

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

MARCELA ELOI GOMES

**CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA: IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE AGENTE CAUSAL**

Ilha Solteira

2023

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARCELA ELOI GOMES

**CROSTA NEGRA EM SERINGUEIRA: IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE AGENTE CAUSAL**

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

Prof. Dra. Ana Carolina Firmino
Orientadora

Ilha Solteira

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

G633c Gomes, Marcela Eloi.
Crosta negra em seringueira: identificação e caracterização de agente causal
/ Marcela Eloi Gomes . -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
63 f. : il.

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

Orientador: Ana Carolina Firmino
Inclui bibliografia

1. *Hevea brasiliensis* Müell. Arg. 2. Análise filogenética. 3. Patogenicidade.


Raiane da Silva Santos

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Crosta negra em seringueira: identificação e caracterização de agente causal

AUTORA: MARCELA ELOI GOMES

ORIENTADORA: ANA CAROLINA FIRMINO

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

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



Prof. Dr. EVANDRO PEREIRA PRADO (Participação Virtual)
Produção Vegetal / FCAT / UNESP - Dracena



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)
Departamento de fitossanidade / Universidade Estadual Paulista - Câmpus Botucatu



Ilha Solteira, 13 de janeiro de 2023

DEDICATÓRIA

A minha família, aos meus pais Valquíria e Marcelo, aos meus avós Olga (in memoriam), José Geraldo (in memoriam) e Sônia e a minha tia Selma, que me educaram, são meu apoio, minhas inspirações e meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha mãe Maria e aos meus anjos da guarda, que sempre me dão forças, benções, capacidade e saúde para eu continuar seguindo firme nos meus propósitos.

A minha família que mesmo de longe sempre estão torcendo, me incentivando e me dando apoio.

A minha mãe Valquiria Eloi, por ser meu porto seguro, que nos momentos bons e ruins sempre está ao meu lado sendo um colo, força, incentivo e motivação, obrigada por acreditar nos meus sonhos.

Ao meu pai Marcelo Henrique Gomes por todo apoio durante esses anos.

Ao meu namorado Pablo Gabriel, por todo apoio, incentivo, cuidado, por ser meu ponto de paz e calma e sempre acreditar na minha capacidade.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (UNESP- FCAT), os docentes e técnicos de laboratório por esses 7 anos de ensinamentos tanto profissional e pessoal, com certeza não sou a mesma de quando eu entrei para essa faculdade.

Aos docentes e funcionários do programa de pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Engenharias (UNESP – Ilha Solteira) por todo auxílio e conhecimentos cedidos.

A minha orientadora Ana Carolina Firmino, por esses 6 anos de parceria, paciência, oportunidades e ensinamentos dentro e fora do laboratório, a profissional que sou hoje tem um pouco dela.

Aos meus colegas de laboratório Thaís e Dhonatan, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pela parceria, pelos momentos de desespero, cansaço e alegrias compartilhados juntos e hoje somos muito mais que amigos profissionais.

Ao laboratório de Fitopatologia e todos que passaram por lá ao longo desses 6 anos, onde eu pude aprender um pouco com cada um. Em especial minha amiga Marcela Bergamini, que eu tive o privilégio de compartilhar boa parte desses anos dentro do laboratório com ela, obrigada pela parceria e ensinamentos, hoje nossa amizade é além das portas do laboratório.

As meninas que eu compartilhei casa nesses 2 anos, Aline, Fernanda e Dayane obrigada pela convivência e ensinamentos. Em especial a Bianca Sekiya que foi meu presente nesse mestrado, obrigada pela amizade, pelo cuidado, pelos

ensinamentos, pela preocupação, pelos bons e ruins momentos compartilhados juntas e por ser minha família em Dracena.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2020/11518-4 e 2020/14082-2), pois sem o seu financiamento não seria possível a realização dessa pesquisa e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), situado na cidade de Votuporanga/SP pela parceria nessa pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento dos programas de pós-graduação da Faculdade de Engenharias (UNESP – Ilha Solteira).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota “. (Madre Teresa de Calcuta).

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) é a cultura que produz a matéria prima da borracha natural, fato que faz que ela represente uma importância econômica e social dentro e fora do território nacional. Os seringais são acometidos por uma diversidade de doenças e a ocorrência da crosta negra, vem gerando preocupações para os heveicultores. Esta doença é associada aos fungos *Phyllachora huberi* e *Rosenscheldiella heveae*, informações atualizadas que visem determinar quais espécies de *Phyllachora* e *Rosenscheldiella* ocorrem e quais prevalecem nas principais regiões produtoras de seringueira e que caracterizem as populações do patógeno são importantes para o país. Assim, este trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar espécies de fungos associados à crosta negra da seringueira em diferentes Estados brasileiros. Para isso, foram realizadas análises filogenéticas, utilizando sequências parciais da região do ITS-5.8S rDNA, da α -elongase, da actina e da β -tubulina dos isolados coletados, também foi realizado a caracterização patogênica através da inoculação dos isolados obtidos em mudas do clone RRIM600. Através das análises filogenéticas observamos o predomínio e diversidade genética dentro do gênero *Cladosporium*, nenhum dos isolados foram identificados como *Phyllachora huberi*. Nos testes de patogenicidade observamos que alguns dos isolados demonstram rápida evolução dos sintomas. Essas informações contribuem para o entendimento da epidemiologia da doença e podem auxiliar no seu manejo de controle no campo.

