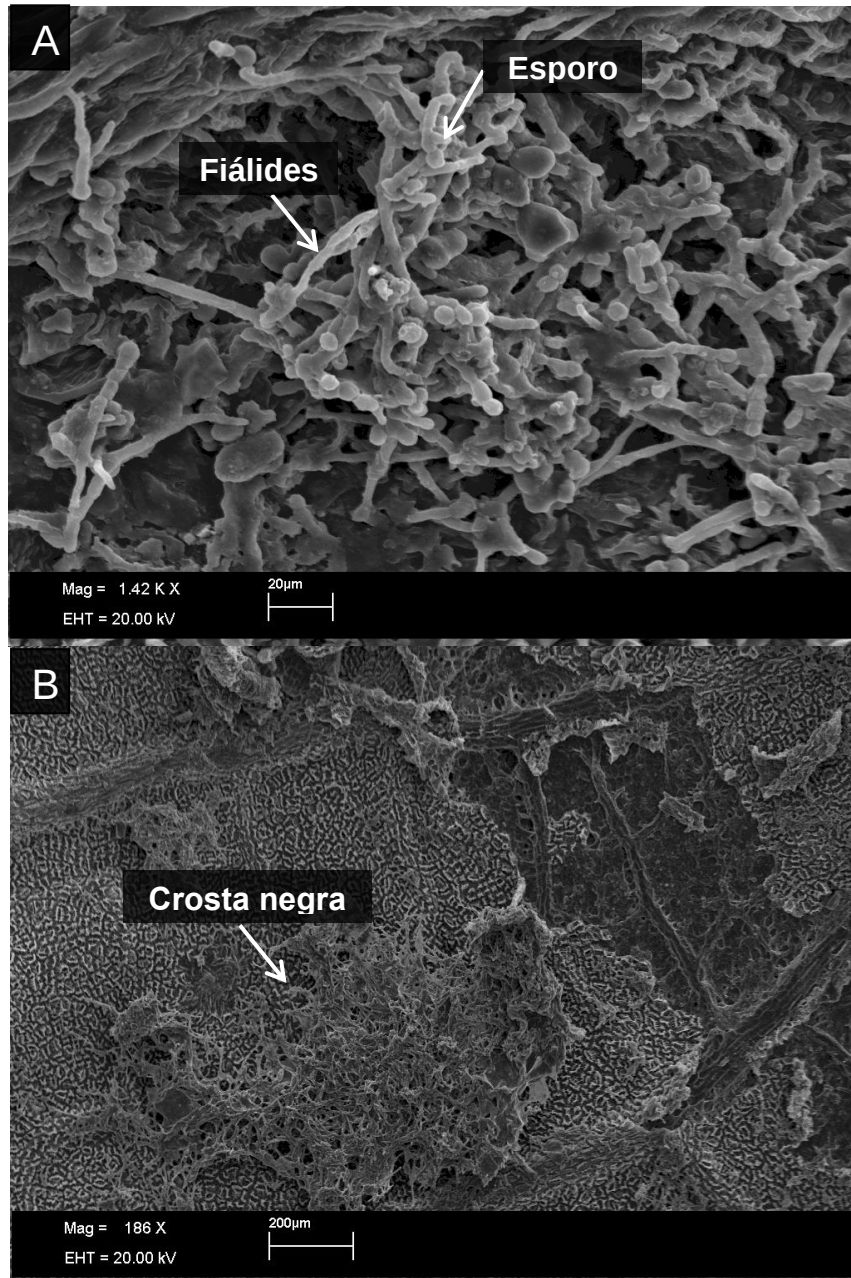
Nas temperaturas entre 30 a 40°C o fungo vai diminuindo seu desenvolvimento, apesar de se observar a formação de placas escuras nos pontos de inoculação (Figura 7S, 7T e 7U). Dessa forma, observando de forma mais ampla, entende-se que haverá dificuldade na elaboração de sistemas de previsão de doenças baseados apenas na variável temperatura (MORAES, 2009).

Figura 7: Desenvolvimento de *Cladosporium* na superfície de folhas de seringueira em MEV, com 24, 48 e 72 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 8: Reprodução intensa do fungo na superfície de folhas de seringueira 72 horas após a inoculação a 20°C (A) e colonização e reprodução na folha pelo fungo abaixo da crosta negra (B)



Fonte: Elaboração do próprio autor.

