

LISANDRO DE PROENÇA PIERONI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE OÍDIO EM *Hevea*
*brasiliensis***

Botucatu

2020

LISANDRO DE PROENÇA PIERONI

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE OÍDIO EM *Hevea
brasiliensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Botucatu

2020

P619c Pieroni, Lisandro de Proença
Caracterização morfológica e molecular de oídio em *Hevea brasiliensis* / Lisandro de Proença Pieroni. -- Botucatu, 2020
73 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: Edson Luiz Furtado

1. *Erysiphe necator*. 2. *Erysiphe quercicola*. 3. Fungos fitopatogênicos. 4. Patologia florestal. 5. Seringueira. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

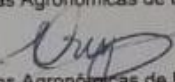
Título:

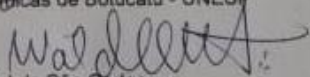
AUTOR: LISANDRO DE PROENÇA PIERONI

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA
(PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP


Prof.ª Substituta CRISTIANE DE PIERI
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. WALDIR CINTRA DE JESUS JÚNIOR
Centro de Ciências Naturais / Universidade Federal de São Carlos

Botucatu, 27 de março de 2020.

*Aos meus Pais,
Lisandra dos Reis Lopes de Proença e Fabrício Albuquerque Pieroni, e avós (In memoriam),
Fernanda dos Reis Lopes de Proença e Lizandro Lopes de Proença,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais e avós (*In memoriam*), responsáveis pelas minhas realizações, por todo apoio, preocupação, compreensão, amor e carinho dedicados.

À minha namorada Larissa S. Diniz, por todo amor, paciência, dedicação e estar sempre presente em minha vida.

Ao professor Dr. Edson Luiz Furtado pela orientação, amizade e oportunidades.

À professora Dr. Cristiane de Pieri pela orientação, amizade, apoio e oportunidades.

Ao amigo professor Me. Renato Boreli Silva por todo apoio, conhecimentos transmitidos e me apresentar o caminho sem retorno da mentalidade científica.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Agrônômicas - FCA/UNESP, em especial aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal, Seção Técnica de Pós-Graduação e da biblioteca Prof. Paulo de Carvalho Mattos, sempre atenciosos e prestativos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo (Código de Financiamento 001).

Aos amigos do Departamento de Proteção Vegetal: Lucas A. Benso, Rodrigo D. Faria, Jean F. S. Gil, Leandro dos Santos Manoel, Eduardo S. Gorayeb, Otávio A. P. A. Siqueira, Carlos Carneiro, David Vitor Dos Santos, Sara Y. S. Kurokawa, Anny Mery M. Ruiz, Vanusa Leite, Léo Zimback, João Zago Bevenuto, Efrain Santana, Caroline Pierozzi, Marília Pizetta, Jessica K. B. Cardoso, Daniella Flávia S. H. S. Silva, pela amizade e companheirismo.

Aos irmãos da República Vão Di Cerka, em especial aos que me acompanharam durante o Mestrado: Popai (Italo Rodrigues), Provisório (Gilberto

Magalhães Filho), Magal (André Vitor da Costa Manso), Fox (Fábio Leite), Faiçal (Faiçal Hagge), Fieira (Fábio Girardi Filho), Jamal (Willyans Duarte Gonçalves), Carpa (Wilson Meireles Coelho Junior), Bomba (Thiago Schumacher), Bagual (PitBull), Chimbica (Boxer (?)) e dona Vanilda Ribeiro, por toda ajuda e momentos de descontração.

Aos amigos das Repúblicas Nóstravamus e Mato-Minas, pela amizade e momentos de descontração.

Aos grandes amigos por todos os momentos compartilhados.

E tantos outros que aqui não foram citados, mas contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e de minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é a terceira cultura florestal mais plantada no Brasil, e o estado de São Paulo é responsável por mais de 60% da produção de látex do país. É uma espécie nativa da região amazônica que possui hábito caducifólio, e durante o período de reenfolha é suscetível ao ataque de fitopatógenos foliares, que prejudicam e até limitam seu estabelecimento em determinadas regiões. Dentre os principais patógenos foliares da seringueira, destacam-se os fungos causadores de oídios, microrganismos biotróficos que infectam tecidos jovens, e podem causar desfolha, principalmente em condições de viveiro e jardim clonal. O agente causal do oídio da seringueira é descrito como *Erysiphe quercicola*, porém, devido a insuficientes descrições taxonômicas, morfológicas e moleculares desta doença, seu agente causal permanece em discussão, além da fase sexual deste patógeno carecer de qualquer registro neste hospedeiro. Portanto, o objetivo deste trabalho é caracterizar o oídio da seringueira, utilizando caracterizações morfológicas, análises moleculares e testes de patogenicidade. No período de julho a dezembro de 2019, foram coletadas amostras foliares de seringueira em diferentes estágios fenológicos infectadas com oídio na região de Botucatu, São Paulo. Para a caracterização morfológica, foram registradas e mensuradas características das hifas, conídios e conidióforos, que correspondem à fase assexuada do fungo. A caracterização molecular foi realizada através de análises filogenéticas dos isolados para as regiões ITS e 28S do rDNA. Os resultados obtidos demonstraram que duas espécies de fungos causadores de oídio estão associadas à seringueira, *Erysiphe quercicola*, infectando folhas jovens e *Erysiphe necator*, infectando folhas maduras. Este é o primeiro relato de *Erysiphe necator* infectando seringueiras no mundo, e o primeiro registro deste fungo associado a um hospedeiro da família Euphorbiaceae. Este relato evidencia capacidade de adaptação deste fungo a novos hospedeiros, e acrescenta novos desafios a estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: *Erysiphe necator*. *Erysiphe quercicola*. Fungos Fitopatogênicos. Patologia Florestal. Seringueira.

ABSTRACT

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the third most planted forest crop in Brazil, and the state of São Paulo is responsible for more than 60% of the country's latex production. It is a species native to the Amazon region that has a deciduous habit, and during the re-leafing period it is susceptible to the attack of leaf phytopathogens, which harm and even limit its establishment in certain regions. Among the main leaf pathogens of the rubber tree, there are the fungi that cause powdery mildew, biotrophic microorganisms that infect young tissues, and can cause defoliation, especially in nursery and clonal garden conditions. The causal agent of rubber mildew is described as *Erysiphe quercicola*, however, due to insufficient taxonomic, morphological and molecular descriptions of this disease, its causal agent remains under discussion, in addition to the sexual phase of this pathogen lacking any record in this host. Therefore, the objective of this work is to characterize powdery mildew mildew, using morphological characterizations, molecular analyzes and pathogenicity tests. From July to December 2019, leaf samples of rubber trees were collected at different phenological stages infected with powdery mildew in the Botucatu region, São Paulo. For morphological characterization, characteristics of hyphae, conidia and conidiophores, which correspond to the asexual phase of the fungus, were recorded and measured. Molecular characterization was performed through phylogenetic analyzes of the isolates for the ITS and 28S regions of the rDNA. The results obtained showed that two species of fungi that cause powdery mildew are associated with the rubber tree, *Erysiphe quercicola*, infecting young leaves and *Erysiphe necator*, infecting mature leaves. This is the first report of *Erysiphe necator* infecting rubber trees in the world, and the first record of this fungus associated with a host of the Euphorbiaceae family. This report shows the adaptability of this fungus to new hosts, and adds new challenges to epidemiological studies.

Keywords: *Erysiphe necator*. *Erysiphe quercicola*. Phytopathogenic Fungi. Forest Pathology. Rubber tree.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Extração de látex. A) Sangria da casca da árvore; b) látex coletado em tigelas.....	19
Figura 2 — Programa computacional Application Suit Version 2.1.0, utilizado para captura de imagens e mensuração das estruturas do fungo.....	30
Figura 3 — Teste de patogenicidade. A) Retirada do fungo; B) Suspensão transferida para a superfície adaxial e abaxial de folhas jovens utilizando um borrifador manual; C) Plantas em câmara úmida mantidas em câmara de ambiente controlado.....	33
Figura 4 — Escala diagramática de severidade do oídio em seringueira (<i>Hevea spp.</i>) (TUMURA et al., 2002).....	33
Figura 5 — A) Sinais de oídio em folhas jovens no campo; B); Sinais do fungo na face adaxial das folhas; C) Sinais do fungo na face abaxial da folha.....	37
Figura 6 — Tipos de apressórios da hifa. A) Apressório do tipo lobulado; B) - F) apressórios multilobulados; G) - H) apressórios dispostos em lados opostos da hifa; I) apressórios dispostos em sequência ao longo da hifa.....	38
Figura 7 — Tipos de conidióforos. A) Conidióforo não catenulado com uma célula adicional; B) Conidióforo não catenulado com duas células adicionais; C) Conidióforo não catenulado sem célula adicional; D) Conídios aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias).....	39
Figura 8 — Tipos de conídios. A) Conídio primário; B) Conídio secundário; C) Conídio germinado; D) Conídios.	40
Figura 9 — A) Sinais de oídio em folhas maduras no campo; B) – C) Sinais do fungo na face abaxial das folhas.....	41
Figura 10 — Tipos de apressórios da hifa. A) - C) Apressórios do tipo lobulado; D) - F) apressórios multilobulados; G) - I) apressórios em pares dispostos em sequência ao longo da hifa.....	42
Figura 11 — Tipos de conidióforos. A) Conidióforo não catenulado com uma célula adicional; B) Conidióforo não catenulado com duas células adicionais; C) Conidióforo não catenulado sem célula adicional; D) Conídios aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias).....	43
Figura 12 — Tipos de conídios. A) - B) - D) Conídios; C) Conídio germinado;	44
Figura 13 — Comprimento (μm) de conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).....	45

Figura 14 — Comprimento (μm) da célula basal dos conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).....	45
Figura 15 — Largura (μm) da célula basal dos conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).....	46
Figura 16 — Comprimento (μm) dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).	47
Figura 17 — Largura (μm) dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).	47
Figura 18 — Razão comprimento/largura dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).	48
Figura 19 — Árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia (MP), utilizando sequências da região ITS do DNA de espécies do gênero <i>Erysiphe</i> . Em cada nó estão indicados os valores de bootstrap, com 1500 repetições. As sequências utilizadas deste estudo estão em destaque.....	53
Figura 20 — Árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia (MP), utilizando sequências da região 28S do rDNA de espécies do gênero <i>Erysiphe</i> . Em cada nó estão indicados os valores de bootstrap, com 1500 repetições. As sequências utilizadas deste estudo estão em destaque.....	54
Figura 21 — Teste de patogenicidade. A) Folhas apresentando os primeiros sinais de <i>Erysiphe quercicola</i> na face adaxial aos 4 dias após a inoculação; B) Progresso dos sintomas; C) conídios do fungo.....	55
Figura 22 — Teste de patogenicidade. A) Folhas apresentando os primeiros sinais de <i>Erysiphe necator</i> na face adaxial aos 10 dias após a inoculação; B) Progresso dos sintomas; C) conídios do fungo.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A cultura da seringueira	18
2.2	Doenças da seringueira no Brasil	20
2.3	Oídio da seringueira.....	21
2.3.1	Importância econômica	21
2.3.2	Sintomatologia	22
2.3.3	Etiologia	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Coleta de amostras	27
3.2	Caracterização Morfológica	29
3.3	Caracterização molecular	30
3.3.1	Extração de DNA	30
3.3.2	Reação de PCR	30
3.3.3	Análise filogenética	31
3.4	Teste de patogenicidade.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Caracterização morfológica	34
4.2	Caracterização molecular	50
4.3	Análise filogenética	50
4.4	Teste de patogeneidade.....	55
5	CONCLUSÕES.....	58
6	REFERÊNCIAS	59
7	APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

A seringueira caracteriza-se por ser uma espécie arbórea tropical de grande porte e ciclo perene, responsável pela produção de borracha natural. (GONÇALVES et al., 2002). No Brasil, é a terceira cultura florestal mais plantada, com o estado de São Paulo responsável por mais de 60% da produção nacional. (IEA, 2019).

Com o avanço do monocultivo em regiões tropicais, a alta incidência de doenças foliares representa um fator limitante para a heveicultura, principalmente devido ao clima característico de zonas tropicais serem favoráveis à ocorrência e disseminação de fitopatógenos (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012). Por ser uma árvore com hábito caducifólio, dentre as principais doenças da cultura, destacam-se as doenças foliares ocasionadas por fungos, entre elas, os fungos causadores de oídio.

O oídio é uma doença foliar que afeta plantios de *Hevea* spp. em todo o mundo (LIMKAISANG et al., 2005). A doença ocorre em viveiros, jardins clonais e plantios definitivos, causando desfolhamento intenso nas plantas, principalmente nas regiões de maior produção de borracha natural do mundo, como a Malásia e outros países do oriente (FURTADO e SILVEIRA, 1993). Em decorrência do desfolhamento, as plantas apresentam redução de crescimento (FURTADO e SILVEIRA, 1993), circunferência e renovação mais lenta da casca após a colheita, podendo resultar em uma perda de até 45% na produção de latex (LIYANAGE et al., 2016).

Desde sua primeira descrição, em 1925 (STEINMANN, 1925 citado por LIYANAGE et al., 2016), existe uma quantidade limitada de pesquisas com caracterizações taxonômicas, morfológicas, patogênicas e moleculares desta doença (LIMKAISANG et al., 2005, WU et al., 2019). As discussões em relação à taxonomia deste fungo ocorrem desde a natureza da conidiogênese (WU et al., 2019) até a ocorrência de outros agentes causais simultaneamente (LIYANAGE et al., 2017).

Portanto, este trabalho tem como objetivo geral caracterizar o agente causal do oídio da seringueira, e apresenta como objetivos específicos, caracterizar este agente através de características morfológicas, moleculares e patogênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da seringueira

A seringueira caracteriza-se por ser uma espécie arbórea de grande porte e ciclo perene (GONÇALVES et al., 2002). Pertencem à divisão das Angiospermae, classe Dicotyledoneae, família Euforbiácea e gênero *Hevea* (RAMOS et al., 2018). O gênero *Hevea* é amplamente distribuído na bacia Amazônica, compreendendo países como Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname e Guiana. (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990). No Brasil, o gênero encontra-se naturalmente disperso nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Amapá, nordeste do estado do Maranhão, norte do estado do Mato Grosso e Rondônia (DUCKE; BLACK, 1954).

No Brasil, o gênero *Hevea* compreende 11 espécies de seringueiras: (*Hevea guianensis* Aublet, *Hevea benthamiana* Müll-Arg., *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll-Arg., *Hevea pauciflora* (Spruce ex Benth.) Müll-Arg., *Hevea nitida* Mart. ex. Müll-Arg., *Hevea spruceana* (Benth.) Müll-Arg., *Hevea microphylla* Ule, *Hevea paludosa* Ule, *Hevea rigidifolia* (Spruce ex Benth.) Müll-Arg., *Hevea camporum* Ducke e *Hevea camargoana* Pires) (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; CORDEIRO; SECCO, 2015), sendo *Hevea brasiliensis* a espécie mais explorada economicamente (PRIYADARSHAN et al., 2011).

O mais importante uso comercial da seringueira é a produção de borracha natural. Principalmente devido à sua estrutura e alto peso molecular, a borracha natural possui propriedades de alto desempenho que não podem ser comparadas à borracha sintética, produzida a partir do petróleo (CORNISH, 2001). Essas propriedades incluem resiliência, elasticidade, resistência à abrasão e impacto, dispersão eficiente do calor e maleabilidade a baixas temperaturas (CORNISH, 2001). Apesar de representar menos de 50% do consumo total de borracha, a borracha natural ainda é indispensável para pneus pesados, componentes de engenharia de alto desempenho (LAU et. al., 2016) e para mais de 50.000 produtos que possuem elasticidade como atributo (PRIYADARSHAN et al., 2011). Ao contrário dos sintéticos (derivados do petróleo), a produção de borracha natural é sustentável e ecológica (JONES, 1994). Além disso, apresenta benefício ambiental

por diminuir a pressão sobre o petróleo, um recurso mineral não renovável (FRANCISCO; BUENO; BAPTISTELLA, 2004).

A exploração econômica de um seringueira consiste da extração do látex por meio da operação de sangria, ato de abrir os vasos laticíferos situados na casca da árvore (SOUZA, 2013). A casca é raspada com uma faca e o látex coletado em tigelas (Figura 1) (SOUZA, 2013), um método não destrutivo de colheita que facilita a produção contínua (VAN BEILEN, 2007). Uma vez que a extração do látex não é mecanizada, necessita de mão de obra permanente, agregando importância socioeconômica na produção (SOUZA, 2007).

Figura 1 — Extração de látex. A) Sangria da casca da árvore; b) látex coletado em tigelas.



Fonte: Lisandro Pieroni (2016).

A seringueira é uma espécie adaptável a diferentes condições climáticas, atualmente cultivada no Norte até 25°N (província de Yunnan, China) até 21°S no Brasil (PRIYADARSHAN et al., 2011). No Brasil, é a terceira cultura florestal mais plantada, com 218.307 há (IBÁ, 2019). A safra nacional de 2017/2018 produziu cerca de 222.820 mil toneladas de coágulo, com o estado de São Paulo responsável

por mais de 60% da produção do país (IEA, 2019). No mesmo período, a produção mundial foi de 29,04 milhões de toneladas, com a Ásia responsável por cerca de 90% da produção (CONAB, 2019).