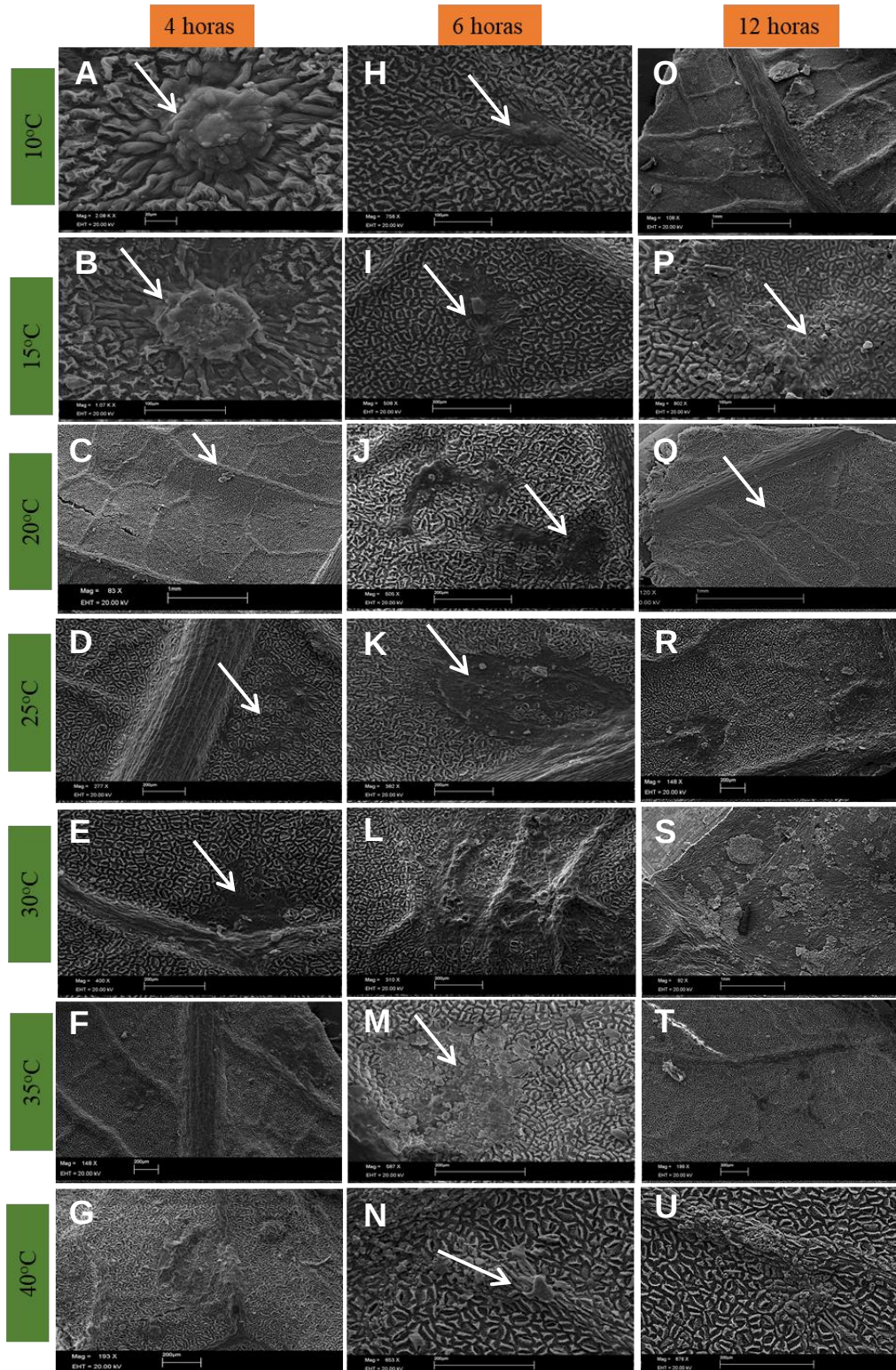
5.2 Avaliação da penetração e desenvolvimento de *R. heveae* na forma sexuada (ascósporos) em folíolos de seringueira sob influência de diferentes temperaturas em MEV

Nos folíolos que foram inoculados com os ascósporos, ou seja, com a forma sexuada do fungo, a partir de quatro horas após a inoculação, foi possível verificar a formação de pequenas protuberâncias, que devem ser o início da formação dos estromas, nas temperaturas entre 10 a 20°C (Figuras 9A, 9B e 9C). As células do tecido estromático encontram-se bem definidas, com a forma arredondada semelhantes aos estromas observados no desenvolvimento de *Pseudocercospora* em folhas de seringueira (SAMBUGARO, 2003).

Ainda dentro do período a partir das quatro horas após a inoculação, é importante ressaltar que nas temperaturas entre 25 a 30 °C, já foi possível observar o desenvolvimento de manchas similares a crosta negra (Figura 9D), inclusive com características circulares e com início de formação de estromas, como é observado no campo. Estas formações de crostas circulares vão se tornando mais frequentes e maiores em área com o decorrer do tempo (Figura 11A e 11B). Na temperatura de 40°C o fungo tem um desenvolvimento mais lento, independente do período analisado (Figura 9N).

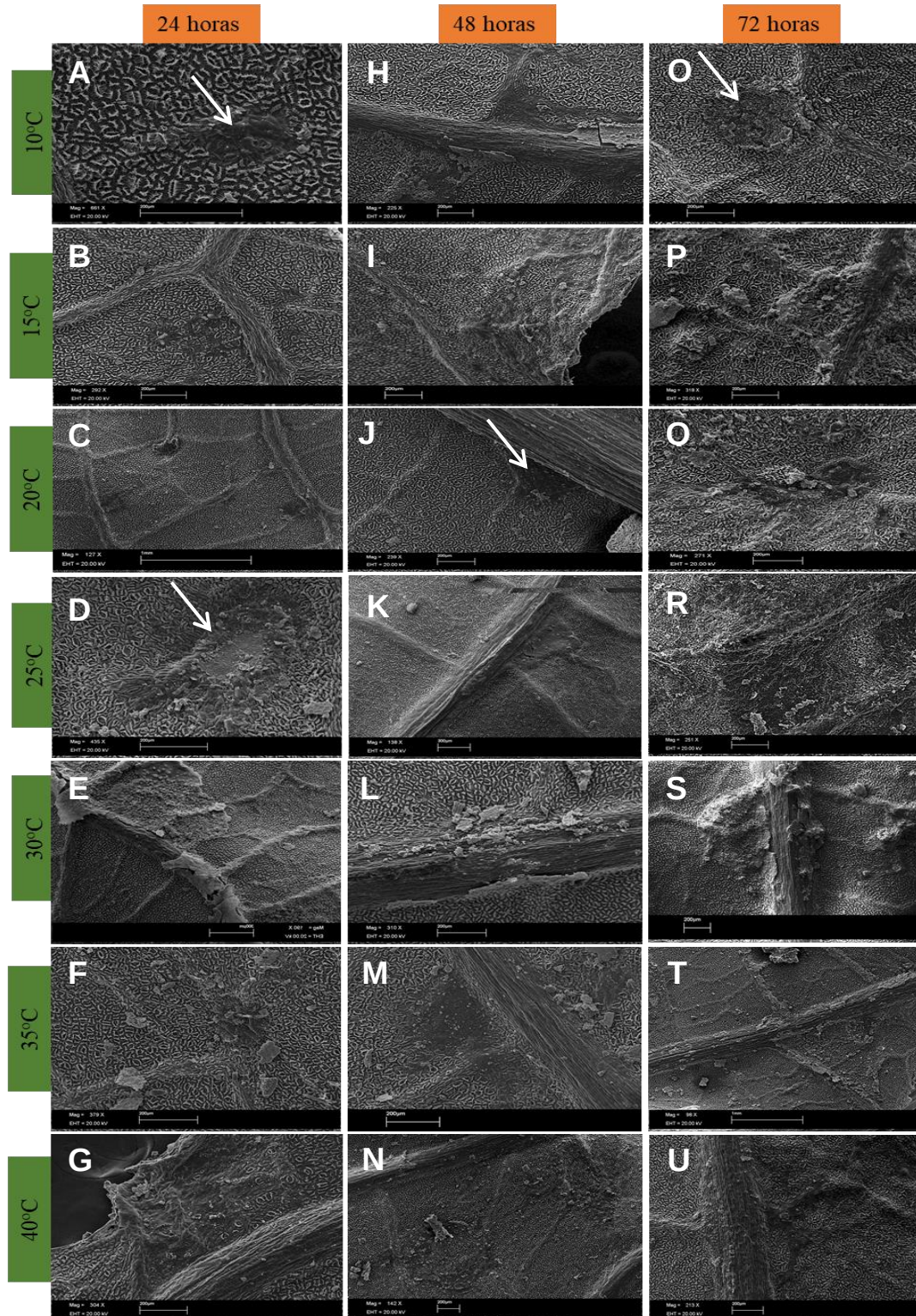
No presente estudo a partir de seis horas após a inoculação, observou-se o início da formação de esporos e micélios sobre os estromas, que continuam se desenvolvendo no decorrer dos períodos avaliados, principalmente nas temperaturas de 20 a 30°C (Figura 12A e 12B). Nesta esporulação são encontrados conídios parecidos com *Cladosporium* com mais intensidade. Os ascósporos são visualizados com mais frequência a partir das 48 horas após a inoculação (Figura 10J, 13A e 13B). Esse comportamento assemelha-se ao que Gasparotto *et al.* (2012) descreve para *Pseudocercospora ulei*, os estromas formados no primeiro estágio, acomodam depressões espermáticas, parecidas a picnídios, conforme ocorre o avanço do desenvolvimento fungico, completando a ascogênese, maturação dos ascósporos. Esta semelhança no comportamento destes dois fungos, pode ser explicado pelo fato destes, pertencerem a mesma família, Mycosphaerellaceae.

Figura 9: Desenvolvimento dos ascósporos na superfície de folhas de seringueira em MEV com 4, 6 e 12 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas



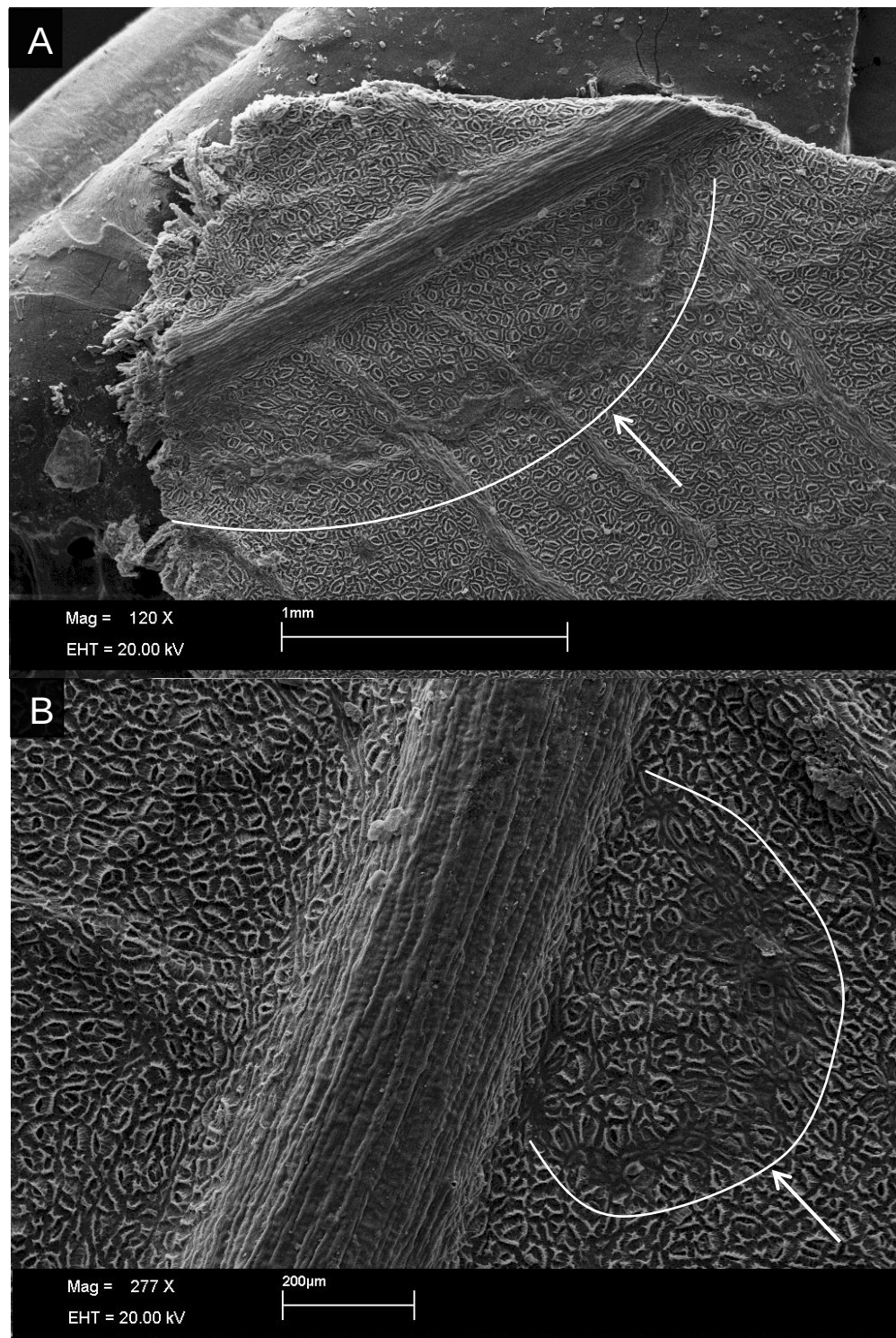
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 10: Desenvolvimento dos ascósporos na superfície de folhas de seringueira em MEV com 24, 48 e 72 horas de período de molhamento submetidos a diferentes temperaturas