2.2 Doenças da seringueira no Brasil

Desde o crescimento do porta-enxerto até indivíduos adultos em campo, a seringueira é acometida por vários problemas de natureza bióticas e abióticas responsáveis por prejuízos econômicos. (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012). Com o avanço do monocultivo em regiões tropicais, a alta incidência de doenças foliares representa um fator limitante para a heveicultura, principalmente devido ao clima característico de zonas tropicais serem favoráveis à ocorrência e disseminação de fitopatógenos (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012). Entre esses fatores limitantes, se destaca a doença foliar conhecida como mal-das-folhas (*Pseudocercospora ulei*), considerada uma das mais destrutivas e limitantes à cultura (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012, GUYOT E LE GUEN, 2018). Além do mal das folhas, outras doenças que atacam os seringais no Brasil são:

a) Doenças de raízes: podridão vermelha (*Ganoderma philippii*); branca (*Rigidoporus lignosus*) e parda (*Phellinus noxius*) e nematóides (*Meloidogyne* sp., *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus* sp., *Paratrichodorus* sp., *Criconeematideos*) (GASPAROTTO et al., 2012a; WILCKEN et al., 2015).

b) Doenças de caule: cancro estriado e cancro do tronco (*Phytophthora* spp.); mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*); rubelose (*Erythricium salmonicolor*); morte descendente, cancro do enxerto e podridão do caule (doenças associadas, principalmente, ao parasita fraco *Lasiodiplodia theobromae*); antracnose do painel de sangria (*Colletotrichum gloeosporioides*); seca de ponteiros (causada por diversos fatores bióticos e abióticos que acarretam em sintomas muito semelhantes, por exemplo, desfolhas sucessivas por doenças foliares, deficiência nutricional, matocompetição, etc.); tumores; *Fusarium* sp.; *Diplodia* sp. e *Cephalosporium* sp. (GASPAROTTO et al., 2012b).

c) Doenças foliares: antracnose das folhas (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*); requeima e queda anormal das folhas (*Phytophthora* spp.); mancha areolada (*Thanatephorus cucumeris*); crosta negra (*Phyllachora huberi*); mancha de *Cercospora* (*Cercospora heveae*); mancha de *Corynespora*

(*Corynespora cassiicola*); oídio (*Oidium heveae*); mancha de Periconia (*Periconia manihoticola*); queima-do-fio (*Corticium koleroga*); doença de origem viral (patógeno do gênero Carlavirus); mancha de alternaria (*Alternaria* sp.) e mancha de alga (causada pela alga *Cephaleuros* spp.) (GASPAROTTO et al., 2012c).

Devido aos prejuízos econômicos que as doenças podem causar aos seringais, a caracterização dos patógenos e estudos relacionados à resistência de materiais genéticos são fundamentais para a implantação e condução de uma floresta sadia. (GASPAROTTO; PEREIRA, 2012). Por ser uma árvore com hábito caducifólio, dentre as principais doenças da cultura, destacam-se as doenças foliares ocasionadas por fungos, entre elas, os fungos causadores de oídios.

2.3 Oídio da seringueira

2.3.1 Importância econômica

O oídio é uma doença foliar que afeta plantios de *Hevea* spp. em todo o mundo (LIMKAISANG et al., 2005). A doença ocorre em viveiros, jardins clonais e plantios definitivos, causando desfolhamento intenso das plantas, principalmente nas regiões de maior produção de borracha natural do mundo, como a Malásia e outros países do oriente (FURTADO e SILVEIRA, 1993). Esse desfolhamento é conhecido como queda secundária das folhas, pois as árvores com folhas infectadas caem uma segunda vez, no período que normalmente estariam reenfolhando após o inverno (FERNANDO, 1971 citado por LIYANAGE et al., 2016). Em decorrência do desfolhamento, as plantas apresentam redução de crescimento (FURTADO e SILVEIRA, 1993) circunferência e renovação mais lenta da casca após a colheita, podendo resultar em uma perda de até 45% na produção de latex (LIYANAGE et al., 2016).

A doença foi observada pela primeira vez em seringueiras em Java, distrito de Malang, em 1918 (SHARPLES, 1936 citado por ROSETTI, 1958). No Brasil, foi relatada pela primeira vez no município de Campinas, estado de São Paulo, em 1958, em um ataque fraco e incipiente, confinada a poucas plantas, que foram erradicadas completamente (ROSSETTI, 1958). Posteriormente, novos surtos da doença foram relatados em diversos municípios do estado de São Paulo e também no estado de Pernambuco (FURTADO e SILVEIRA, 1993).

Desde então, a doença tem sido relatada em quase todos os países produtores de seringueira (PRIYADARSHAN et al., 2011). O aumento de sua distribuição espacial em plantios comerciais, tem sido creditada principalmente ao intercâmbio de material vegetal (RAMAKRISHNAN e RADHAKRISHNA PILLAY, 1963 citado por LIMKAISANG et al., 2005) e o aumento de sua incidência é consequência da entrada de novos clones produtivos no mercado, porém suscetíveis ao patógeno (AUER, 2001).

2.3.2 Sintomatologia

Os fungos causadores de oídios, por suas características biotróficas, desenvolvem seu ciclo de vida sempre em relação com o hospedeiro, de modo que sua fase sexuada e assexuada se reproduz em tecidos vivos (RIVERA, 2001). As folhas jovens são suscetíveis à infecção do fungo (MIN et al., 2012), que se inicia com frequência junto às nervuras principais, formando áreas esbranquiçadas de aspecto pulverulento, composto pelos micélios e pelas frutificações do fungo (ROSSETTI, 1958). O desenvolvimento do micélio ocorre em ambas às faces da folha, na forma de colônias isoladas ou recobrimdo toda a folha, ocasionando a perda da aparência brilhante das folhas jovens (GASPAROTTO et al., 2012c). Como reflexo, os folíolos jovens se enrugam, tornam-se purpúreos, pretos e caem, ficando apenas os pecíolos presos aos ramos (GASPAROTTO et al., 2012c). Conforme observado por Furtado e Silveira, (1993), folíolos com mais de 30% de superfície recoberta pelo fungo, apresentam amarelecimento intenso e se desprendem com facilidade (FURTADO e SILVEIRA, 1993).

O fungo também pode infectar a folhagem em fase intermediária de desenvolvimento ou mesmo folhas maduras (ROSSETTI, 1958). Nas folhas maduras, a infecção provoca enrugamento e distorção do limbo foliar, e nas folhas velhas, as colônias do fungo podem esporular intensamente por diversas semanas e as lesões adquirem coloração marrom avermelhada (GASPAROTTO et al., 2012c), mas raramente se verifica qualquer desfolhamento (ROSSETTI, 1958). O fungo também ataca pecíolos, brotos tenros e inflorescências, podendo sobreviver nos botões florais (ROSSETTI, 1958), cujo desenvolvimento resulta em baixo pegamento de frutos e redução na produção de sementes (FURTADO e SILVEIRA, 1993).

2.3.3 Etiologia

A correta classificação do agente causal do oídio em seringueira permanece em discussão (LIYANAGE et al., 2016). Desde sua primeira descrição, em 1925 (STEINMANN, 1925 citado por LIYANAGE et al., 2016), existe uma quantidade limitada de pesquisas com caracterizações taxonômicas, morfológicas, patogênicas e moleculares desta doença (LIMKAISANG et al., 2005, WU et al., 2019). Além disso, o cleistotécio, que representa a fase sexual dos oídios, nunca foi registrado neste hospedeiro, portanto, sua identificação é baseada nas características morfológicas de sua fase assexuada (LIMKAISANG, 2005, WU et al., 2019). A identificação de oídios em nível de espécie, baseada apenas na descrição de características morfológicas de sua fase assexuada, não apresentam consistência taxonômica (GLAWE, 2008, LIYANAGE et al., 2016, MEEBOON e TAKAMATSU, 2020).

A primeira descrição do agente causal do oídio em seringueira foi realizada por Steinmann em 1925 (STEINMANN, 1925 citado por LIYANAGE et al., 2016). Baseado nas características morfológicas assexuadas do fungo e na planta hospedeira identificou o agente causal como uma nova espécie, *Oidium heveae*. Steinmann descreveu que o fungo apresentava conídios variando de formato elipsóide a cilíndrico, formados em conidióforos catenulados, frequentemente em longas cadeias (STEINMANN, 1925 citado por LIYANAGE et al., 2016). Entretanto, Paries (1966 citado por LIYANAGE et al., 2016), relatou que o oídio da seringueira possui conídios formados em conidióforos não catenulados. Desde então, a natureza da conidiogênese é uma das questões mais controversas relativas à morfologia do oídio em seringueira (WU et al., 2019).

Limkaisang et al. (2005) realizaram a primeira caracterização morfológica detalhada do oídio em seringueira. Os autores descreveram a fase assexuada de isolados coletados na Malásia, Tailândia e Brasil, como possuindo conídios formados em conidióforos não catenulados, variando de formato elipsóide a cilíndrico, sem corpos de fibrosina, com tubo germinativo do tipo polígony. Essas características evidenciaram que o fungo pertence ao gênero *Oidium* subgênero *Pseudoidium*. Os resultados encontrados por Limkaisang et al. (2005) corroboram com os resultados de Boesewinkel (1980), onde observou que oídios com conídios

formados em conidióforos não catenulados, podem, em uma atmosfera úmida, produzir conídios aderidos a pseudo-cadeias. Com isso, o autor sugeriu que o conidióforo catenulado relatado anteriormente por Steinmann (1925), pode ser a formação de uma pseudo-cadeia encontrada em oidios do gênero *Pseudoidium* (LIMKAISANG et al., 2005).

Como não há registro de sua fase sexuada, necessária para identificação de oidios em nível de espécie, atualmente são utilizadas análises moleculares para determinar a relação filogenética entre esses fungos (MORI et al., 2000, CUNNINGTON et al., 2003). Estas análises podem ser aplicadas para investigar a relação entre uma espécie anamórfica e seu estágio teleomórfico (LIMKAISANG et al., 2005). No Brasil, várias espécies de ódios têm sido recentemente identificadas usando a combinação de caracterizações morfológicas da fase assexuada e análises moleculares (DELLAGNOL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; FONSECA et al., 2016; BRAUN et al., 2017; BOITEAUX et al., 2017; CARDOSO et al., 2017; PIVETA et al., 2018; DORNELES et al., 2019; FONSECA et al., 2019).

A primeira caracterização molecular do agente causal do oídio em seringueira foi realizada por Linkaiasang et al., (2005). A análise dos nucleotídeos da região conservada ITS, na subunidade 28s rDNA, demonstrou que os isolados brasileiros foram idênticos a sequências de *Erysiphe* sp. em *Quercus phylliraeoides*, coletados no Japão. Portanto, os autores sugeriram que *Oidium heveae* pode ser a fase assexuada de *Erysiphe* sp. em *Quercus phillyraeoides*. Em análises filogenéticas conduzidas por Takamatsu et al., (2007), os autores encontraram que *Oidium hevea* se agrupa com *Erysiphe quercicola*, portanto, fizeram a sinonímia de *Oidium heveae* com *Erysiphe quercicola*. Trabalhos posteriores corroboram com os resultados encontrados por Limkaisang et al., (2005) e Takamatsu et al., (2007) (LIMKAISANG et al., 2006; TAM et al., 2016; LIYANAGE et al., 2017; WU et al., 2019; MEEBOON e TAKAMATSU, 2020).

O gênero *Erysiphe* é o mais diversificado na família Erysiphaceae, entre as espécies de maior ocorrência no Brasil, *Erysiphe quercicola* é a mais frequente inclusive já relatado em seringueira (LINKAIASANG et al., 2005) (Tabela 1).

Quadro 1 — Espécies de *Erysiphe* spp. relatadas causando oídio em plantas no Brasil.

Espécies	Hospedeiro	Origem ^(E)	Nº acesso GenBank		R
			ITS	28s	
<i>E. quercicola</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	SP	AB193606	AB197133	1
<i>E. quercicola</i>	<i>Delonix regia</i>	SP	JQ034229	-	2
<i>E. platani</i>	<i>Platanus x acerifolia</i>	RS	KF499210	-	3
<i>E. australiana</i>	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	MG	KT941419	KT941421	4
<i>E. difusa</i>	<i>Carica papaya</i>	MG	MF626622	-	5
<i>E. necator</i>	<i>Caryocar brasiliensis</i>	DF	LC228609	-	5
<i>E. heraclei</i>	<i>Daucus carota</i>	DF	KY513703	-	6
<i>E. quercicola</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	CE	KY172852	-	7
<i>E. quercicola</i>	<i>Quercus robur</i>	PR	KT714236	-	8
<i>E. quercicola</i>	<i>Cinnamomum camphora</i>	RS	MF183968	-	9
<i>E. quercicola</i>	<i>Rumex crispus</i>	RS	MH304757	MH305358	10
<i>E. quercicola</i>	<i>Bixa orellana</i>	CE	KY741537	KY741538	11
<i>E. quercicola</i>	<i>Clitoria fairchildiana</i>	CE	MH569421	MK085085	12
<i>E. necator</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	CE	KY690170	KY692194	13

Dados ausentes= -. (E) Estados brasileiros: CE – Ceará; PR – Paraná; DF – Distrito Federal; MG – Minas Gerais; RS – Rio Grande do Sul; SP – São Paulo. (R):1- Linkaiasang et al., (2005) 2 - Dellagnol et al., (2012); 3 – Oliveira et al., (2015); 4 – Fonseca et al., (2016); 5 – Braun et al., (2017); 6 – Boiteaux et al., (2017); 7 - Cardoso et al., (2017); 8 – Piveta et al., (2018); 9 - Dorneles et al., (2018); 10 - Dorneles et al., (2019); 11 - Fonseca et al., (2019a); 12 - Fonseca et al., (2019), 13 - Fonseca et al., (2019b).

Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

A faixa hospedeira deste fungo no mundo, abrange hospedeiros pertencentes às famílias Anacardiaceae (CARDOSO et al., 2017) Bixaceae, (FONSECA et al., (2019) Bombaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae Fabaceae, Fagaceae, (MEEBOON e TAKAMATSU, 2020), Lauraceae (KIRSCHNER; LIU 2014), Malvaceae, Mimosaceae, (MEEBOON E TAKAMATSU, 2020), Polygonaceae (DORNELES et al., (2019) Rutaceae (BAISWAR et al., 2015), Sapindaceae, Rhamnaceae (MEEBOON E TAKAMATSU, 2020). Como o oídio é um parasita obrigatório, com

alta especificidade em relação ao hospedeiro, alguns autores sugerem dividir a espécie *Erysiphe quercicola* em subespécies com base na faixa de hospedeiros (WU et al., 2019).

Desde sua primeira caracterização detalhada, trabalhos posteriores corroboram que *Erysiphe quercicola* é o agente causal do oídio em seringueira (LIMKAISANG et al., 2005, WU et. al., 2019). Entretanto, Liyanage et al., (2017), encontraram em amostras coletadas no Sri Lanka a presença de duas formas assexuadas com morfologias distintas, ocorrendo simultaneamente na mesma folha. A espécie mais abundante nas folhas corrobora com as descrições morfológicas e moleculares para *Erysiphe quercicola* (LIMKAISANG et al., 2005; MEEBOON e TAKAMATSU, 2020). A menos abundante apresenta conídios formados em conidióforos catenulados, conforme a primeira descrição de Streinmann (1925), sugerindo que essa espécie pode pertencer aos gêneros *Golovinomyces* spp. ou *Podosphaera* spp. Os autores relatam que as amostras coletadas apresentando essa morfologia eram escassas, e as dificuldades operacionais envolvendo patógenos biotróficos, não permitiram análises moleculares para confirmar a identidade genética desta segunda espécie (LIYANAGE et al., 2017).

A literatura citada evidencia que há incertezas quanto à correta classificação taxonômica dos possíveis agentes causais de oídio em seringueira. Para esclarecer esse problema e entender a diversidade genética e distribuição geográfica deste patógeno, é necessário estudos com coletas abrangentes nos países produtores, seguido de detalhadas caracterizações morfológicas e moleculares, através de ferramentas como microscopia eletrônica e reconstruções filogenéticas (LIMKAISANG et al. 2005; LIYANAGE et al., 2016; LIYANAGE et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo, do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas - FCA, e no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética do Instituto Biológico de Botucatu - IBB, ambos da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, SP.

3.1 Coleta de amostras

No período de julho a dezembro de 2019, foram coletadas amostras foliares de seringueira em diferentes estágios fenológicos infectadas com oídio. Os locais de coleta foram um jardim clonal localizado na cidade de Botucatu, SP (Latitude: 22° 53' 09" S, Longitude: 48° 26' 42" W) e um plantio definitivo na cidade de São Manuel, SP (Latitude: 22° 43' 52" S, Longitude: 48° 34' 14" W), ambos pertencentes a FCA/UNESP.

Os estágios fenológicos foram registrados de acordo com Sambugaro (2003), classificados em B, C e D, com base na anatomia foliar. Cada planta foi considerada um isolado, e para cada isolado, coletou-se cinco folhas infectadas. As amostras eram colocadas em sacos de papel dentro de sacos plásticos, transportadas ao laboratório e armazenados a 5°C em câmara úmida (COOK et al., 1997), até sua análise. Foi coletado um total de 40 isolados, conforme Tabela 2. Os isolados obtidos foram herborizados e armazenados no herbário do Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, em Botucatu, SP.

Tabela 1 — Identificação dos isolados utilizados neste trabalho.