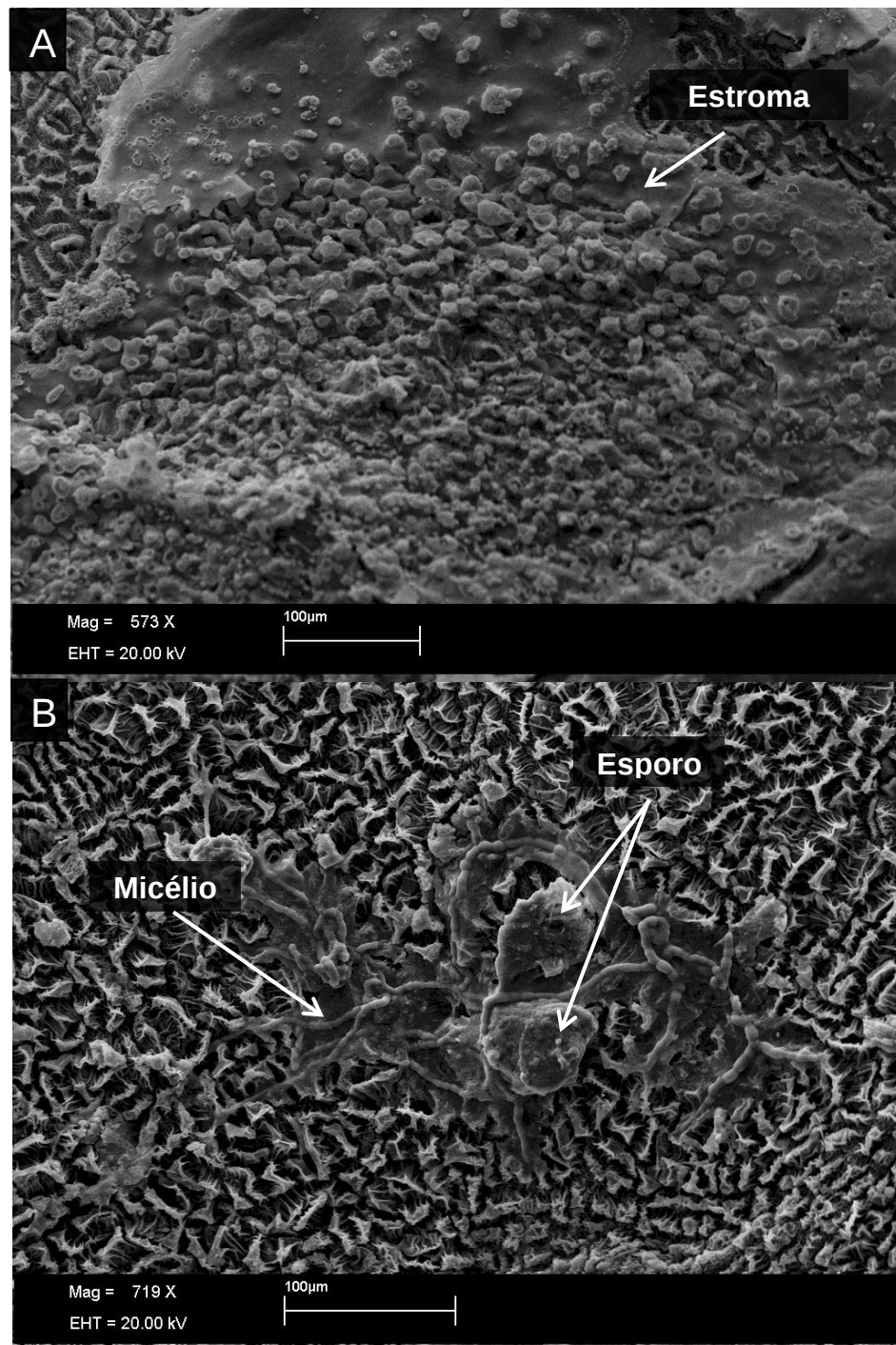
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 11: Manchas similares a crosta negra, com características circulares, após 4 horas de período de molhamento submetidos as temperaturas de 25 °C



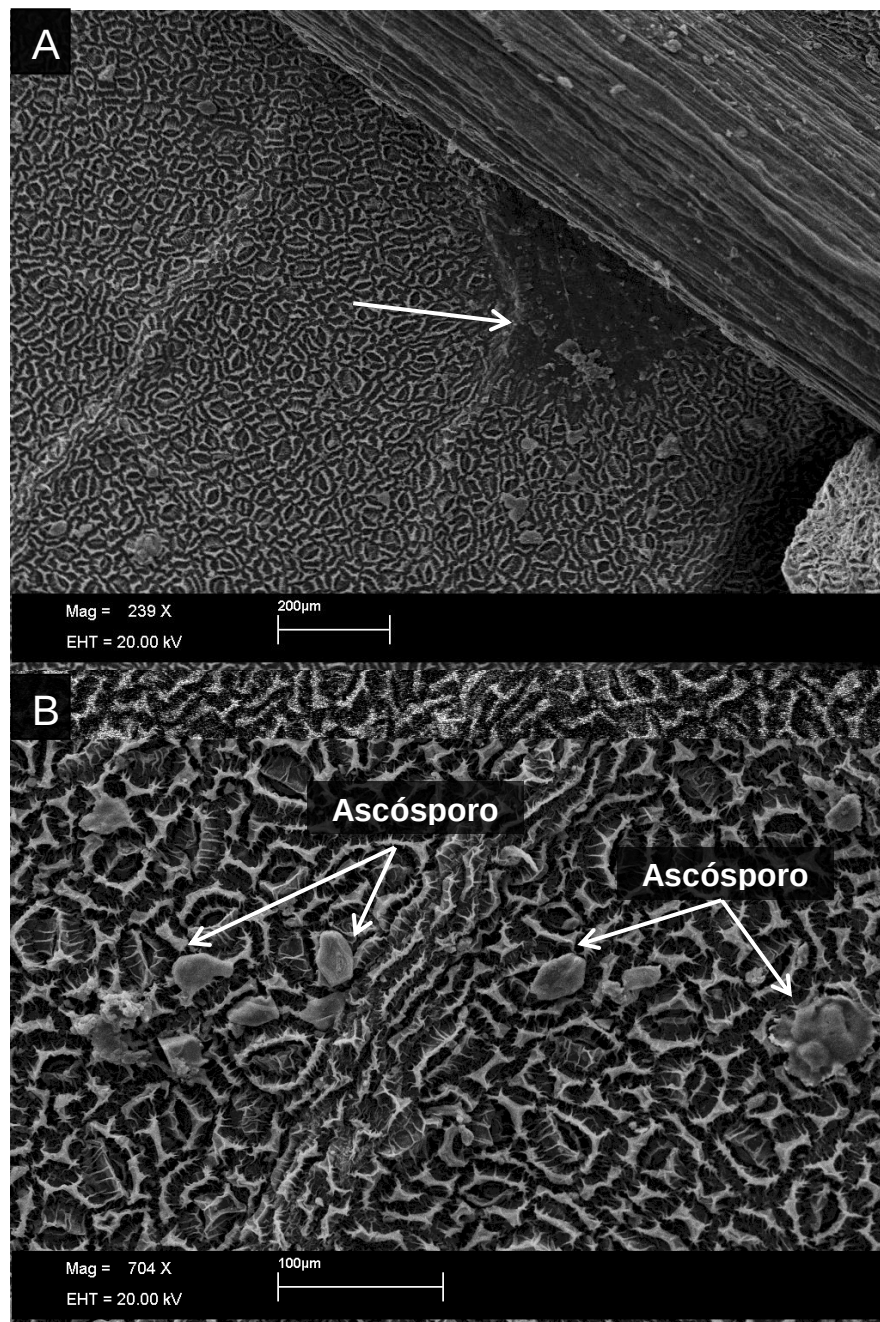
Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 12: Observação da formação de conídios 24 horas após a inoculação a 20°C na superfície de folha de seringueira inoculadas com ascósporos (A e B)