ID	Clone	Órgão Infectado	Local de Coleta	Data de coleta
S1	GT1	C Adaxial	Botucatu – SP	jun/19
S2	GT1	C Adaxial	Botucatu – SP	jun/19
S3	GT1	C Adaxial	Botucatu – SP	jun/19
S4	GT1	B Abaxial	Botucatu – SP	jun/19
S5	GT1	C Abaxial	Botucatu – SP	jun/19
S6	GT1	C Adaxial	Botucatu – SP	jun/19
S7	PB235	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S8	PB235	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S9	PB235	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S10	RIMM 701	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S11	RIMM 701	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S12	RIMM 701	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S13	PR255	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S14	PR255	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S15	PR255	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S16	RIMM 600	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S17	RIMM 600	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S18	RIMM 600	C Adaxial	Botucatu – SP	jul/19
S19	Porta enxerto	D Abaxial	Botucatu – SP	agol/19
S20	Porta enxerto	D Abaxial	Botucatu – SP	agol/19
S21	Porta enxerto	D Abaxial	Botucatu – SP	agol/19
S22	Porta enxerto	D Abaxial	São Manuel -SP	agol/19
S23	Porta enxerto	D Abaxial	São Manuel -SP	agol/19
S24	Porta enxerto	D Abaxial	São Manuel -SP	agol/19
S25	RIMM 600	D Abaxial	São Manuel -SP	out/19
S26	RIMM 600	D Abaxial	São Manuel -SP	out/19
S27	RIMM 600	D Abaxial	São Manuel -SP	out/19
S28	AVROS237	D Abaxial	São Manuel -SP	out/19
S29	IAC35	D Abaxial	São Manuel -SP	nov/19
S30	RIMM 600	D Abaxial	São Manuel -SP	nov/19
S31	RIMM 600	D Abaxial	São Manuel -SP	dez/19
S32	RIMM 600	B Abaxial	São Manuel -SP	dez/19
S33	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	agol/19
S34	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	agol/19
S35	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	agol/19
S36	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	agol/19
S37	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	agol/19
S38	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	out/19
S39	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	out/19
S40	RIMM 600	C Adaxial	São Manuel -SP	out/19

Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

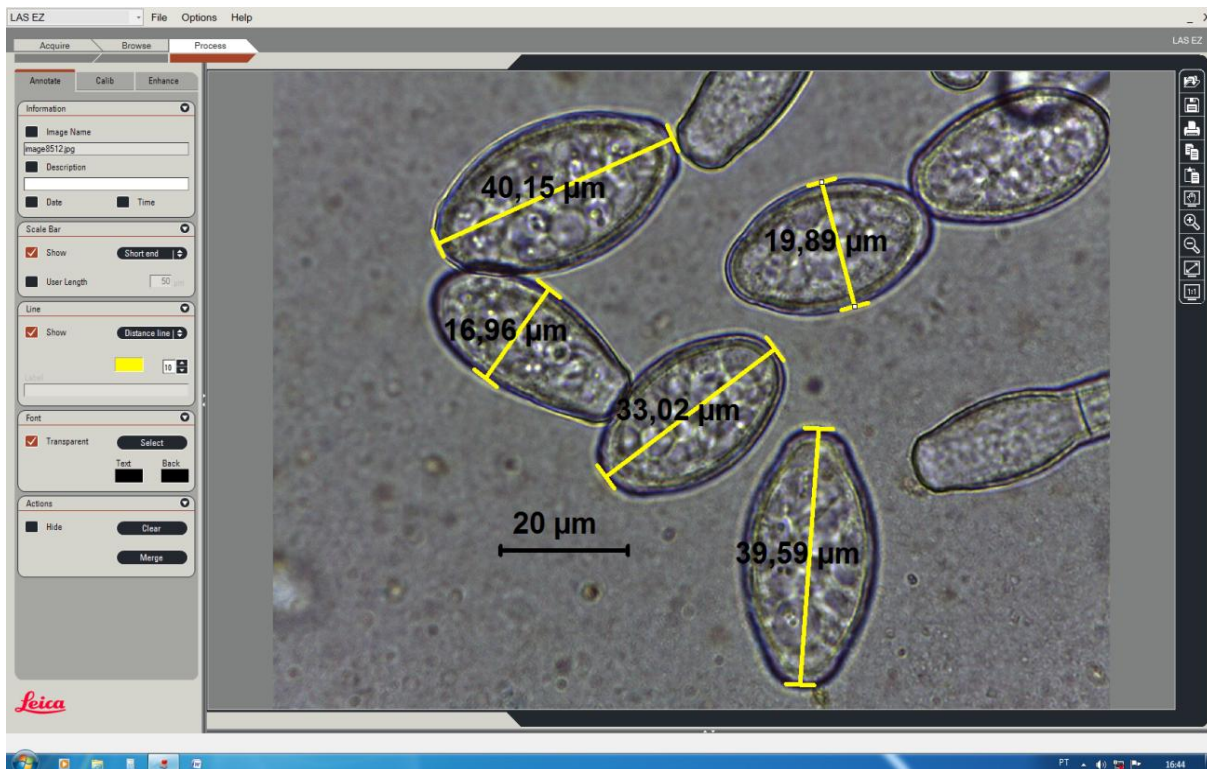
3.2 Caracterização Morfológica

O preparo das amostras para caracterização morfológica foi realizado conforme a metodologia proposta por Cook et al. (1997), descrita a seguir. O exame foi realizado em todos os isolados até 48 horas após as coletas. Estruturas fúngicas (micélios, conidióforos e conídios) presentes nas superfícies abaxial e adaxial das folhas, foram removidas com o auxílio de uma fita adesiva transparente dupla face ou pressionando se uma lâminula de vidro contra a folha infectada, em seguida, coradas com uma gota de lactoglicerol em uma lâmina de vidro para exame em microscópio de luz com ampliação de 10x, 20x e 40x.

A caracterização morfológica foi baseada na observação e no registro de características úteis utilizadas na classificação de oídios, são elas: **Ciclo de vida:** Presença da fase sexuada (cleistotécio) e assexuada (conidióforos e conídios); **Hifa/Micélio:** face da folha em que ocorrem, largura e tipo de apressório; **Conídios:** comprimento, largura, razão comprimento/largura, forma, posição do tubo germinativo, tipo de apressório, presença ou ausência de corpos de fibrosina; **Conidióforo:** natureza da conidiogênese, comprimento, posição do septo basal, comprimento, largura e forma da célula basal (STADINIK, 2001; GLAWE, 2008). Para observar a presença de corpos de fibrosina nos conídios, foi utilizada uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 3% (HAMMETT, 1977).

As fotografias foram registradas através de microscópio óptico binocular LEICA DM500 com câmera ICC50 HD acoplada, e as mensurações realizadas através do software *Leica Application Suit* Versão 2.1.0 (Figura 2). Em cada isolado foi mensurada cinquenta estruturas ao acaso para composição das médias. Os dados de todas as variáveis mensuradas foram submetidos à verificação de normalidade de distribuição, através do teste de Anderson–Darling ao nível de 5% de significância. Verificada a normalidade de distribuição dos dados, foi realizada a análise de variância e o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico Minitab.

Figura 2 — Programa computacional *Application Suit* Version 2.1.0, utilizado para captura de imagens e mensuração das estruturas do fungo.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

3.3 Caracterização molecular

3.3.1 Extração de DNA

Para análise molecular, folhas com lesões esporuladas do fungo tiveram seu DNA extraído utilizando o método CTAB seguindo o protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1987). Após isso, mediu-se a qualidade e quantificou-se o DNA utilizando o equipamento NanoDrop® 2000 (*Thermo scientific*) e a cada amostra foi acrescida água miliQ para uma concentração final de 10 ng/uL para posterior realização da PCR.

3.3.2 Reação de PCR

Para a identificação molecular, 1,5 µL de cada amostra foi submetido a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando o kit PCR Master Mix (2X) (0,05 uni/ µL Taq DNA polimerase, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM dATP, 0,4 mM dCTP, 0,4 mM

dGTP e 0,4 mM dTTP) (Fermentas®), realizando reações com volume total de 25 µL, de acordo com as recomendações do fabricante.

A região ITS do rDNA, incluindo ITS1-5.8S-ITS2, foi amplificada utilizando os primers ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCCGCTTCACTCGCCGTTAC-3') (WHITE et al., 1990). Para amplificação da região 28S do rDNA (incluindo domínios D1 e D2), foram utilizados os primers PM3 (5'-GKGCTYTMCGCGTAGT-3') (TAKAMATSU; KANO, 2001) e TW14 (5'-GCTATCCTGAGGGAACTTC-3') (MORI et al., 2000). A programação do termociclador para ambos os pares de primers consistiu em uma temperatura inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 60 segundos (desnaturação), 52°C (28S) e 60°C (ITS) por 30 segundos (anelamento), 72°C a 60 segundos (extensão), com uma extensão final de 10 min a 72°C (MORI et al., 2000).

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5 % contendo 0,8 µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 80 v / 100 mA / 40 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em transluminador UV. Após a verificação das bandas amplificadas, 1 µL de cada produto de PCR contendo resultados positivos, foi diluído em 20 µL de água destilada esteril. Em seguida, 3 µL dessa solução foi adicionado a 1,5 µL de cada primer e enviadas para sequenciamento no Instituto de Biotecnologia de Botucatu – IBTEC/UNESP. As sequências obtidas foram comparadas com os demais presentes no GenBank, utilizando a ferramenta BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3.3 Análise filogenética

Amostras representativas dos isolados obtidos de folhas jovens e folhas maduras, bem como de outras sequências do gênero *Erysiphe* coletadas do GenBank foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética, observando o histórico evolutivo por meio do método de máxima parsimonia (MP). A validade estatística da árvore foi testada usando a análise de bootstrap com 1.500 repetições (FELSENSTEIN, 1985). A árvore foi obtida pelo algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (NEI E KUMAR, 2000). Foi construída uma árvore para a região ITS e uma para região 28S. Para a região ITS, *Erysiphe australiana* foi usado como outgroup, e para a região 28S, *Erysiphe glycines*. Também foram calculados os

escores das árvores, incluindo o comprimento das árvores, o índice de consistência (IC), o índice de retenção (IR) e o índice de consistência redimensionada (RC). As análises foram realizadas pelo software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

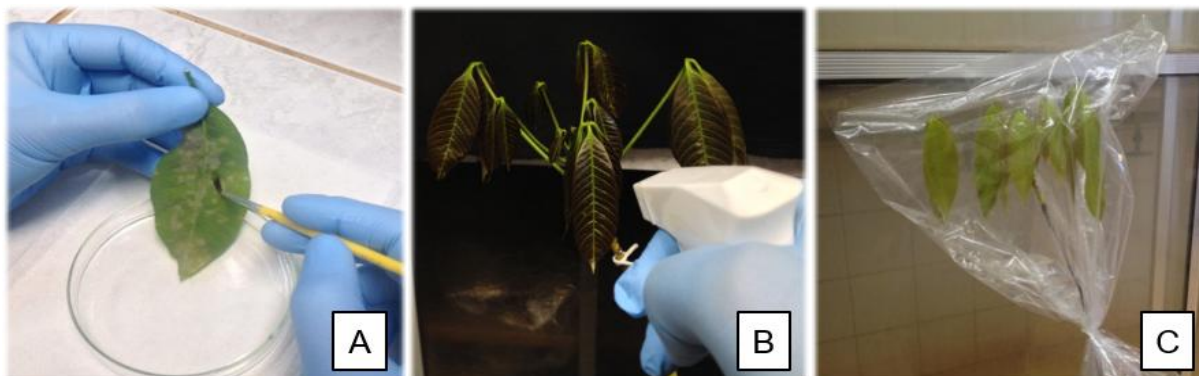
3.4 Teste de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados por inoculação em plantas sadias de seringueira. As plantas foram previamente podadas para o crescimento de novos ramos e mantidas em quarentena durante 60 dias em ambiente controlado a $23\pm 2^{\circ}$ C, 60 – 80% de umidade relativa (UR) e doze horas de fotoperíodo sob lâmpada fluorescente. Após o período de quarentena, as plantas permaneceram assintomáticas, portanto, consideradas sadias para os testes de patogenicidade.

Foram preparados dois inóculos separados, selecionando uma amostra representativa para os isolados de Botucatu e São Manuel. Para o preparo da suspensão, estruturas do fungo foram retiradas da superfície de folhas naturalmente infectadas com oídio de folhas jovens de Botucatu (S1) e de folhas maduras de São Manuel (S30), com auxílio de um pincel de cerdas macias, depositadas em placa de Petri com água destilada estéril e uma gota de Tween 80% (FIGURA 3). A suspensão foi filtrada em um funil com algodão estéril e sua concentração quantificada e ajustada para 2×10^4 com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

A suspensão foi transferida para a superfície adaxial e abaxial de folhas jovens utilizando um borrifador manual, até o ponto de escorrimento. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara úmida durante 48 horas e permaneceram em câmara de ambiente controlado a $20\pm 2^{\circ}$ C, 80 – 100% de umidade relativa (UR), doze horas de foto período sob lâmpada fluorescente (Figura 3). Os experimentos foram realizados com cinco plantas de seringueiras, e cinco folhas inoculadas em cada planta, totalizando quinze folíolos por planta. O controle negativo consistiu de folhas inoculadas apenas com água destilada estéril e mantida nas mesmas condições.

Figura 3 — Teste de patogenicidade. A) Retirada do fungo; B) Suspensão transferida para a superfície adaxial e abaxial de folhas jovens utilizando um borrifador manual; C) Plantas em câmara úmida mantidas em câmara de ambiente controlado.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

O progresso da doença foi observado diariamente com exames dos sintomas e sinais ao microscópio estereoscópico e óptico para confirmar a infecção do patógeno inoculado, cumprindo os postulados de Koch. Foi registrado o período de incubação do patógeno e aos 20 dias após a inoculação, quantificada a severidade da doença utilizando a escala diagramática proposta por Tumura et al. (2002). Nesta escala há sete diferentes níveis da doença, representados em relação à porcentagem de área foliar lesionada, sendo: 0; 2,5%; 5%; 10%; 20%; 38% e 50%, respectivamente conforme Figura 4.

Figura 4 — Escala diagramática de severidade do oídio em seringueira (*Hevea* spp.)



Fonte: TUMURA et al. (2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

A fase sexuada do fungo não foi observada em nenhum isolado, portanto, a caracterização morfológica foi baseada nas características de sua fase assexuada. As informações de todos os isolados estão apresentadas no Apêndice 1. Segundo Wu et al. (2019), a natureza da conidiogênese é uma das questões mais controversas relativas à morfologia do oídio em seringueira. Nesse trabalho, todos os isolados apresentaram características morfológicas típicas do gênero *Oidium* subgênero *Pseudoidium* com conídios únicos formados no topo de conidióforos não catenulados (GLAWE, 2008). Entretanto, houve diferenças nas características morfológicas (Tabela 3) das amostras obtidas de folhas jovens (B e C) em comparação com as de folhas maduras (D) (Tabela 3).

Quadro 2 — Características morfológicas do oídio da seringueira. Dados ausentes = (-)

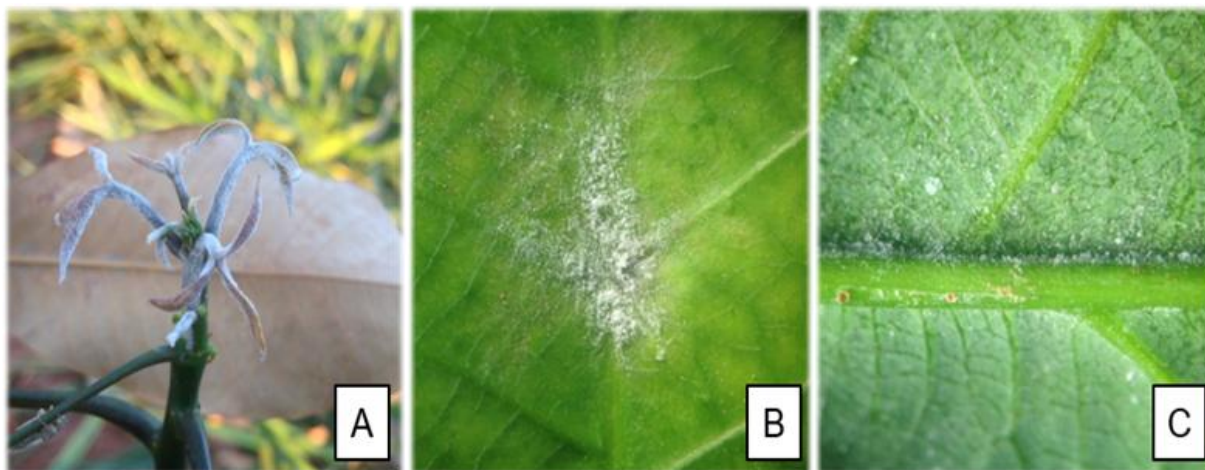
CARACTERÍSTICAS	Steinmann (1925)	Limkaiasang et al. (2005)	Tam et al. (2006)	Liyanage et al. (2017)
Agente causal	<i>Oidium heveae</i>	<i>Erysiphe querciola</i>	<i>Erysiphe querciola</i>	<i>Erysiphe querciola</i>
Hifas				
Hialinas	(-)	+	(-)	(-)
Septadas	(-)	+	(-)	(-)
Apressório	(-)	Lobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
Largura	(-)	(-)	(-)	(-)
Conídio				
Conidiogênese	Catenulado	Não catenulado	Não catenulado	Não catenulado
Formato	Elipsóide - Cilíndrico	Elipsóide - Cilíndrico	Elipsóide - Ovóide	Elipsóide - Cilíndrico
Comprimento (µm)	28,0 - 42,0 (34,2)	25,1 - 43,6 (34,2)	35,0 - 42,5	20,6 - 41,3 (32,6)
Largura (µm)	14,0 - 23,0 (17)	13,4 - 23,3 (18,3)	15,0 - 20,0	11,4 - 23,2 (15,8)
Razão C/L(µm)	(-)	1,4 - 2,5 (1,9)	2,0 - 2,3	1,3 - 2,8 (2,1)
Tudo germinativo	(-)	Tipo Polygoni	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
Corpos de fibrosina	(-)	Ausente	Ausente	Ausente
Conidióforo				
Comprimento (µm)	(-)	(-)	81,3 - 120,0	(-)
Comprimento célula basal (µm)	(-)	13,4 - 61,6 (30,6)	42,5 - 50,0	10,5 - 40,1 (24,4)
Largura da célula pé (µm)	(-)	7,0 - 9,7 (8)	(-)	2,6 - 10,6 (7,1)
Posição do septo basal	(-)	(-)	7,5 - 10,0	(-)
Base da célula basal	(-)	Ereta	(-)	Ereta - Flexível
Nº de células adicionais	(-)	1-3	(-)	2-3
Cleistotécio		Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

Wu et al. (2019)	Meeboon e Talamatsu (2020)	Neste estudo	
<i>Erysiphe querciola</i>	<i>Erysiphe querciola</i>	Folhas jovens	Folhas maduras
+	+	+	+
+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
3,0 – 7,0	(-)	2,85-6,4 (4,01)	2,97-6,17 (3,84)
Não catenulado	Não catenulado	Não catenulado	Não catenulado
Elipsóide - Cilíndrico - Doliforme	Elipsóide - Ovóide - Doliforme	Elipsóide - Ovóide - Doliforme	Elipsóide - Cilíndrico
22,7 - 36,9	28-44	15,96-43,49 (31,74)	23,9-55,3 (35,67)
12,0 - 20,3	13-21,5	12,18-28,42 (18,84)	10,19-19,79 (14, 65)
1,7 - 2,1	2-2,3	1,05-2,71 (1,69)	1,51-4,08 (2,45)
Tipo <i>Pseudoidium</i>		Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
53,0 - 105,0	43 - 90	30,16 - 151,11 (70,33)	45,66-191,70 (85,02)
24,7 - 60,6	20 - 47	11,60 - 75,37 (27,02)	11,06-67,91 (31,29)
5,3 - 10,1	5 - 9	4,64 - 9,98 (7,01)	4,14 – 9,95 (6,4)
(-)	(-)	0,0 - 8,89 (0,74)	0,0 - 6,57 (0,5)
Ereta - Flexível	Ereta	Ereta - Flexível	Ereta - Flexível
2-3	1-3	1-3	1-3
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Todas as amostras obtidas de folhas jovens (B e C), o desenvolvimento do micélio na folha é anfígeno, na maior parte epifilo, formando colônias dispersas pelo limbo foliar, cobrindo parcialmente ou completamente a folha (Figura 5).