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 13: Observação de ascósporos 48 horas após a inoculação a 20°C na superfície de folha de seringueira inoculadas (A e B)



Fonte: Elaboração do próprio autor.

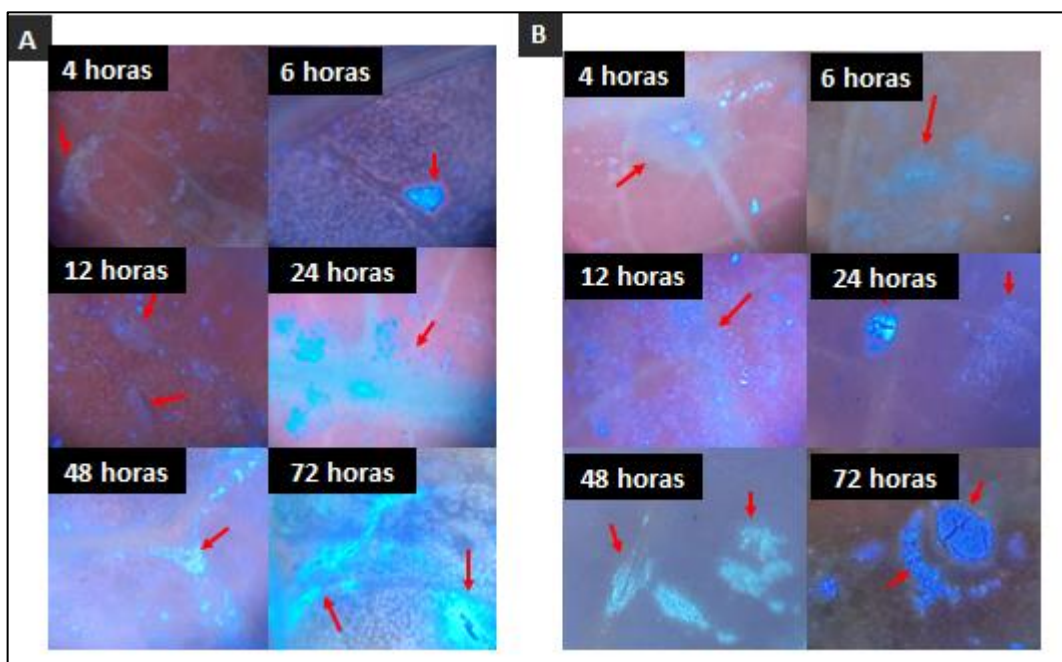
Os resultados obtidos a partir da inoculação de ascósporos indicam que os diferentes sintomas observados no campo são decorrentes da fase em que este fungo se encontra no campo, onde se percebe a formação de placas mais arredondadas, como pontos escuros sem nenhuma ou pouca elevação com o desenvolvimento do fungo no caso de esporos assexuados e de sintomas de crostas em círculos com estromas, que parece ser desenvolvida por infecções iniciadas por

ascósporos. Estas observações microscópicas corroboram com as observações realizadas por Gomes (2023) nos testes de patogenicidade realizado com diferentes isolados de *Cladosporium*, obtidos de estromas de folhas coletadas em diferentes locais.

5.3 Avaliação de amostras em microscopia de luz ultravioleta (UV)

Conforme a figura 14 observou-se que à medida que aumentou o período de molhamento teve um acréscimo na produção de estruturas fungicas, principalmente próximo das nervuras foliares, nas amostras tratadas com esporos assexuados e sexuais.

Figura 14: (A) Desenvolvimento de esporos assexuados na superfície de folhas de seringueira em UV a 25 °C submetidos a diferentes períodos de molhamento (B) Desenvolvimento de esporos sexuais na superfície de folhas de seringueira em UV a 25 °C submetidos a diferentes períodos de molhamento



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Conforme pode ser visto nas tabelas 1 e 2, os dados de porcentagem de área foliar afetadas pelo fungo, visualizados em microscópio UV, corroboram com as informações descritas anteriormente com base nas imagens de MEV. Fica claro que

o fungo tem bom desenvolvimento em 25 °C (Figura 15), sendo crescente a partir dos 10 °C, e passando a ser afetado negativamente a partir dos 35 °C. Este comportamento é muito parecido entre as duas fases do fungo, porém, vale ressaltar que como nas observações em MEV, as imagens em microscópio UV permitiram verificar que as amostras tratadas com os esporos referentes a fase assexuada do fungo apresentam maiores áreas foliares atacadas (Figura15).

Tabela 1: Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas por esporos sexuados sob diferentes condições ambientais

Tempo de molhamento (Horas)	Temperatura (°C)						
	10	15	20	25	30	35	40
4	4,67 BC a	4,37 B a	6,3 D a	6,19 D a	6,64 D a	5,24 C a	1,56 A a
6	6,67 B a	8,15 C b	10,2 D b	12,1 E b	11,8 DE bc	7,54 BC ab	3,2 A a
12	8,46 AB a	9,38 B b	15,6 C b	15,4 C b	14,62 C c	14,8 C b	6,3 A bc
24	19,76 B b	18,39 B c	26,0 ED c	34,03 E cd	28,9 D d	18,7 B bc	12,7 A c
48	20,63 B b	24,66 C d	41,21 DE d	43,62 E d	42,5 E e	22,5 BC c	16,12 A cd
72	33,11 B c	38,77 B e	44,23 C e	49,7 D d	50,84 D f	30,4 BC d	22,0 A d
CV	28,7*						

Os valores médios seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem na linha e de pela mesma letra minúsculas na coluna. *CV: Coeficiente de variação. Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, $p > 0,05$.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

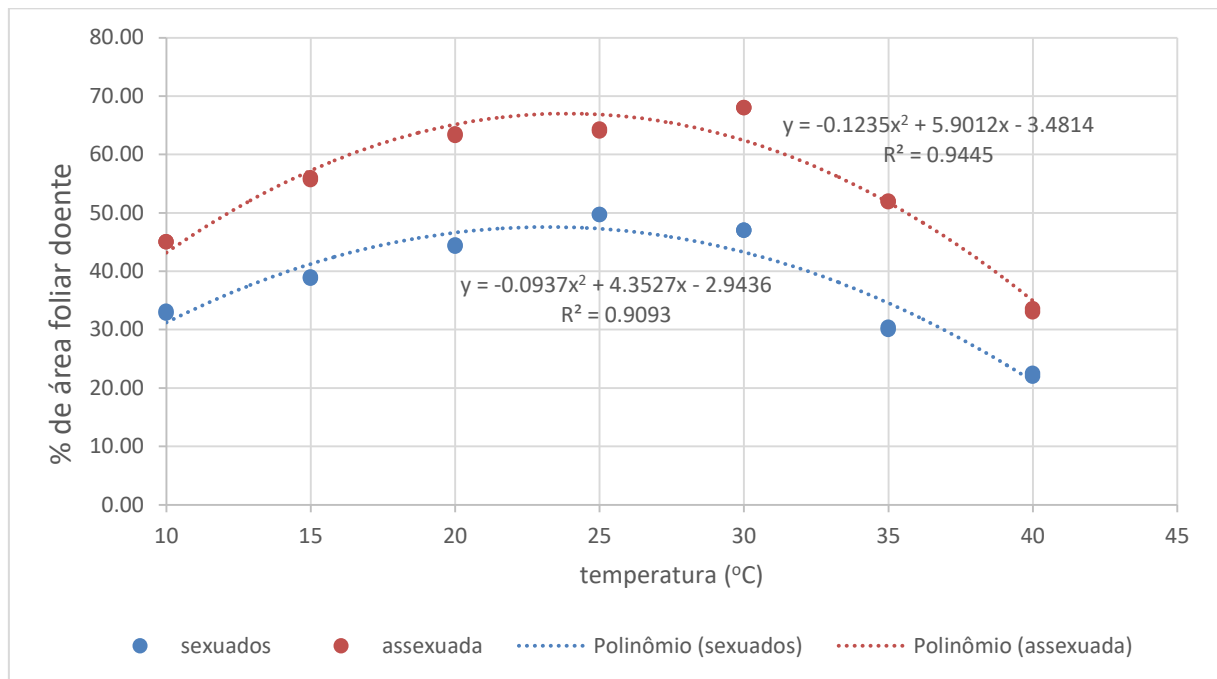
Tabela 2: Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas por esporos assexuados sob diferentes condições ambientais

Tempo de molhamento (Horas)	Temperatura (°C)						
	10	15	20	25	30	35	40
4	12,1 D a	10,53 C a	12,8 D a	16,19 E a	10,31 C a	4,0 A a	3,0 A a
6	14,34 C ab	12,34 BC a	21,11 D b	24,81 D bc	13,7 C a	9,0 B ab	6,64 A a
12	16,67 A ab	22,03 CD b	23,81 D b	33,62 E c	17,98 B bc	18,25 B b	16,2 A b
24	18,1 A b	29,07 B cd	29,31 B c	41,27 C d	20,5 AB c	18,77 A b	19,55 A bc
48	30,12 B c	39,45 D d	38,68 D e	56,24 E de	35,34 C d	34,08 C c	23,0 A c
72	45,00 B d	55,67 D e	63,24 E f	64,3 E e	68,0 E e	51,87 CD d	33,54 A d
CV	32,4*						

Os valores médios seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem na linha e de pela mesma letra minúsculas na coluna. *CV: Coeficiente de variação. Teste de Tukey, a 5% de probabilidade, $p > 0,05$.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 15: Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas sob período de molhamento de 72 horas após a inoculação

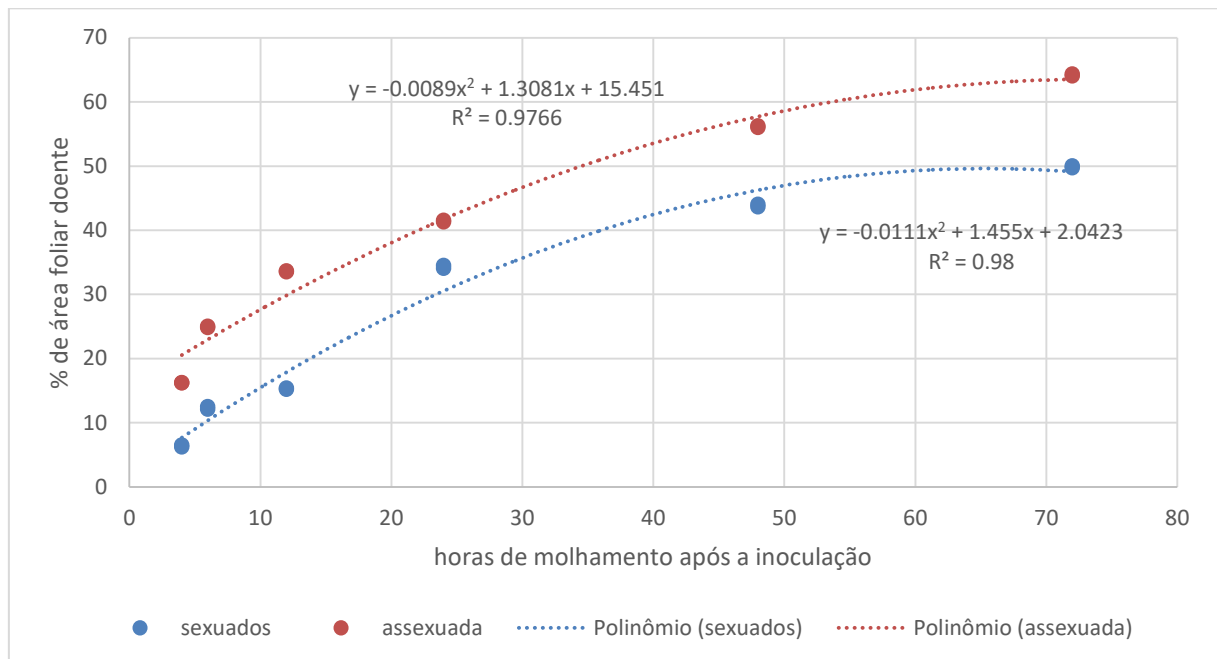


Fonte: Elaboração do próprio autor.