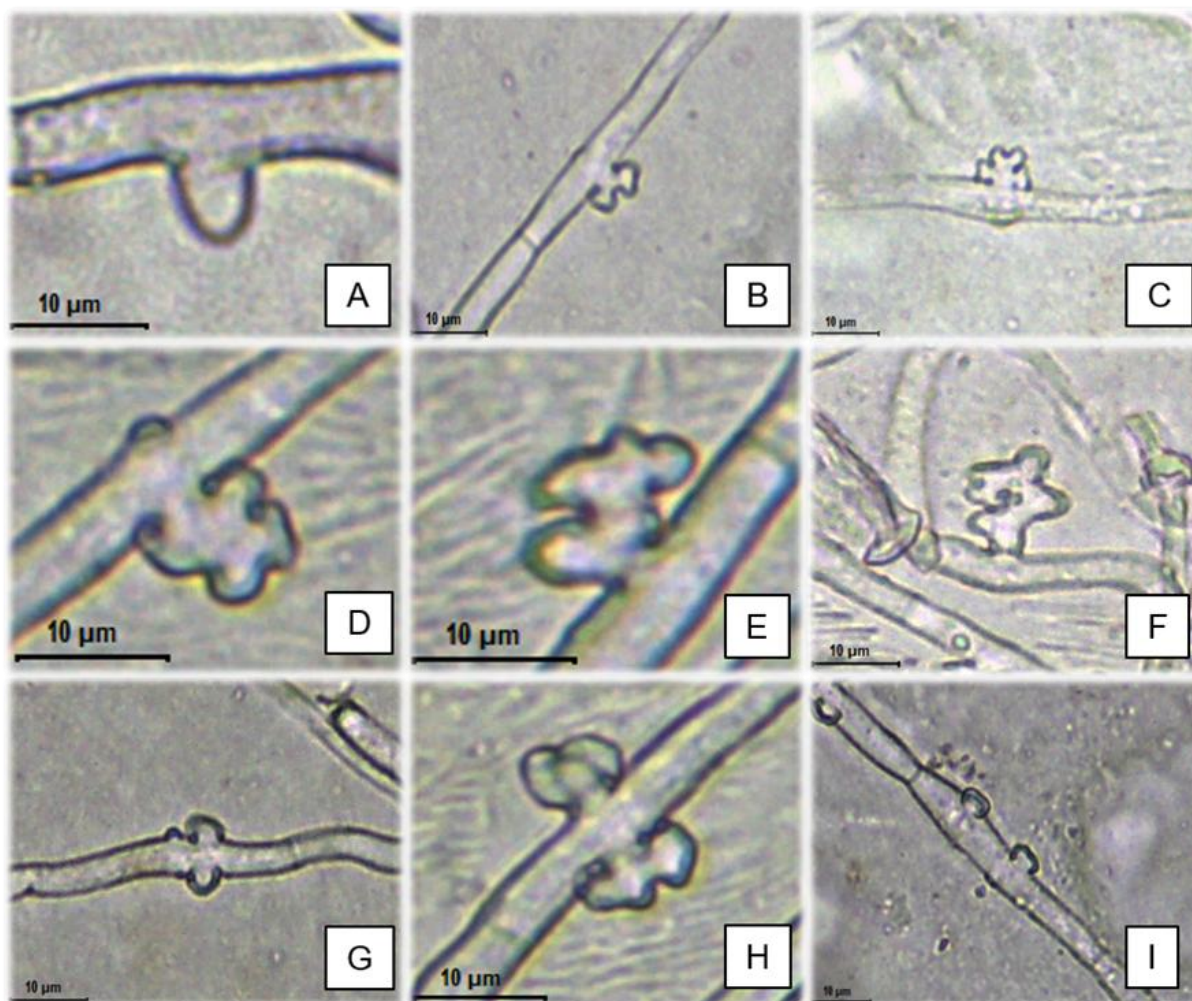
Figura 5 — A) Sinais de oídio em folhas jovens no campo; B); Sinais do fungo na face adaxial das folhas; C) Sinais do fungo na face abaxial da folha.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

As hifas são hialinas, septadas, ramificadas, com paredes finas, retas a flexíveis. A largura das células da hifa variou de 2,85 a 6,4 μm (média = 4,01 μm). O apressório da hifa é do tipo distinto, sua forma variou de lobulado a multilobulado, e sua disposição ocorre em lados opostos ou em sequência ao longo da hifa, podendo ser um único apressório ou em pares (Figura 6).

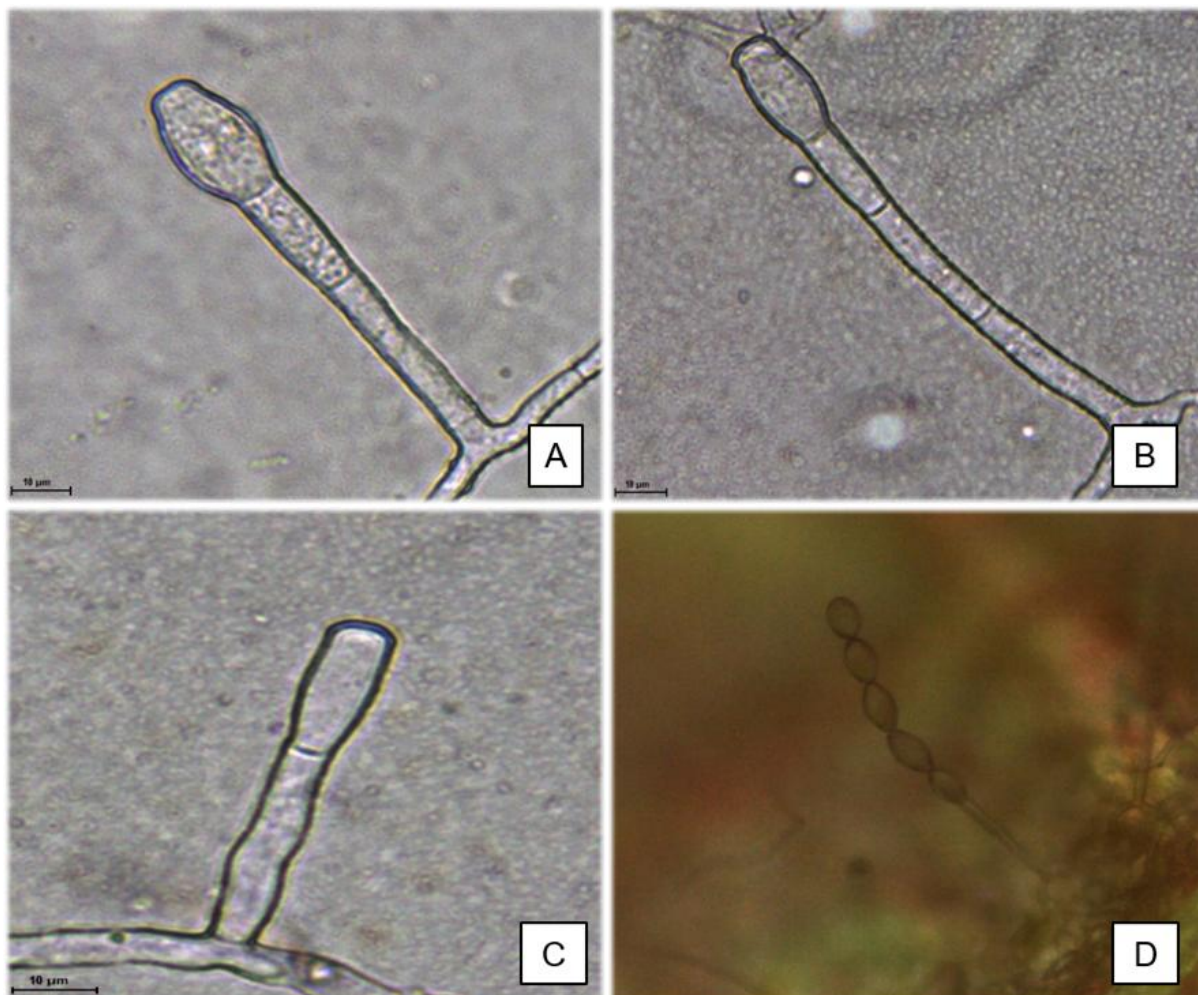
Figura 6 — Tipos de apressórios da hifa. A) Apressório do tipo lobulado; B) - F) apressórios multilobulados; G) - H) apressórios dispostos em lados opostos da hifa; I) apressórios dispostos em sequência ao longo da hifa.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Os conidióforos são eretos, cilíndricos, sem ramificações, formados em cima de hifas suporte, e variou de 30,16-151,11 µm (média = 70,33 µm) de comprimento. A célula basal é ereta, cilíndrica, variou de 11,6-75,37 µm (média = 27,02 µm) de comprimento e 4,64 – 9,98 µm (média = 7,01 µm) de largura, seguida de uma a três células adicionais, podendo ser mais que três ou inexistir. A posição do septo basal variou de 0-8,89 µm (média = 0,74). No ápice do conidióforo, os conídios são produzidos individualmente (não catenulados), às vezes aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias) de dois ou mais conídios (Figura 7).

Figura 7 — Tipos de conidióforos. A) Conidióforo não catenulado com uma célula adicional; B) Conidióforo não catenulado com duas células adicionais; C) Conidióforo não catenulado sem célula adicional; D) Conídios aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Os conídios são elipsóides, cilíndricos, ovóides a doliforme, sem corpos de fibrosina, 15,96-43,49 µm (média = 31,74 µm) em tamanho, 12,18-28,42 µm (média = 18,84 µm) de largura, 1,05-2,71 µm (média = 1,69 µm) de relação comprimento/largura. O conídio primário é ovóide – elipsóide, arredondado em um das partes apicais, enquanto que os conídios secundários são elipsóides, cilíndricos ou doliformes, sem parte apical arredondada. A germinação conidial é do tipo Polygoni, com tubos germinativos surgindo apical ou lateralmente, com apressórios lobulado ou multilobulado (Figura 8).

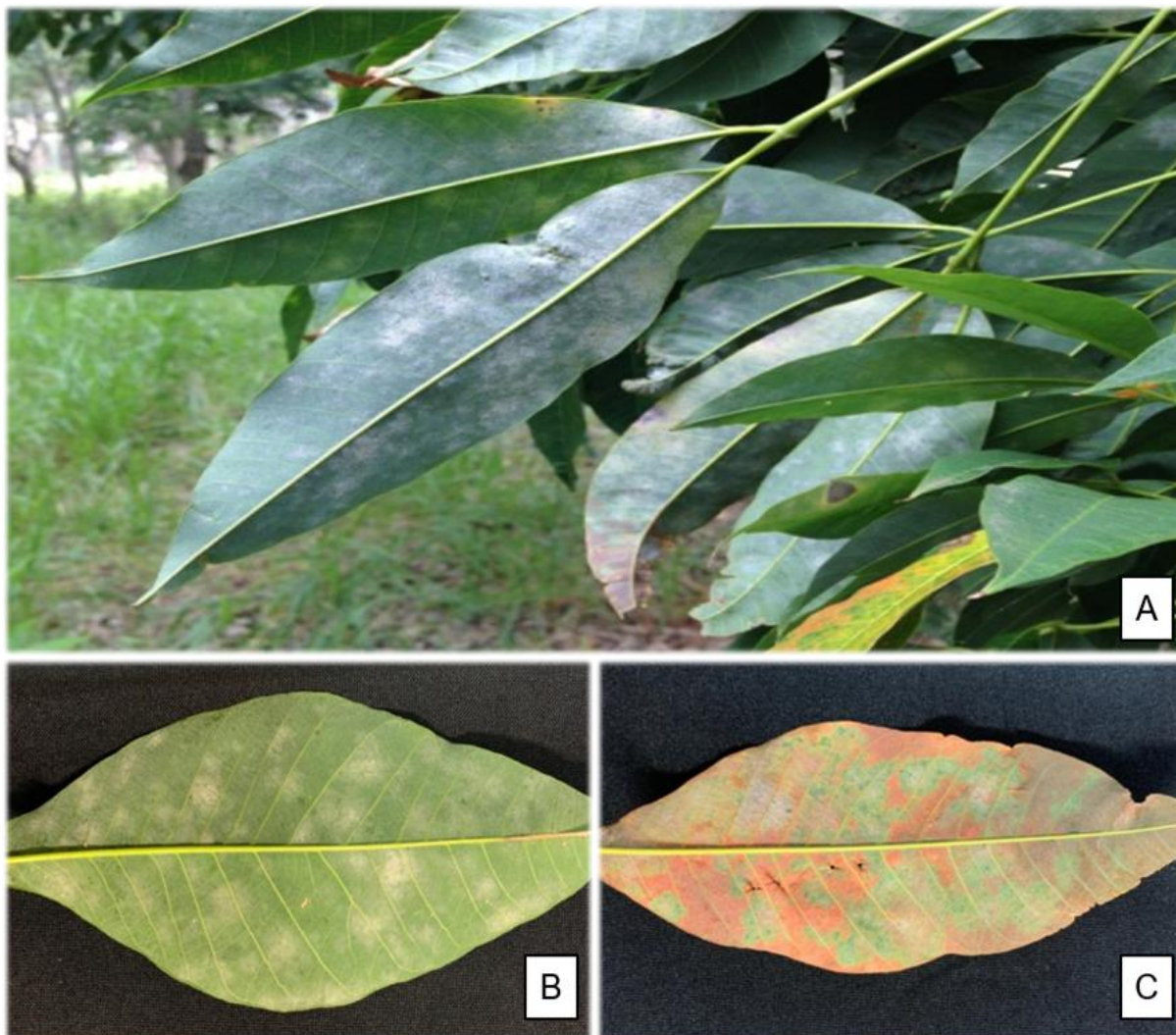
Figura 8 — Tipos de conídios. A) Conídio primário; B) Conídio secundário; C) Conídio germinado; D) Conídios.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Todas as amostras obtidas de folhas maduras (C e D), o desenvolvimento do micélio na folha é hipofilo, formando colônias dispersas pelo limbo foliar, cobrindo parcialmente ou completamente a folha (Figura 9).