Quanto maior é o período de molhamento maior é a porcentagem de área foliar atacada (Figura 16).

Para ocorrer a infecção de *Pseudocercospora* em seringueira precisa de no mínimo 10 horas consecutivas com UR >90% acima de 20°C (GASPAROTO *et al.*, 2012), já para *R. heveae* esse processo é mais rápido, com 10 horas de período de molhamento a 25 °C já se inicia a infecção (Figura 16).

Figura 16: Porcentagem média de área foliar das amostras inoculadas na temperatura de 25°C



Fonte: Elaboração do próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Atravez das técnicas de microscopia utilizadas no trabalho foi possível verificar que:

- O desenvolvimento do fungo, tanto na fase sexuada, *R. heveae*, como na sua fase assexuada, *Cladosporium*, é afetado pela temperatura, uma vez que seu desenvolvimento é maior nas faixas de temperatura entre 20 a 25°C.
- Quanto maior o período de molhamento, melhor é o desenvolvimento do fungo.
- Essas observações iniciais melhoram o entendimento do ciclo do fungo, visto que há poucas informações sobre essa doença em seringueira.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, A. A.; CARMO, C. A. F. **Seringueira**. Viçosa: EPAMIG, 2008. 894 p.
- BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; MATTOS JÚNIOR, D. Ambiente e doença. *In*.: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 5. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2019. v.1, cap.7. p. 93 – 103.
- BEVENUTO, J. A. Z. ; PASSOS, J. R. S. ; FURTADO, E. L. B. Development parameters of the latent period as a response of rubber tree resistance to South American leaf blight. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 47, n. 2, p. 103-109, 2021.
- BLAGODATSKY, S.; XU, J.; CADISCH, G. Carbon balance of rubber (*Hevea brasiliensis*) plantations : A review of uncertainties at plot, landscape and production level. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 221, p. 8-19, 2016.
- BRADSHAW, E.R.; ZHANG, S. Biosynthesis of dothistromin. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, p. 201–213, 2006.
- BRAUN, U.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C. Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 3. Species on monocots (Poaceae, true grasses). **IMA fungus**, [s. l.], v. 6 n. 1, p. 25-98, 2015.
- CANNON, P. F. Diversity of Phyllachoraceae with special reference to the tropics. *In*: HYDE, K. D. **Biodiversity of tropical microfungi** (ed.). Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997. p. 255-278,
- CELIO, G. J.; HAUSBECK, M. K. Evaluation of poinsettia cultivars for susceptibility to powdery mildew. **HortScience**, Alexandria, v. 32, p. 259–261, 1997.
- CHEN, H.; LEE, M. H.; DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 64, p. 755–770, 2007.
- DAYARATHNE, M. C.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; JONES, E. B. G.; GOONASEKARA, I. D; BULGAKOV, T. S; AL-SADI, A. M.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S.; MCKENZIE, E. H. C. *Neophyllachora* gen nov.(Phyllachorales), three new species of *Phyllachora* from Poaceae and resurrection of Polystigmataceae (Xylariales). **Mycosphere**, Guiyang, v. 8, p. 1598–1625, 2017.
- De WIT, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 1–23, 2016.
- ESCANFERLA, M. E. **Pré-Penetração de Guignardia psidii em goiaba: influência da temperatura, duração do molhamento, idade dos frutos e concentração de etileno e dióxido de carbono**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” , Piracicaba, 2007.

ESCANFERLA, M. E.; MORAES, S. R. G.; SALAROLI, R. B.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Pre-penetration stages of *Guignardia psidii* in guava: effect of temperature, wetness duration and fruit age. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 618-624, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039–1042, 2011.

FIRMINO, A. C.; ANTONIO, G. L.; MATTOCHECK, T. A.; SCALOPPI JUNIOR, E. J.; FISHER, I.H.; PIFFER; GONÇALVES, E.C.; FURTADO, E.L. Black crust on rubber tree: initial selection of resistant clones. **Resumo** [...] IUFRO Conference Division 7 – Forest Health Pathology and Entomology. Lisbon, Set. 2022.

FURTADO, E. L. **Comportamento de cultivares de seringueira (*Hevea spp.*) frente ao Mal das folhas na região do Vale do Ribeira – SP.** 1996. 79 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo Piracicaba, 1996.

FURTADO, E. L.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Doenças da seringueira. In: AMORIM, L. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. Piracicaba: Agrônômica Ceres, v. 2, 2016. p. 647-656.

GASPAROTTO, L., FERREIRA, F. A., SANTOS, A. F., PEREIRA, J. C. R., FURTADO, E. L. Doenças das Folhas. In.: GASPAROTTO, L.; REZENDE PEREIRA, J. C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília, DF: Editora Embrapa, 2012. cap. 3. p. 35.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília, DF: Serviço de Produção de Informação - EMBRAPA, 1997. 168 p.

GOMES, E. A.; KASUYA, M. C. M.; BARROS, E. G.; BORGES, A. C. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 477-483, 2002.

GOMES, M. E. **Crosta negra em seringueira: Identificação e caracterização de agente causal**. 2023. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2023.

GONÇALVES, E. C. P.; GOES, A. Ocorrência de crosta-negra na cultura da seringueira no estado de São Paulo. In: 50º CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA. Uberlândia – MG, 2017. **Resumo** [...] Disponível em: http://www.infobibos.com/anais/CBFito/50/Resumos/Resumo50CBFito_0674.pdf. Acesso em: mar. 2022.