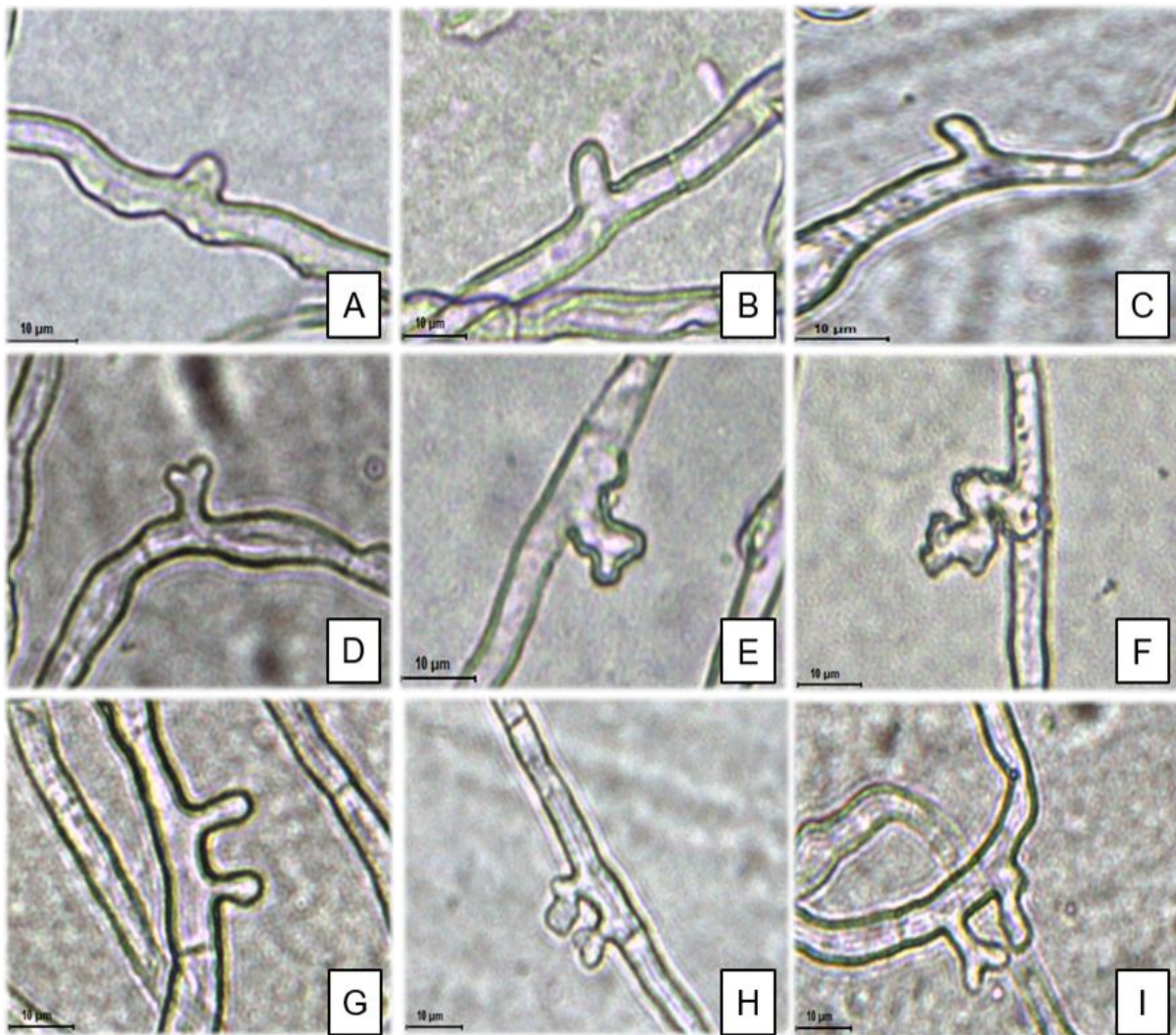
Figura 9 — A) Sinais de oídio em folhas maduras no campo; B) – C) Sinais do fungo na face abaxial das folhas.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

As hifas são hialinas, septadas, ramificadas, paredes finas, retas a flexíveis, com largura das células variando de 2,97 a 6,17 μm (média = 3,84 μm). O apressório da hifa é do tipo distinto, sua forma variou de lobulado a multilobulado, e sua disposição ocorre em lados opostos ou em seqüência ao longo da hifa, podendo ser um único apressório ou em pares (Figura 10).

Figura 10 — Tipos de apressórios da hifa. A) - C) Apressórios do tipo lobulado; D) - F) apressórios multilobulados; G) - I) apressórios em pares dispostos em sequência ao longo da hifa.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Os conidióforos são eretos, cilíndricos, sem ramificações, formados em cima de hifas suporte, variando de 45,66-191,7 μm (média = 85,02 μm) de comprimento. A célula basal é ereta, frequentemente torcida uma ou duas vezes, cilíndrica, variando de 11,06-67,91 μm (média = 31,29 μm) de comprimento e 4,14 – 9,95 μm (média = 6,4 μm) de largura, seguida de uma a três células adicionais, podendo ser mais que três ou inexistir, com septo basal variando de 0 a 6,57 μm (média = 0,5 μm). No ápice do conidióforo, os conídios são produzidos individualmente (não catenulados), às vezes aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias) de dois ou mais conídios (Figura 11).

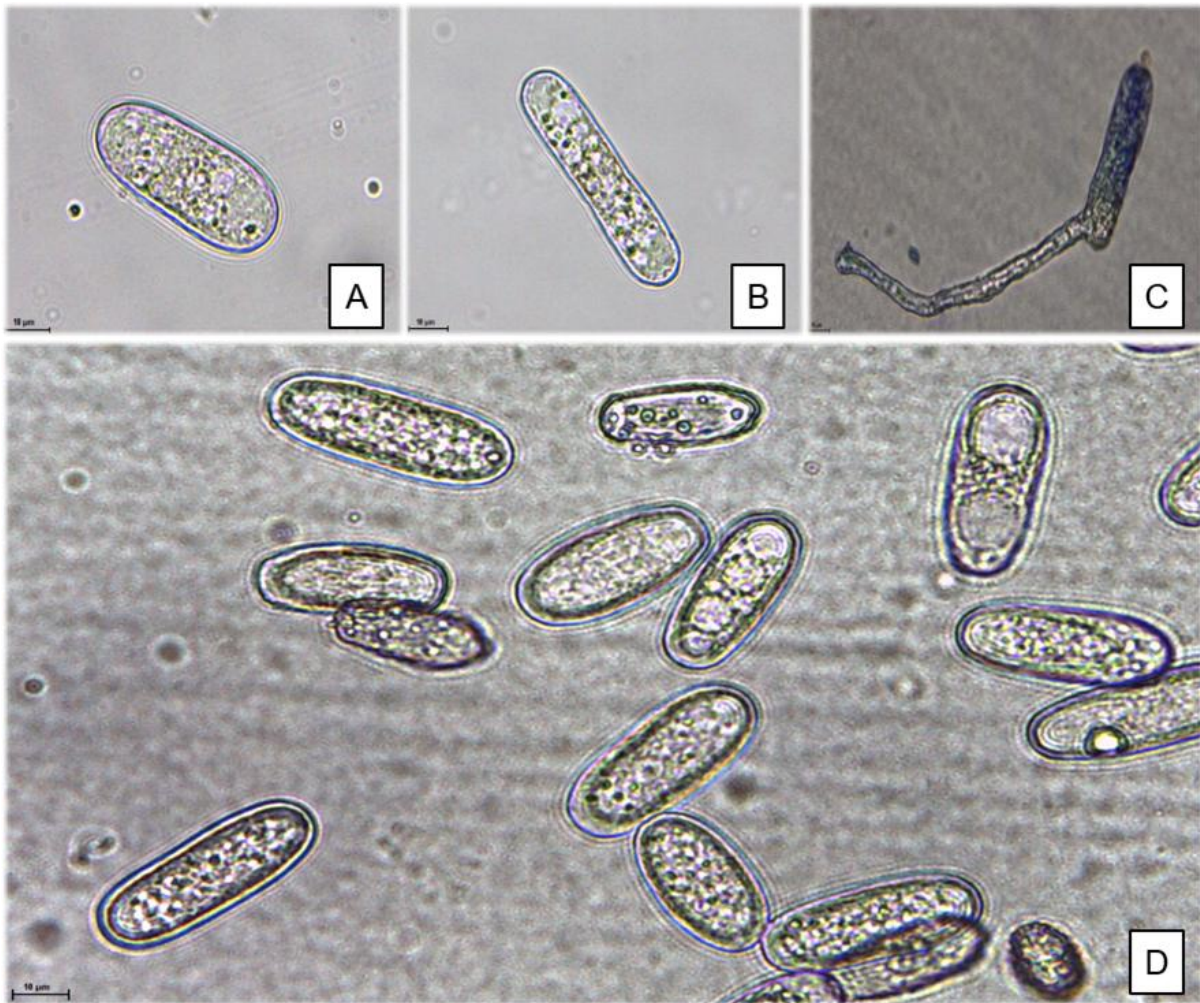
Figura 11 — Tipos de conidióforos. A) Conidióforo não catenulado com uma célula adicional; B) Conidióforo não catenulado com duas células adicionais; C) Conidióforo não catenulado sem célula adicional; D) Conídios aderindo às cadeias falsas (pseudo-cadeias).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Os conídios são elipsóides a cilíndricos, sem corpos de fibrosina, 23,9-55,3 μm (média= 35,67 μm) em tamanho, 10,19-19,79 μm (14, 65 μm) de largura, 1,51-4,08 μm (média = 2,45 μm) de relação comprimento/largura. O conídio são elipsóides a cilíndricos, arredondados em ambas as partes terminais. A germinação conidial é do tipo Polygoni, com tubos germinativos surgindo apical ou lateralmente, com apressórios lobulado ou multilobulados (Figura 12).

Figura 12 — Tipos de conídios. A) - B) - D) Conídios; C) Conídio germinado;

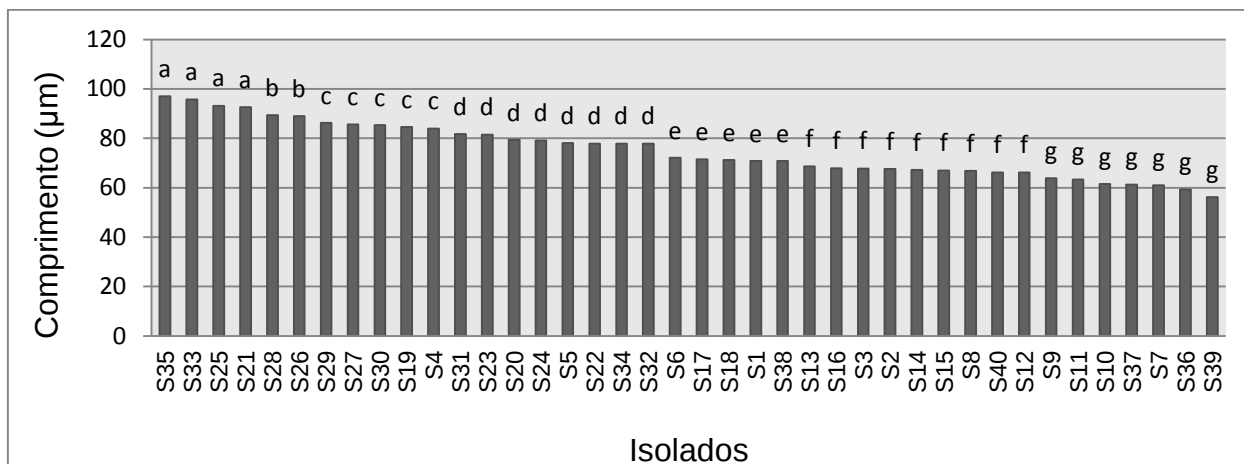


Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Foi observado diferenças nas dimensões das estruturas morfológicas dos isolados coletados em diferentes estágios fenológicos. Essas diferenças podem estar relacionadas à sobrevivência e evolução do patógeno em diferentes localizações geográficas sob diferentes condições climáticas (WU et al., 2019).

As maiores médias de comprimento do conidióforo se encontram no intervalo de 92,55 µm, de um isolado coletado de folhas maduras (S21), a 97,06 µm, coletado de folhas jovens (S35), não diferindo estatisticamente entre si. Os isolados que apresentaram o menor comprimento foram coletados de folhas jovens, apresentando intervalo de 56,25 µm (39) a 63,85 µm (S9) (Figura 13).

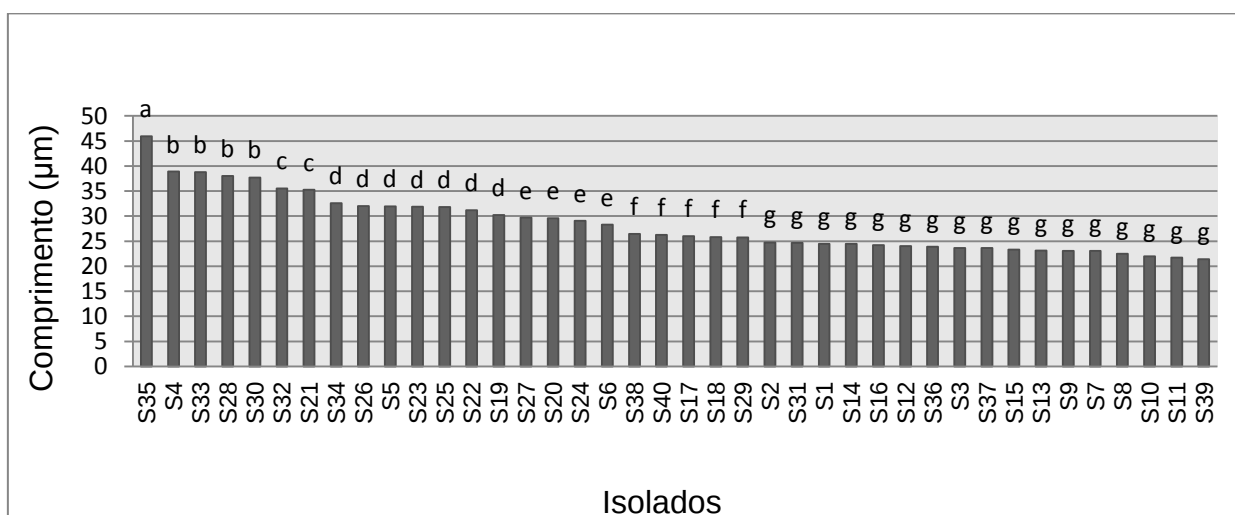
Figura 13 — Comprimento (μm) de conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

A maior média de comprimento da célula basal foi obtida de um isolado coletada de folhas jovens, com 45,91 μm (S35). Os isolados com menor comprimento apresentam intervalo de 21,38 μm (S39) a 24,75 μm (S2). Dentro do grupo de isolados que apresentaram o menor comprimento significativo, apenas um foi proveniente de folha madura (S31) (Figura 14).

Figura 14 — Comprimento (μm) da célula basal dos conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

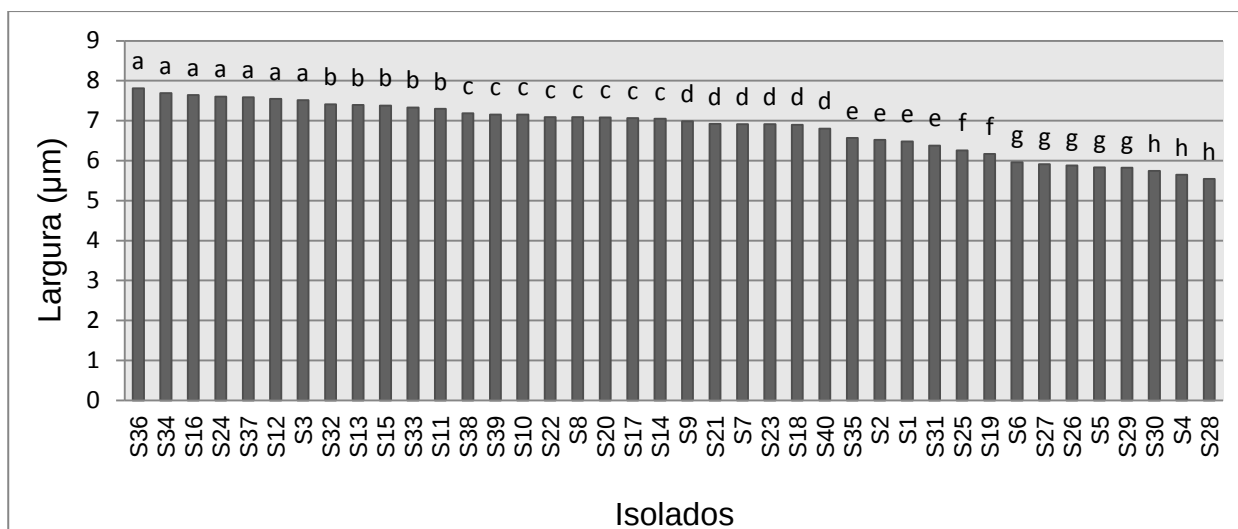


Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

As maiores médias de largura da célula basal foram de isolados apresentando intervalo de 7,51 μm (S3) a 7,80 μm (S36). Os isolados que apresentaram o menor

comprimento foram coletados de folhas maduras, apresentando intervalo de 5,54 μm (S28) a 5,74 μm (S30). Dentro do grupo de isolados que apresentaram o maior comprimento significativo, apenas um foi proveniente de folha madura (S24). E para o grupo de isolados que apresentaram menor comprimento, apenas um foi proveniente de folha jovem (S4) (Figura15).

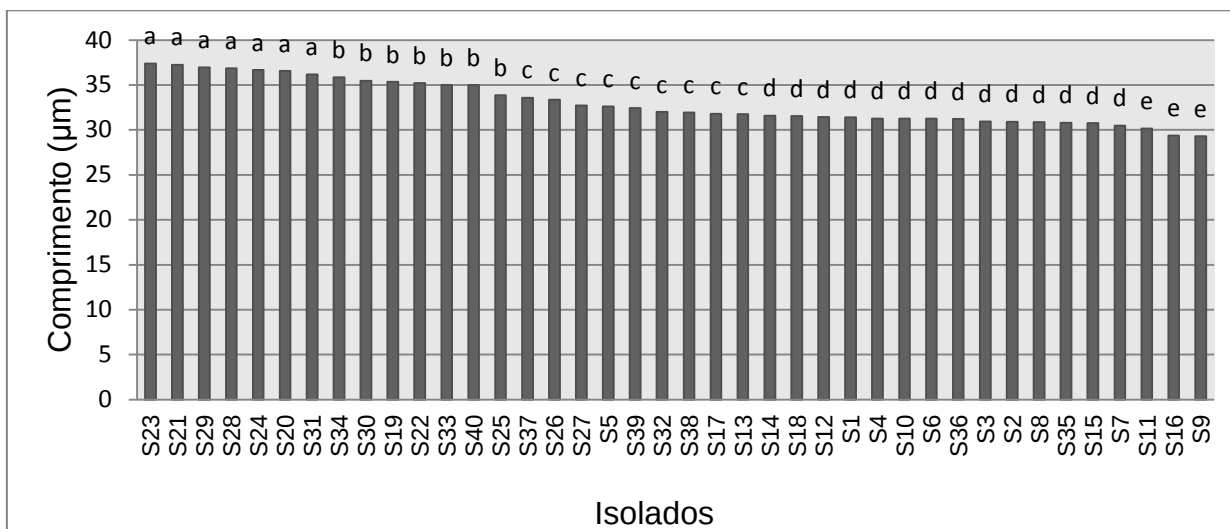
Figura 15 — Largura (μm) da célula basal dos conidióforos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

As maiores médias de comprimento dos conídios foram dos isolados obtidos de folhas maduras, apresentando intervalo de 36,56 μm (S31) a 37,38 μm (S23). Os isolados que apresentaram o menor comprimento foram coletados de folhas jovens, apresentando intervalo de 29,31 μm (S9) a 31,58 μm (S14) (Figura 16).

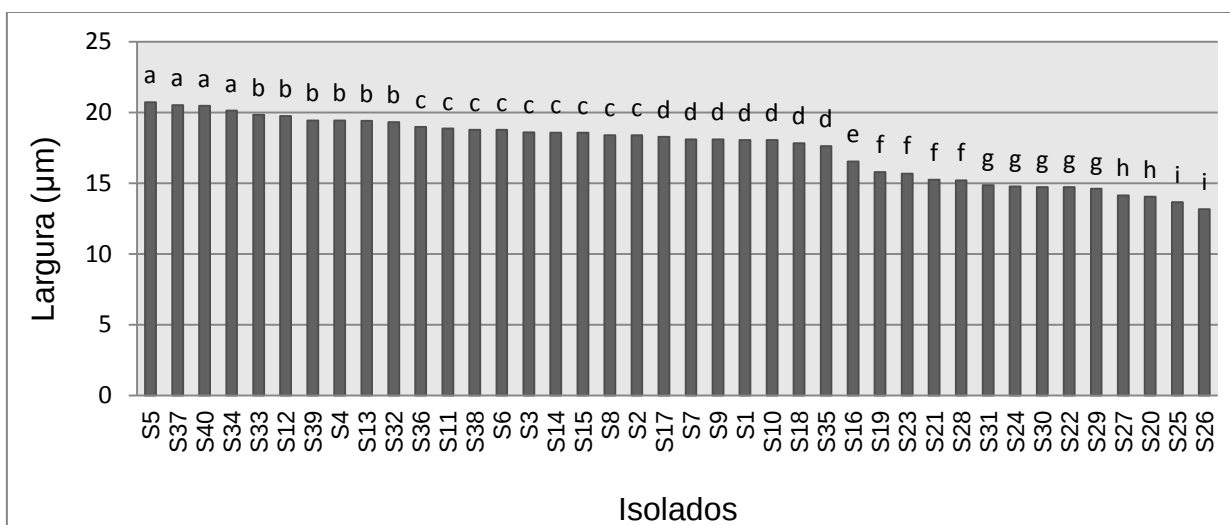
Figura 16 — Comprimento (μm) dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Com relação à variável largura dos conídios, os isolados coletados de folhas jovens, apresentaram os maiores valores, entre 16,54 μm (S16) e 20,72 μm (S5), também variando entre eles. Já os conídios coletados de folhas maduras apresentaram os menores valores, entre 13,16 μm (S26) e 15,77 μm (S19) (Figura 17).

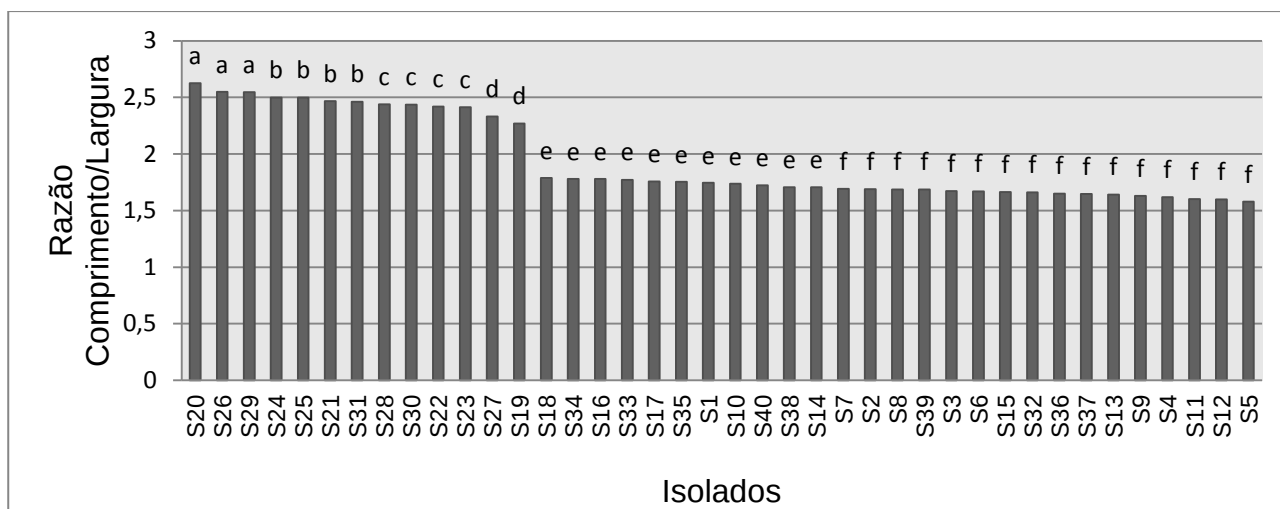
Figura 17 — Largura (μm) dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Os conídios isolados de folhas maduras apresentaram os maiores valores de razão comprimento/ largura, variando entre 2,26 μm (S19) e 2,62 μm (S20). Já os isolados obtidos dos tecidos jovens apresentaram valores entre 1,57 μm (S5) e 1,78 μm (S18). Entretanto, foram observadas diferenças entre os isolados oriundos de folha jovem, assim como entre os isolados obtidos de folha madura (Figura 18).

Figura 18 — Razão comprimento/ largura dos conídios. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

A mensuração das variáveis relacionadas ao conidióforo, como comprimento, comprimento e largura das células basal (Figuras 13, 14, 15, respectivamente) não são confiáveis para distinguir isolados coletados de folhas jovens e de folhas maduras. Existem isolados de folhas jovens (S33) (Figura 13) com o mesmo comprimento de conidióforos que folhas maduras (S25) (Figura 13), o que dificulta inferir sobre o estágio fonológico da folha de onde foram coletados.

Já as variáveis relacionadas aos conídios, como comprimento, largura, e razão comprimento/largura (Figuras 16, 17, 18, respectivamente) permitiram a diferenciação dos conídios coletados de folhas jovens daqueles de folhas maduras. Conídios obtidos de folhas maduras apresentaram maior comprimento, menor largura e consequentemente maior razão comprimento/largura que os conídios obtidos de folhas jovens. Resultado semelhante foi encontrado por Honorato et. al. (2006), caracterizando isolados de oídio do cajueiro de diferentes órgãos da planta.

Segundo Honorato et al. (2006), a razão comprimento/largura nos permite inferir a respeito da forma do conídio. Quanto maior o valor dessa variável, mais afilado (elipsóide a cilíndrico) é a estrutura. E quanto menor este valor, mais arredondado (ovóide) é o conídio. Com base nessa informação, é possível afirmar que os conídios oriundos de folhas maduras são mais próximos ao formato elipsóide, pois possuem o comprimento 2,26 a 2,62 vezes maiores que a largura, enquanto os isolados de folhas jovens se aproximam do formato ovóide, pois possuem 1,57 a 1,78 vezes o comprimento maior que a largura.

Em caracterizações morfológicas do oídio em seringueira, Linkaiasang et al. (2005) e Lyanage et al. (2017) observaram que geralmente o tamanho dos conídios e o comprimento da célula basal são maiores na face abaxial das folhas. Neste trabalho, quanto ao comprimento dos conídios, as maiores médias foram dos isolados coletados da face abaxial das folhas (S23, S21, S29, S28, S24, S20, S31) (Figura 16). Os isolados que apresentaram o menor comprimento foram coletados da face adaxial de folhas jovens (S14, S18, S12, S1, S10, S6, S36, S3, S2, S8, S35, S15, S7, S11, S16, S9) (Figura 16), com exceção de uma amostra coletada da face abaxial (S4) (Figura 16). Em relação à célula basal, dentro do grupo de isolados que apresentaram as maiores médias de comprimento, três foram coletadas da parte abaxial das folhas (S4, S28, S30) (Figura 14). Entre os isolados com menor comprimento, apenas um foi proveniente da face abaxial da folha (S31) (Figura 14). Segundo ROSSETTI (1958), os conídios que se formam na face abaxial das folhas, ficam protegidos da incidência de raios solares e encontram junto às nervuras foliares melhores condições de umidade para sua sobrevivência.

Com base na mensuração das estruturas assexuadas do fungo, foi possível diferenciar morfológicamente os isolados coletados de folhas maduras dos isolados coletados de folhas jovens. Entretanto, essas informações não são suficientes para assegurar a existência de mais de uma espécie infectando a seringueira, principalmente devido ao pleomorfismo que esses organismos apresentam (GLAWE, 2008). Além disso, a identificação de oídios em nível de espécie baseada apenas na descrição de características morfológicas de sua fase assexuada, não apresentam consistência taxonômica (LIYANAGE 2016, DESPREZ-LOUSTAU et al., 2017 MEEBOON E TAKAMATSU, 2020).

4.2 Caracterização molecular

As sequências da região ITS obtidas de folhas jovens (Genbank nº MT180481) compartilharam 99.83% (585/586, bases idênticas) de identidade, com o isolado OID 157 de *Erysiphe quercicola* de *Anacardium occidentale* (Genbank nº MK559490). As sequências da região 28s (Genbank nº MT182733) compartilharam 97.43% (987/1013, bases idênticas) de identidade, com o isolado MN165987 de *Erysiphe quercicola* de *Cassia fistula* (Genbank nº VIC48258).

As sequências da região ITS obtidas de folhas maduras (Genbank nº MT182958 and MT180480) compartilharam 99.35% (609/613, bases idênticas) e 99.51% (608/611, bases idênticas) de identidade, respectivamente, para o isolado PTM1 de *Erysiphe necator* de *Vitis vinifera* (Genbank MK357386). As sequências da região 28s (Genbank nº MT182732 and MT182949) compartilharam 97.93% (569/581bases idênticas, Genbank nº LC028996) e 99.28% (823/829bases idênticas, Genbank nº MK357423), respectivamente, para dois isolados de *Erysiphe necator* de *Vitis vinífera*.

4.3 Análise filogenética

Para a região ITS do DNA, a árvore com máxima parcimônia teve comprimento de 239 (índice de consistência = 0,74, índice de retenção = 0, 98 e índice de composição = 0,78). Os isolados utilizados se distribuíram em clados distintos na árvore filogenética (Figura 19). Em um clado se encontra o isolado obtido de folhas jovens (BTU_BR), agrupado com sequências de *Erysiphe quercicola* em diferentes hospedeiros. Em outro clado, se encontra o isolado obtido de folhas maduras (SM_BR), agrupado com sequências de *Erysiphe necator* em diferentes hospedeiros.

Para a região 28S do rDNA, a árvore com máxima parcimônia teve comprimento de 191 (índice de consistência = 0.595041., índice de retenção = 0.815789 e índice de composição = 0.606503.) Os isolados utilizados se distribuíram em clados distintos na árvore filogenética (Figura 20). Em um clado se encontra o isolado obtido de folhas jovens (BTU_BR), agrupado com sequências de *Erysiphe quercicola* em diferentes hospedeiros. Em outro clado, se encontra o isolado obtido

de folhas maduras (SM_BR), agrupado com sequências de *Erysiphe necator* em diferentes hospedeiros.

A relação filogenética dos isolados de oídio deste trabalho, utilizando sequências das regiões ITS do DNA e 28S do rDNA, permitem demonstrar que os patógenos *Erysiphe Quercicola* e *Erysiphe necator* são agentes causais de oídio em seringueira, associados a diferentes estágios fenológicos foliares. Até o momento, apenas o patógeno *Erysiphe quercicola* é relatado como agente causal de oídio em seringueiras (LINKAIASANG et al., 2005; LIYANAGE et al., 2016; MEEBOON e TAKAMATSU, 2020), portanto, este é o primeiro relato de *Erysiphe necator* infectando seringueiras no mundo.

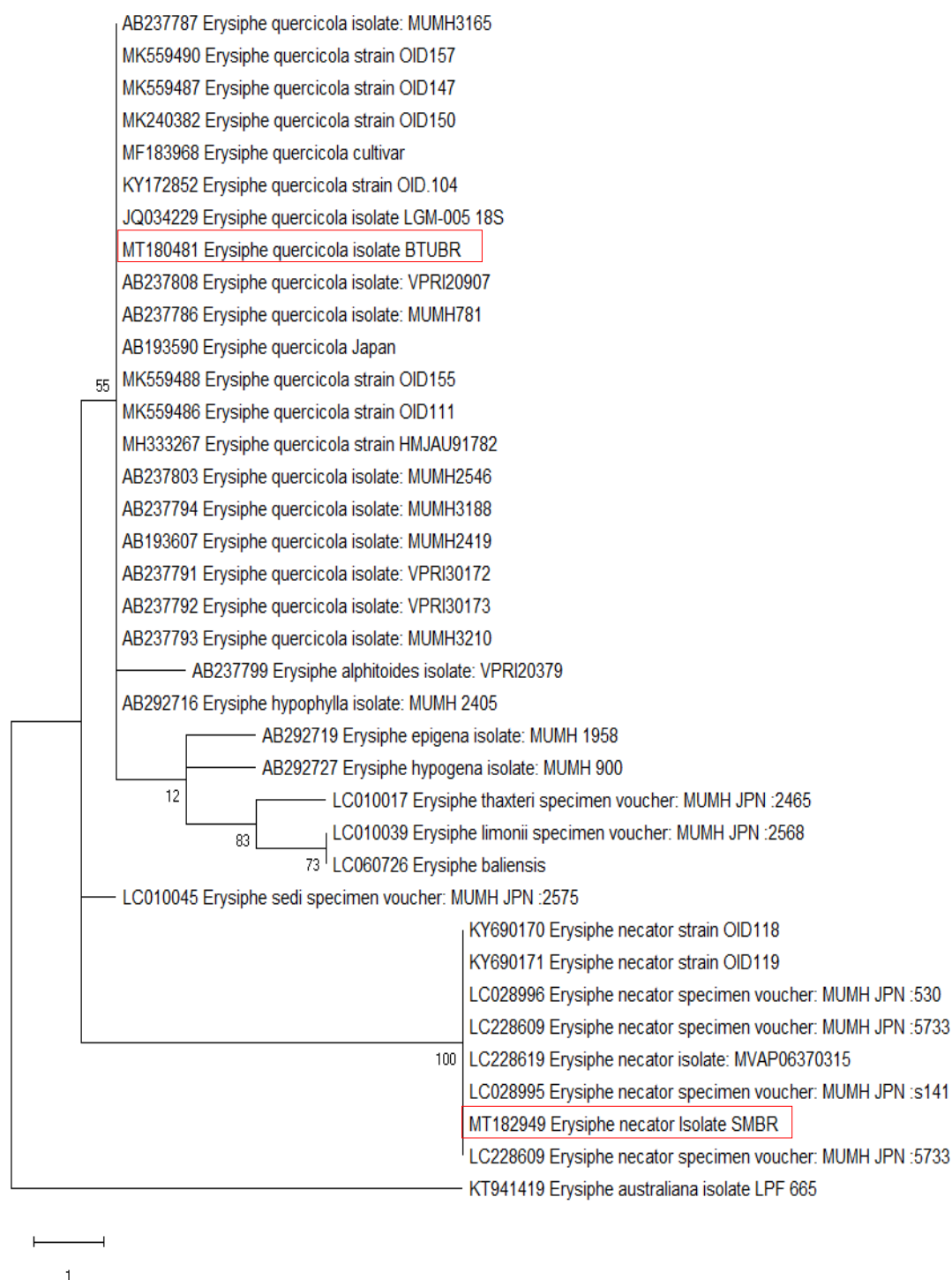
A faixa de hospedeiros de *Erysiphe necator* abrange plantas pertencentes às famílias Anacardiaceae (FONSECA et al., 2019), Caryocaraceae (BRAUN et al., 2017), Caricaceae (BRAUN et al., 2017), além de ser um dos principais patógenos da família Vitaceae (GADOURY et al., 2011), sendo este um primeiro registro deste fungo infectando um hospedeiro da família Euphorbiaceae.

Geralmente, os saltos de hospedeiros de fungos fitopatogênicos ocorrem principalmente entre espécies vegetais filogeneticamente relacionadas (BUFFORD et al., 2016). Entretanto, existem diversos relatos de espécies da ordem Erysiphales infectando uma ampla faixa de hospedeiros filogeneticamente distantes (CUNNINGTON et al., 2005; LIBERATO; CUNNINGTON, 2006; TAKAMATSU et al., 2007; KIRSCHNER, 2010; BEENKEN, 2017). Este fato é observado para *Erysiphe necator*, originalmente infectando plantas da família Vitaceae (ordem Vitales), expandiu sua faixa de hospedeiros para espécies tropicais da família Anacardiaceae (ordem Sapindales) (FONSECA et al., 2019b), família Caryocaraceae (ordem Malpighiales) (BRAUN et al., 2017) e família Euphorbiaceae (ordem Malpighiales).