HABIB, M. A. H.; ISMAIL, M. N. *Hevea brasiliensis* látex proteonomics: a review of analytical methods and the way forward. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 134, p. 43-53, 2021.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quartely Review of Biology**, Ithaca, v. 66, n. 4, p.411-453, 1991.

HWEE, E. A. **Non-rubbers and abnormal groups in natural rubber**. [S. l.], 2014.

INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção de borracha**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/borracha-latex-coagulado/br>. Acesso em: 19 out. 2022.

INDEX FUNGORUM. 2016. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Acesso em: mar. 2020.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP - IRSG. **Rubber Statiscal Bulletin**. Sri Lanka; 2019.

JACOB, J. L; D'AUZAC J.; PREVOT, J. C. The composition of natural latex from *Hevea brasiliensis*. **Clinical Reviews in Allergy**, New York, v. 11, p. 325–337, 1993.

JUNQUEIRA, N. T.; BEZERRA, J. Nova doença foliar em seringueira (*Hevea* spp.), causada por *Rosenscheldiella heveae* sp. (*Loculoascomycetes*, *Dothideales*, *Stigmateaceae*). **Fitopatologia Brasileira**, Heidelberg, v. 15, n. 1, p. 24–28, 1990.

KONNO, K. Plant látex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, Oxford, v. 72, p. 1510 – 1530, 2011.

LABNO, C. **Basic Intensity Quantification with ImageJ**. Integrated Light Microscopy Core: University of Chicago, 2019.

MAGALHAES, I. P.; GOMES, M. E.; SCALOPPI, E. JR.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MOREIRA, B. R. A.; PRADO, E. P.; FIRMINO, A. C. Pré-penetração e período de latência de *Colletotrichum tamarilloi* em clones de seringueira resistentes e suscetível sob diferentes condições ambientais. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 49, n. 131, 2021.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.; HYDE, K. D.; JONES, E. G.; MCKENZIE, E. H., HUANG, S. K.; ABDEL-WAHAB, M. X. U. J. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 72, p. 199-301. 2015.

MARDONES, M.; TRAMPE-JASCHIK, T.; OSTER, S.; ELLIOTT, M.; URBINA, H.; SCHMITT, I.; PIEPENBRING, M. Phylogeny of the order Phyllachorales (Ascomycota, Sordariomycetes): among and within order relationships based on five molecular loci. **Persoonia**, Leiden, v. 39, p. 74–90, 2017.

MASSOLA JÚNIOR, N. S. Fungos Fitopatogênicos. In.: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.) **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2019. v.1, cap.2. p. 109.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n.1, fev. 2010.

MORAES, S. R. **Infecção e colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em goiaba e infecção de *Colletotrichum acutatum* em folhas de citros**. 2009. 114 p. (Tese de doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz deQueiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PEARCE C. A.; REDDELL P.; HYDE K. D. A revision of *Phyllachora* (Ascomycotina) on hosts in the angiosperm family *Asclepiadaceae*, including *P. gloriana* sp. nov., on *Tylophora benthamii* from Australia. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 3, p. 123–138, 1999.

PEARCE C. A.; REDDELL P.; HYDE K. D. A member of the *Phyllachora shiraiana* complex (Ascomycota) on *Bambusa arnhemica*: a new record for Australia. **Australasian Plant Pathology**, Dordrecht, v. 29, p. 205–210, 2000.

PINHEIRO, E.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; VIÉGAS, I. J. M.; PINHEIRO, F. S. V. Estratégias para controle do mal das-folhas (*Microcyclus ulei* (H. Henn) V. Arx, na seringueira. Brasília, DF: EMBRAPA. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos**. 2002.

REPORTS AND DATA. **Natural rubber market size, share and industry analysis by product type (RSS Grade, Latex Concentrate, Solid Block), by distribution channel (Online, Offline), by applications (Automobiles, Gloves, Footwear, Belting & Hose) and region, segment forecasts To 2028**. Nova York – Estados Unidos, 2020. Disponível em: <https://www.reportsanddata.com/report-detail/natural-rubber-market> . Acesso em: 30 nov. 2022.

SAMBUGARO, R.; FURTADO, E. L.; RODELLA, R. A.; MATTOS, C. R. R. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Mixrocyclus ulei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p.51-51, 2004.

SANTOS, M. D. M.; DE NORONHA FONSECA, M. E.; SILVA BOITEUX, L.; CÂMARA, P. E. A.; DIANESE, J.C. ITS phylogeny and taxonomy of *Phyllachora* species on native Myrtaceae from the Brazilian Cerrado. **Mycologia**, Philadelphia, v. 108 n. 6, p. 1141-1164, 2016.

SECCO, R. S. A botânica da seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Jussieu) Muell.Arg.)]. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C. A. F. S. do. (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: Epamig, 2008. p. 3-24.

SIERRA-HAYER, J. F. **Variabilidade genética de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Brasil**. 2014. 55 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2014.

SILVA, M. J.; CLARO, P. I. C.; SILVA, J. C.; SCALOPPI JÚNIOR, E. J.; GONÇALVES, P. S.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C. Evaluation of the physicochemical properties of natural rubber from *Hevea brasiliensis* clones. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 171, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669021006890#preview-section-references>. Acesso em: 13 dez. 2022.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; TAVARES, L. A.; MAIA, L. C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, p. 33-38, 2001.

STERLING, A.; RODRÍGUEZ, C. Estrategias de Manejo para las principales enfermedades y plagas del cultivo del caucho con énfasis en la amazonia colombiana. Bogotá: **Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI**. 2018.

VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. Influência da temperatura e da umidade nas epidemias de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 149-207, 1996.

VELÁSQUEZ, A. C.; CASTROVERDE, C. D. M.; YANG HE, S. Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. **Current Biology**, Cambridge, v. 28, ed. 10, 21 May, p. 619-634, 2018.

VIDEIRA, S. I. R.; GROENEWAL, J. Z.; NAKASHIMA, D. C.; BRAUN, U.; BARRETO, R. W.; DE WIT, P. J. G. M.; CROUS P. W. *Mycosphaerellaceae* – Chaos or clarity?. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 87, Jun., 2017.

WIJAYAWARDENE, N. N.; CROUS, P. W.; KIRK, P. M.; HAWKSWORTH, D. L.; BOONMEE, S.; BRAUN, U.; DOILOM, M. Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 69, p. 1–55, 2014.