Esses resultados confirmam o recente desafio da taxonomia convencional de Erysiphales baseada na suposta especificidade entre patógeno e hospedeiro restrita ao nível de família da planta hospedeira (CUNNINGTON et al., 2005; LIBERATO; CUNNINGTON, 2006; TAKAMATSU et al., 2007; KIRSCHNER, 2010; BEENKEN, 2017). Como a identificação de fungos fitopatogênicos freqüentemente se baseia na identificação da planta hospedeira, infecções em hospedeiros não relatados resultam na descrição errônea de novas espécies, que posteriormente podem ser reduzidas a sinonímia de outras espécies (TAKAMATSU et al., 2007; BEENKEN, 2017)

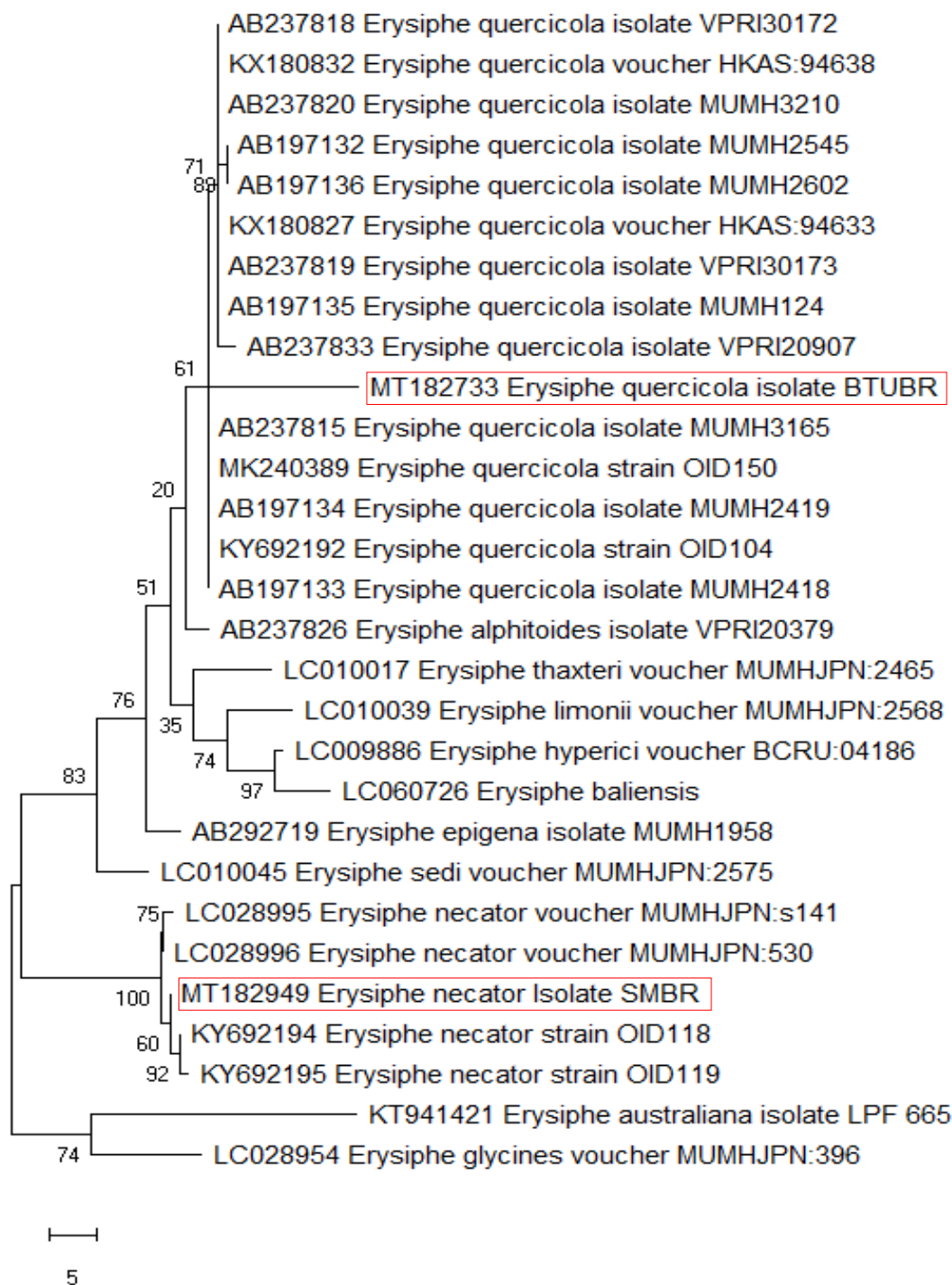
Como *Erysiphe necator* amplia sua lista de hospedeiros no Brasil, inoculações cruzadas entre outras famílias e ordens de plantas hospedeiras deste patógeno, contribuem para o entendimento do processo de infecção do fungo e também dos mecanismos de resistência das plantas (BEENKEN, 2017; MEEBOON e TAKAMATSU, 2020). Consequentemente, verificar se a seringueira contribui com epidemias de oídio em outras espécies hospedeiras, seja como fonte de inóculo ou hospedeiro alternativo.

Figura 19 — Árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia (MP), utilizando sequências da região ITS do DNA de espécies do gênero *Erysiphe*. Em cada nó estão indicados os valores de bootstrap, com 1500 repetições. As sequências utilizadas deste estudo estão em destaque.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Figura 20 — Árvore filogenética construída pelo método de máxima parcimônia (MP), utilizando sequências da região 28S do rDNA de espécies do gênero *Erysiphe*. Em cada nó são indicados os valores de bootstrap, com 1500 repetições. As sequências utilizadas deste estudo estão em destaque.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

4.4 Teste de patogenicidade

As plantas inoculadas com *Erysiphe quercicola* apresentaram os primeiros sinais do patógeno aos quatro dias após a inoculação, na face adaxial das folhas, em estágios fonológicos entre B e C (Figura 21). Para as plantas inoculadas com *Erysiphe necator*, os primeiros sinais foram observados dez dias após as inoculações, na face adaxial das folhas, em estágios fonológicos entre C e D (Figura 22). Para ambos os patógenos, os sintomas manifestados após as inoculações foram os mesmos que o das folhas naturalmente infectadas. A morfologia do fungo após os testes de patogenicidade são idênticas a dos fungos inoculados inicialmente, comprovados também pela caracterização molecular. As plantas não inoculadas permaneceram assintomáticas.

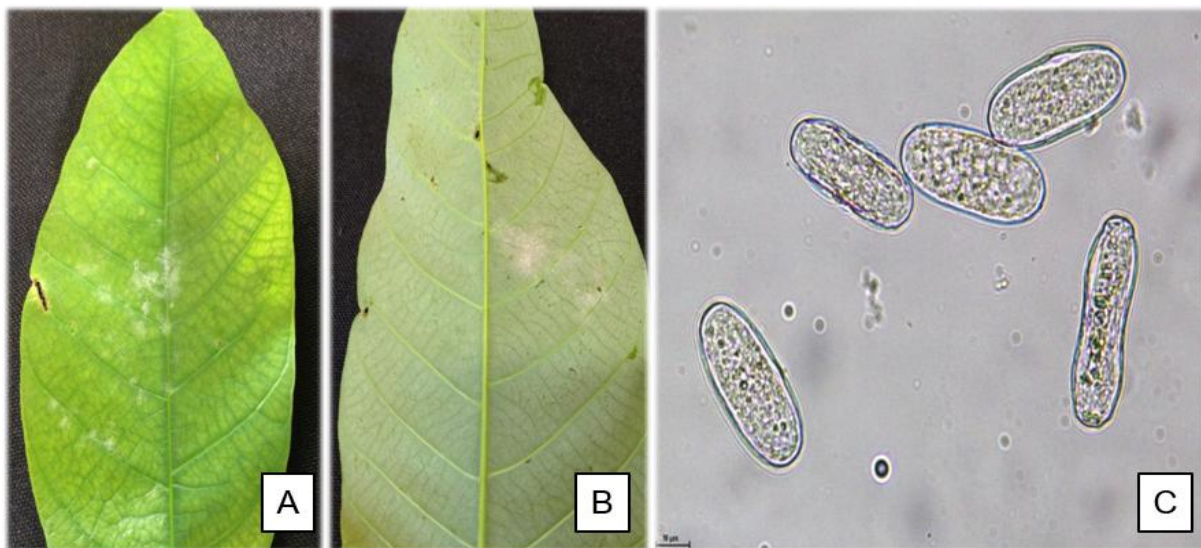
O período de incubação para *Erysiphe quercicola* em seringueira, varia de uma a três semanas em folhas jovens, e cinco a seis semanas em folhas maduras (FURTADO e SILVEIRA, 1993; TAM et al., 2016; WU et al., 2019). O período de incubação para *Erysiphe necator* em seringueira foi semelhante ao encontrado por Fonseca et al., (2019b), observando os primeiros sintomas do patógeno aos sete e dezoito dias após as inoculações em folhas jovens e maduras, respectivamente, de *Anarcadium occidentale*.

Figura 21 — Teste de patogenicidade. A) Folhas apresentando os primeiros sinais de *Erysiphe quercicola* na face adaxial aos 4 dias após a inoculação; B) Progresso dos sintomas; C) conídios do fungo.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

Figura 22 — Teste de patogenicidade. A) Folhas apresentando os primeiros sinais de *Erysiphe necator* na face adaxial aos 10 dias após a inoculação; B) Progresso dos sintomas; C) conídios do fungo.



Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

A incidência e a severidade dos sintomas da doença foram realizadas aos vinte dias após as inoculações, quando todas as plantas estavam sintomáticas. A severidade foi calculada com auxílio de uma escala diagramática, onde para a composição das médias de severidade, em cada planta foi avaliado cinco folíolos, totalizando quinze folhas avaliadas por planta, em um total de cinco plantas inoculadas para cada patógeno. As médias de severidade são apresentadas em porcentagem na Tabela 4.

Quadro 3 — Médias de severidade aos 20 dias após a inoculação. *Corresponde a severidade média para cada patógeno.

Patógeno	Severidade (%)					
	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Planta 5	Total*
<i>E. necator</i>	4,5	3,5	0,5	1,5	1	2,2
<i>E. quercicola</i>	6	3,0	4,5	3,5	3,5	4,1

Fonte: Lisandro Pieroni (2019).

As maiores médias de severidade foram observadas para as plantas inoculadas com *Erysiphe quercicola*. Estudando a associação de *Erysiphe necator* e *Erysiphe quercicola* em *Anarcadium occidentale*, Fonseca et al. (2019b), observaram que em

condições naturais, *Erysiphe necator* está associado apenas com folhas maduras. Posteriormente, os autores demonstraram com testes de patogenicidade que o patógeno também infecta folhas jovens com a mesma agressividade que *Erysiphe quercicola*. Neste trabalho, *Erysiphe necator* foi encontrado apenas em associação com folhas maduras, tanto em condições naturais como nos testes de patogenicidade. Fonseca et al. (2019b), levanta a hipótese que condições de luminosidade poderiam ser o fator principal que afeta a não infecção de *Erysiphe necator* em tecidos foliares jovens em condições de campo. Sugere-se que *Erysiphe quercicola* possui uma vantagem ecológica em relação a *Erysiphe necator* para infectar determinados hospedeiros, considerando que em seringueira, *Erysiphe quercicola* apresentou menor tempo de incubação e maior severidade em tecidos jovens.

5 CONCLUSÕES

Com base em evidências morfológicas, moleculares e patogênicas, concluímos que duas espécies de fungos causadores de oídio estão associadas à seringueira, *Erysiphe quercicola* infectando folhas jovens e *Erysiphe necator* infectando folhas maduras.

Este é o primeiro relato de *Erysiphe necator* infectando seringueiras no mundo, e o primeiro registro deste fungo infectando um hospedeiro da família Euphorbiaceae.

Características morfológicas da fase assexuada de fungos causadores de oídio não são confiáveis para sua identificação em nível de espécie.

REFERÊNCIAS

- AUER, C. G. Oídios de espécies florestais. **Oídios. Brasil: Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente**, p. 391-418, 2001.
- BAISWAR, P. et al. *Erysiphe quercicola*, a powdery mildew fungus on Khasi mandarin in North East India. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, n. 1, p. 30, 2015.
- BEENKEN, L. First records of the powdery mildews *Erysiphe platani* and *E. alphitoides* on *Ailanthus altissima* reveal host jumps independent of host phylogeny. **Mycological progress**, v. 16, n. 2, p. 135-143, 2017.
- BOESEWINKEL, HANS J. The morphology of the imperfect states of powdery mildews (Erysiphaceae). **The Botanical Review**, v. 46, n. 2, p. 167-224, 1980.
- BOITEUX, L. S. et al. Powdery Mildew Caused by *Erysiphe heraclei*: A Novel Field Disease of Carrot (*Daucus carota*) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1544-1544, 2017.
- BRAUN, U. et al. Powdery mildew species on papaya—a story of confusion and hidden diversity. **Mycosphere**, v. 8, p. 1403-1423, 2017.
- BUFFORD, J. L. et al. Taxonomic similarity, more than contact opportunity, explains novel plant–pathogen associations between native and alien taxa. **New Phytologist**, v. 212, n. 3, p. 657-667, 2016.
- CARDOSO, J. E. et al. First report of *Erysiphe quercicola* causing powdery mildew on cashew in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 7, p. 1327, 2017.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Borracha Natural. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-borracha-natural>. Acesso em: 18 fev. 2020
- COOK, R. T. A.; INMAN, A. J.; BILLINGS, C. Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. **Mycological Research**, v. 101, n. 8, p. 975-1002, 1997.
- CORDEIRO, I., SECCO, R. 2015. *Hevea* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22703>>. Acesso em: 14 jan. 2020.
- CORNISH, K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species. **Natural product reports**, v. 18, n. 2, p. 182-189, 2001.

CUNNINGTON, J. H. et al. Molecular identification of anamorphic powdery mildews (Erysiphales). **Australasian Plant Pathology**, v. 32, n. 3, p. 421-428, 2003.

DALLAGNOL, L. J. et al. First report of powdery mildew on flamboyant tree caused by *Erysiphe quercicola* in Brazil. **Plant disease**, v. 96, n. 4, p. 589-589, 2012.

DE OLIVEIRA, T. S. et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe platani* on *Platanus× acerifolia* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Plant disease**, v. 99, n. 1, p. 157-157, 2015

DESPREZ-LOUSTAU, Marie-Laure et al. Further support of conspecificity of oak and mango powdery mildew and first report of *Erysiphe quercicola* and *Erysiphe alphitoides* on mango in mainland Europe. **Plant disease**, v. 101, n. 7, p. 1086-1093, 2017.

DE SOUZA GONÇALVES, Paulo; CARDOSO, Mário; ORTOLANI, Altino Aldo. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*; uma revisão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990.

DORNELES, K. R. et al. First Report of Powdery Mildew Caused by *Erysiphe quercicola* on Curly Dock (*Rumex crispus*) in Brazil. **Plant disease**, v. 103, n. 3, p. 588-588, 2019.

DORNELES, K. R.; DALLAGNOL, L. J.; RIVERA, J. F. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on *Cinnamomum camphora* in Brazil. **Plant disease**, v. 102, n. 4, p. 822, 2018.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. 1987.

DUCKE, A.; BLACK, G.A. Nota sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira. Belém: Instituto Agronômico do Norte. Boletim **Técnico do Instituto Agronômico do Norte, Belém**, v. 29, 62 p., 1954.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERNANDO, T. M. Oidium leaf disease-the effect of environment and control measures on incidence of disease and atmospheric spore concentration. 1971.

FONSECA, N. R. et al. *Erysiphe australiana*: the cause of powdery mildew on *Lagerstroemia speciosa* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 46, n. 4, p. 366-368, 2016.

FONSECA, W. L. et al. First Report of *Erysiphe quercicola* Causing Powdery Mildew in *Bixa orellana* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 6, p. 1424-1424, 2019.

FONSECA, W. L. et al. *Clitoria fairchildiana*, new host of anamorphic *Erysiphe quercicola* in Brazil. **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, n. 6, p. 453-457, 2019a

FONSECA, W. L. et al. Morphological, molecular phylogenetic and pathogenic analyses of *Erysiphe* spp. causing powdery mildew on cashew plants in Brazil. **Plant Pathology**, v. 68, n. 6, p. 1157-1164, 2019b.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BUENO, C.R.F.; BAPTISTELLA, C.S.L. A Cultura da Seringueira no Estado de São Paulo. São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 9, 2004.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. Nova ocorrência de oídio da seringueira no Estado de São Paulo. **São Paulo: Instituto Biológico**, 1993.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da Seringueira no Brasil. 2. ed. Brasília-DF: Embrapa**, 2012, 255p.

GASPAROTTO, L. et al. Capítulo 3: Doenças das raízes. **Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Brasília, DF**, p. 217-226, 2012a.

GASPAROTTO, L. et al. Capítulo 3: Doenças do caule. **Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Brasília, DF**, p. 177-215, 2012b.

GASPAROTTO, L. et al. Capítulo 3: Doenças das folhas. **Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Ocidental. Brasília, DF**, p. 39-176, 2012c.

GLAWE, D. A. The powdery mildews: a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, 2008.

GONÇALVES, P. S. et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 131-138, 2002.

GONÇALVES, P.S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A.A. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*: uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990.

HAMMETT, K. R. W. Taxonomy of Erysiphaceae in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 15, n. 4, p. 687-711, 1977.

IBÁ. 2019. Relatório, **Indústria Brasileira de Árvores**. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>. Acesso em 2 fev. 2020.

OLIVEIRA, M. D. O.; GONÇALVES, E. C. P. **Custo de produção e rentabilidade da cultura da seringueira: safra 2018/19. Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo**, v. 14, n. 2, p. 1-7, fev. 2019. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-09-2019.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.

JONES, K. P. Natural rubber as a green commodity—Part II. **Rubber Dev**, v. 47, p. 37-41, 1994.

KIRSCHNER, R.; LIU, Wei-An. Two new hosts of anamorphic *Erysiphe quercicola*: *Cinnamomum camphora* and *Murraya paniculata*. **Mycoscience**, v. 55, n. 3, p. 190-195, 2014.

KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LAU, Nyok-Sean et al. The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis. **Scientific reports**, v. 6, p. 28594, 2016.

LIMKAISANG, S. et al. Molecular phylogenetic and morphological analyses of *Oidium heveae*, a powdery mildew of rubber tree. **Mycoscience**, v. 46, n. 4, p. 220-226, 2005.

LIYANAGE, K. K. et al. Powdery mildew disease of rubber tree. **Forest Pathology**, v. 46, n. 2, p. 90-103, 2016.

LIYANAGE, K. K. et al. Taxonomic revision and phylogenetic analyses of rubber powdery mildew fungi. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 185-195, 2017.

LOPEZ, S. E.; RIVERA, M. C. Biología y patología de los oídios. Stadnik, MJ; Rivera, MC **Oídios. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 59-78, 2001..

MEEBOON, J.; TAKAMATSU, S.. Hosts of asexual morph of *Erysiphe quercicola* from Thailand. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-14, 2020.

MORI, Y.; SATO, Y.; TAKAMATSU, S. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. **Mycologia**, v. 92, n. 1, p. 74-93, 2000.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford university press, 2000.

PERIES, O. S. Host induced change in the morphology of a powdery mildew fungus. **Nature**, v. 212, n. 5061, p. 540-541, 1966.

PIVETA, G.; MARCOLIN, G.; GARCIA, F. A. O. First report of *Erysiphe quercicola* S. Takam. & U. Braun in *Quercus robur* Linnaeus in Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 86-87, 2018.

PRIYADARSHAN, P. M. et al. **Biology of Hevea rubber**. Wallingford, UK: CABI, 2011.

RAMAKRISHNAN, T. S. et al. *Jatropha curcas*, L., a collateral host for *Oidium heveae*, Stein. **Current Science**, v. 32, n. 9, 1963.

RAMOS, L. M. A. et al. Variação intraespecífica na anatomia do lenho de *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Mull. Arg. relacionada à extração de látex. **Floresta**, v. 48, n. 2, p. 255-264, 2018.

ROSSETTI, V. O oídio da seringueira. **O Biológico**, v. 24, p. 160-267, 1958.

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea spp.*) visando resistência ao *Microcyclus ulei***. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia /Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. Botucatu. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97251/sambugaro_r_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 07 jan. 2020

SHARPLES, Arnold. Diseases and pests of the rubber tree. : Macmillan and co., limited,, 1936.

SOUZA, I. A. de. Sangria da seringueira: guia prático para o seringueiro. 2013. Disponível em: <<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/item/487/1/Sangria-da-Seringueira-2013-AInfo.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

SOUZA, I. A. **Avaliação de clones de seringueira (*Hevea spp.*) em Piracicaba – SP**. 2007. Dissertação (mestrado) .Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-31032008-163710/publico/itamaralvinosouza.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2020

STADNIK, M. História e Taxonomia de oídios. **Oídios. Brasil: Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 391-418, 2001..

STEINMANN, A. De ziekten en plagen van *Hevea brasiliensis* in Nederlandsch-Indie. 1925.

TAKAMATSU, S. et al. Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. **Mycological Research**, v. 111, n. 7, p. 809-826, 2007.

TAKAMATSU, S.; KANO, Y. PCR primers useful for nucleotide sequencing of rDNA of the powdery mildew fungi. **Mycoscience**, v. 42, n. 1, p. 135-139, 2001.

TAM, L. T. T. et al. First report of powdery mildew caused by *Erysiphe quercicola* on *Hevea brasiliensis* in Viet Nam. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1239-1239, 2016.

TUMURA, Karina Goulart et al. Avaliação de clones de seringueira quanto à resistência ao oídio. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 252-257, 2013.

VAN BEILEN, J. B.; POIRIER, Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. **TRENDS in Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 522-529, 2007.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WILCKEN, Silvia Renata Siciliano et al. Nematoides fitoparasitas em seringais do estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 1, p. 54-57, 2015.

WU, Hua et al. Molecular identification of the powdery mildew fungus infecting rubber trees in China. **Forest Pathology**, v. 49, n. 5, p. e12519, 2019.

APÊNDICES

Apêndice 1 — Características morfológicas dos isolados de oídios utilizados neste estudo.

CARACTERÍSTICAS	S1	S2	S3	S4
Hifas				
Hialinas	+	+	+	+
Septadas	+	+	+	+
Apressório	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
Largura	2,85 - 5,50 (3,87)	3,36 - 5,2 (3,98)	2,94 - 5,15 (3,94)	3,39 - 6,17 (4,23)
Conídio				
Conidiogenese	Não catetulado	Não catetulado	Não catetulado	Não catetulado
Formato	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide
Comprimento (µm)	24,57 - 38,88 (31,41)	23,81 - 37,57 (30,91)	25,78 - 39,49 (30,92)	24,8 - 40 (31,27)
Largura (µm)	14,37 - 21,11 (18,05)	14,47 - 21,5 (18,37)	14,37 - 22 (18,59)	15,00 - 23,01 (19,42)
Razão C/L	1,47 - 2,21 (1,74)	1,35 - 1,98 (1,68)	1,22 - 2,12 (1,67)	1,28 - 2,17 (1,61)
Tudo germinativo	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
Corpos de fibrosina	-	-	-	-
Conidióforo				
Comprimento (µm)	51,93 - 92,77 (70,86)	43,79 - 86,69 (67,64)	53,87 - 86,69 (67,78)	48,2 - 134,57 (83,88)
Comprimento célula basal (µm)	13,05 - 38,28 (24,48)	16,49 - 37,46 (24,75)	15,73 - 36,52 (23,65)	15,16 - 75,37 (38,88)
Largura da célula basal (µm)	5,22 - 7,81 (6,48)	5,02 - 7,82 (6,51)	6,26 - 8,86 (7,51)	4,64 - 6,72 (5,64)
Posição do septo basal	0,0 - 1,4 (0,35)	0,0 - 4,6 (0,71)	0,0 - 2,9 (1,55)	0,0 - 6,31 (0,97)
Base da célula basal	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
Nº de células adicionais	0-2	0-2	0-2	0-3
Cleistótecio	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S5	S6	S7	S8	S9
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
2,99 - 5,14 (3,84)	3,36 - 4,84 (4,06)	3,32 - 5,46 (4,28)	2,92 - 6,4 (4,35)	2,98 - 5,51 (4,04)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme
26,08 - 40,82 (32,62)	24,09 - 38,59 (31,24)	21,98 - 36,81 (30,48)	26,26 - 39,17 (30,96)	21,98 - 38,06 (29,31)
17,09 - 24,33 (20,72)	14,38 - 22,63 (18,77)	12,65 - 21,45 (18,09)	14,47 - 20,73 (18,42)	12,65 - 22,19 (18,08)
1,27 - 2,07 (1,57)	1,26 - 2,08 (1,67)	1,38 - 2,24 (1,69)	1,31 - 2,51 (1,68)	1,32 - 2,20 (1,62)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
52,27 - 120,48 (78,12)	53,17 - 91,36 (72,10)	41,26 - 79,29 (60,96)	46,74 - 81,88 (66,75)	41,26 - 86,57 (63,85)
19,72 - 52,67 (31,94)	16,39 - 42,68 (28,30)	11,6 - 40,46 (23,04)	12,78 - 35,81 (22,45)	11,79-37,46 (23,08)
5,02 - 7,03 (5,83)	5,12 - 7,07 (5,96)	5,44 - 8,42 (6,91)	5,8 - 8,37 (7,11)	5,02 - 9,57 (6,98)
0,0 - 5,02 (0,64)	0,0 - 2,8 (0,64)	0 - 3,3 (0,57)	0 - 3,2 (0,60)	0 - 3,8 (0,63)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-2	1-2	0-2	0-2	0-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S9	S10	S11	S12	S13
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
2,98 - 5,51 (4,04)	2,94 - 6,32 (3,61)	3,07 - 4,88 (3,92)	2,98 - 5,41 (4,03)	2,99 - 5,14 (3,81)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme
21,98 - 38,06 (29,31)	22,44 - 38,77 (31,25)	23,21 - 37,86 (30,16)	26,14 - 39,33 (31,44)	24,39 - 38,42 (31,76)
12,65 - 22,19 (18,08)	14,77 - 21,19 (18,03)	15,96 - 21,56 (18,85)	16,44 - 22,42 (19,74)	16,29 - 22,42 (19,39)
1,32 - 2,20 (1,62)	1,36 - 2,20 (1,73)	1,33 - 1,96 (1,60)	1,22 - 2,19 (1,59)	1,36 - 1,90 (1,64)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
41,26 - 86,57 (63,85)	46,09 - 81,45 (61,51)	46,17 - 84,24 (63,36)	30,16 - 88,1 (66,18)	50,52 - 84,52 (68,65)
11,79-37,46 (23,08)	14,26 - 31,09 (22,00)	13,6 - 40,47 (21,7)	12,6 - 44,3 (24,02)	12,81 - 36,88 (23,11)
5,02 - 9,57 (6,98)	5,82 - 8,09 (7,15)	5,88 - 8,58 (7,29)	5,82 - 9,57 (7,54)	6,45 - 9,46 (7,39)
0 - 3,8 (0,63)	0 - 2,9 (0,60)	0 - 3,84 (0,67)	0 - 2,3	0 - 3,64 (0,66)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
0-2	0-2	0-2	0-2	0-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S14	S15	S16	S17	S18
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
3,01 - 4,97 (3,89)	2,98 - 5,68 (3,98)	3,09 - 5,87 (3,95)	3,24 - 6,40 (4,02)	3,39 - 5,15 (4,12)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme
25,60 - 40,39 (31,58)	26,27 - 38,36 (30,76)	15,96 - 37,16 (29,37)	26,22 - 40,39 (31,81)	24,57 - 40,17 (31,55)
15,45 - 22,00 (18,57)	15,67 - 21,02 (18,55)	12,18 - 21,65 (16,54)	14,09 - 22,85 (18,26)	13,15 - 21,41(17,81)
1,41 - 2,23 (1,70)	1,35 - 2,02 (1,66)	1,05 - 2,14 (1,78)	1,34 - 2,71 (1,75)	1,47 - 2,69 (1,78)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
47,68 - 98,28 (67,21)	47,71 - 86,58 (67,01)	51,7 - 82,33 (67,87)	54,87- 89,36 (71,53)	44,20 - 92,80 (71,22)
13,54 - 46,51 (24,45)	16,-86 - 36,13 (23,40)	12,4 - 36,23 (24,23)	16,09 - 41,09 (25,98)	13,76 - 39,02 (25,78)
6,12 - 8,13 (7,04)	6,45 - 9,40 (7,37)	5,22 - 9,98 (7,64)	5,4 - 9,16 (7,06)	5,19 - 8,54 (6,89)
0,0 - 7,4 (0,87)	0,0 -3,6 (1,01)	0,0 - 1,80 (0,33)	0 - 1,95 (0,30)	0,0 - 4,60 (0,59)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
0-2	0-2	0-2	0-2	0-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S19	S20	S21	S22	S23
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
3,24 - 5,13 (3,89)	3,30 - 4,96 (4,03)	2,92 - 5,28 (3,95)	3,01 - 5,87 (4,00)	3,11 - 5,01 (3,92)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico
27,95 - 45,44 (35,34)	27,26 - 46,3 (36,56)	31,27 - 46,76 (37,25)	24,71 - 50,47 (35,22)	28,81 - 55,3 (37,38)
12,36 - 18,83 (15,77)	11,49 - 16,69 (14,69)	11,21 - 17,92 (15,23)	12,38 - 18,36 (14,72)	13,45 - 19,79 (15,68)
1,51 - 3,46 (2,26)	1,68 - 3,67 (2,62)	1,91 - 4,08 (2,46)	1,64 - 4,04 (2,41)	1,78 - 4,02 (2,41)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
62,61 - 124,78 (84,55)	57,73 - 105,12 (79,33)	63,75 - 191,7 (92,55)	54,78 - 104,9 (77,85)	55,89 - 107,12 (81,45)
20,78 - 47,08 (30,22)	17,29 - 47,08 (29,6)	19,46 - 55,05 (35,28)	13,86 - 61,76 (31,17)	18,84 - 47,75 (31,87)
5,06 - 8,13 (6,17)	5,87 - 9,16 (7,08)	5,44 - 9,84 (6,92)	5,26 - 9,13 (7,09)	4,35 - 9,95 (6,91)
0,0 - 1,65 (0,23)	0 - 3,26 (0,68)	0 - 4,3 (0,89)	0 - 4,79 (0,95)	0 - 6,57 (0,87)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-2	1-3	1-3	1-3	1-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S24	S25	S26	S27	S28
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
3,65 - 5,77 (4,46)	2,98 - 6,17 (3,9)	2,98 - 4,61 (3,80)	3,01 - 5,30 (4,12)	3,09 - 5,20 (3,87)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico
26,27 - 48,19 (36,66)	25,65 - 41,67 (33,85)	23,90 - 42,31 (33,52)	27,77 - 41 (32,70)	26,48 - 43,28 (36,83)
12,35 - 17,7 (14,77)	10,19 - 17,89 (13,65)	11,14 - 15,95 (13,16)	11,14 - 17 (14,12)	12,65 - 17,84 (15,18)
1,82 - 3,4 (2,49)	1,69 - 3,36 (2,49)	1,85 - 3,39 (2,45)	1,81 - 2,94 (2,33)	1,68 - 3,13 (2,43)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
45,66 - 103,54 (79,18)	62,72 - 111,49 (90,34)	60,21 - 113,04 (88,76)	59,4 - 116,5 (83,30)	62,71 - 117,06 (89,33)
16,47 - 48,49 (29,07)	19,84 - 49,63 (31,01)	20,20 - 47,60 (31,61)	16,19 - 54,43 (29,63)	20,06 - 52,16 (38,02)
6,26 - 8,50 (7,60)	5,57 - 7,5 (6,23)	5,18 - 7,5 (5,87)	5,06 - 7,46 (6,93)	5,0 - 6,93 (5,54)
0,0 - 3,09 (0,54)	0,0 - 1,76 (0,38)	0,0 - 2,08 (0,39)	0,0 - 1,87 (0,19)	0,0 - 2,44 (0,25)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S29	S30	S31	S32	S33
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
2,93 - 4,93 (3,78)	3,11 - 5,87 (4,13)	3,24 - 5,15 (3,94)	2,92 - 5,12 (3,90)	3,12 - 5,89 (3,99)
Não catetulado	Não catetulado	Não catetulado	Não catetulado	Não catetulado
Elipsóide-Cilíndrico	Elipsóide-Cilíndrico	Elipsóide-Cilíndrico	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme
26,48 - 43,98 (36,96)	25,68 - 43,84 (35,47)	31,41 - 44,32 (36,18)	25,36 - 41,55 (31,99)	27,84 - 41,63 (34,99)
12,3 - 17,43 (14,61)	11,91 - 18,12 (14,72)	11,37 - 18,74 (14,85)	15,75 - 23,55 (19,31)	16,56 - 23,16 (19,82)
1,80 - 3,33 (2,45)	1,53 - 3,25 (2,43)	1,90 - 3,19 (2,46)	1,14 - 2,10 (1,66)	1,33 - 2,35 (1,77)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
110 - 219,21 (148,80)	63,35 - 120,38 (85,37)	59,90 - 113,04 (81,68)	56,07 - 110,25 (77,84)	64,42 - 151,11 (95,77)
11,74 - 52,06 (26,21)	23,63 - 67,91 (37,70)	11,06 - 51,98 (24,64)	19,79 - 49,29 (35,54)	20,06 - 58,89 (38,77)
5,0 - 7,48 (5,82)	5,06 - 6,97 (5,74)	4,14 - 7,78 (6,37)	5,95 - 8,92 (7,44)	5,77 - 9,1 (7,33)
0,0 - 2,62 (0,30)	0,0 - 5,74 (0,42)	0,0 - 1,60 (0,37)	0 - 4,66 (1,15)	0 - 5,09 (1,2)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-3	1-2	1-2	1-2	1-3
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S34	S35	S36	S37	S38
+	+	+	+	+
+	+	+	+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
2,98 - 5,21 (3,93)	3,00 - 5,22 (4,08)	3,04 - 5,23 (3,95)	3,25 - 4,14 (3,61)	3,11 - 6,34 (3,91)
Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme	Não catetulado Elipsóide-Cilíndrico- Ovóide-Doliforme
25,78 - 42,87 (35,84)	22,92 - 39,61 (30,8)	24,22 - 38,02 (31,21)	26,35 - 39,87 (33,58)	25,41 - 40,52 (32,55)
17,19 - 23,44 (20,12)	12,83 - 21,81 (17,61)	15,1 - 26,35 (18,97)	13,8 - 28,42 (20,51)	14,96 - 21,54 (17,96)
1,47 - 2,05 (1,78)	1,4 - 2,41 (1,75)	1,26 - 2,01 (1,26)	1,09 - 1,94 (1,64)	1,43 - 2,34 (1,81)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-	-	-	-
58,02 - 101,63 (77,84)	62,24 - 129,07 (97,06)	40,98 - 82,13 (59,33)	46,73 - 88,75 (61,21)	39,01 - 78,37 (56,25)
20,18 - 54,72 (7,68)	27,51 - 64,36 (45,91)	16,52 - 35,38 (23,9)	15,16 - 41,31 (23,62)	13,54 - 44,54 (21,38)
6,27 - 8,73 (7,68)	5,24 - 7,73 (6,57)	6,45 - 9,03 (7,8)	5,77 - 8,73 (7,58)	0-8,89 (6,71)
0 - 6,01 (0,86)	0 - 11,23 (2,94)	0 - 2,6 (0,7)	0 - 2,99 (0,81)	0 - 4,87 (0,80)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cont.

S39	S40
+	+
+	+
Lobulado - Multilobulado	Lobulado - Multilobulado
3,07 - 5,48 (3,92)	3,04 - 6,10 (3,90)
Não catetulado Elipsóide-cilíndrico	Não catetulado Elipsóide-cilíndrico
25,41 - 40,12 (34,42)	26,28 - 43,49 (34,98)
14,96 - 23,29 (19,43)	15,56 - 23,58 (20,45)
1,31 - 2,34 (1,68)	1,36 - 2,30 (1,72)
Tipo <i>Pseudoidium</i>	Tipo <i>Pseudoidium</i>
-	-
39,01 - 78,37 (56,25)	40,62 - 96,40 (66,20)
13,54 - 44,54 (21,31)	13,13 - 50,15 (26,25)
5,62 - 8,89 (7,15)	4,75 - 8,35 (6,80)
0,0 - 4,87 (0,80)	0,0 - 1,72 (0,22)
Ereta-Flexível	Ereta-Flexível
1-2	1-2
Ausente	Ausente