Palavras – Chaves: *Hevea brasiliensis* Müell; Arg; análise filogenética; patogenicidade.

ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) is the crop that produces the raw material for natural rubber, a fact that makes it represent an economic and social importance inside and outside the national territory. Rubber plantations are affected by a variety of diseases and the occurrence of black crust has been raising concerns for rubber farmers. This disease is associated with the fungi *Phyllachora huberi* and *Rosenscheldiella heveae*, updated information aimed at determining which species of *Phyllachora* and *Rosenscheldiella* occur and which prevail in the main rubber tree producing regions and which characterize the pathogen populations are important for the country. Thus, this work aims to identify and characterize species of fungi associated with black scab of rubber trees in different Brazilian states. For this, phylogenetic analyzes were carried out, using partial sequences from the region of ITS-5.8S rDNA, α -elongase, actin and β -tubulin of the collected isolates, as well as the pathogenic characterization through the inoculation of the isolates obtained from seedlings. from the RRIM600 clone. Through phylogenetic analysis we observed the predominance and genetic diversity within the genus *Cladosporium*, none of the isolates were identified as *Phyllachora huberi*. In the pathogenicity tests, we observed that some of the isolates showed a rapid evolution of symptoms. This information contributes to the understanding of the epidemiology of the disease and can help in its control management in the field.

Keywords: *Hevea brasiliensis* Müell; Arg; phylogenetic analysis; pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - **A.** Sintomas visualizados no campo. **B e C;** Estromas com ascósporos usados no isolamento do fungo; **D e E.** Colônia de *Cladosporium* (isolado CN4) e esporos do fungo usados no teste de patogenicidade; **F e G.** Sintomas de lesões no caule e morte apical das mudas 15 dias após a inoculação; **H e I.** Sintomas de crosta negra nas hastes com formação de estromas 30 dias após a inoculação e colônia de *Cladosporium* reisolado, respectivamente; **J e K.** Sintomas de “ilhas verdes” com pequenos estromas nas folhas 120 dias após a inoculação e ascocarpo bitunicado visualizado nos estromas da folha inoculadas..... 40
- Figura 2** - Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining com sequências concatenadas das regiões ITS-5.8S rDNA, parte dos genes de actina (act) e do fator de alongamento de tradução 1-alfa (tef1) dos isolados de *Cladosporium* ssp (bootstrap com 10.000 replicações)..... 42
- Figura 3** - **A.** Sintomas encontrados no campo de crosta negra em forma de pontos. **B e C.** Sintomas visualizados no campo de crosta negras circulares. **D e E:** sintomas de crosta negra em jardim clonal..... 50
- Figura 4** - Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining com sequências concatenadas das regiões ITS-5.8S rDNA, parte do gene da beta tubulina dos isolados de *Cladosporium* ssp (bootstrap com 1.000 replicações)..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Regiões gênicas e oligonucleotídeos nas reações de PCR realizadas nos isolados.....	38
Tabela 2	- Identificação dos isolados.	41
Tabela 3	- Regiões gênicas e oligonucleotídeos nas reações de PCR realizadas nos isolados.....	48
Tabela 4	Descrição e procedência dos isolados utilizados no trabalho.....	49
Tabela 5	Período de aparecimento (Dias) de sintomas em mudas de seringueira inoculadas em estufa agrícola.....	54
Tabela 6	Período de aparecimento (Dias) de sintomas em folhas de seringueira inoculadas em laboratório.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAIS	18
2.2	ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	A SERINGUEIRA (<i>HEVEA BRASILIENSIS</i>)	19
3.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	20
3.3	CROSTA NEGRA	21
3.4	SINTOMATOLOGIA	22
3.5	GÊNERO <i>CLADOSPORIUM</i>	23
3.6	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS	24
3.7	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS	24
3.8	ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS)	26
	REFERÊNCIAS	28
4	CAPÍTULO 1- <i>Complexo Cladosporium</i> ssp causando crosta negra em seringueira no Brasil.	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT	34
4.1	INTRODUÇÃO	35
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.2.2	Obtenção dos isolados	36
4.2.3	Teste de patogenicidade com os isolados	36
4.2.4	Análise morfológica dos isolados	37
4.2.5	Análise genética dos isolados	37
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.4	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
5	CAPÍTULO 2 – Identificação e caracterização de agente causal	44
	RESUMO	44
	ABSTRACT	45

5.1	INTRODUÇÃO.....	46
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.2.1	Coleta de material e isolamento dos fungos.....	47
5.2.2	Identificação dos fungos obtidos.....	47
5.2.3	Caracterização patogênica	48
5.2.3.1	<i>Em estufa agrícola</i>	48
5.2.3.2	<i>Em condições de laboratório</i>	48
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.3.2	Caracterização patogênica	53
5.4	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) possui grande importância econômica devido à produção de látex, que é usada como matéria prima para a indústria, em diversos segmentos, como o da indústria automobilística, de calçados, adesivos e da área médica (SIERRA-HAYER, 2014; SCALOPPI JÚNIOR, 2015). O setor, que emprega uma pessoa por quatro hectares, é responsável pela geração de cerca de 80 mil postos de trabalho no país, o que indica a importância da cultura no aspecto social, ambiental e para segurança e qualidade de vida dos produtores (SCALOPPI JUNIOR, 2015; BRAGA, 2016).

Mesmo apresentando grande importância e sendo uma cultura de origem nacional, nosso país é dependente da importação da borracha natural (SCALOPPI JUNIOR, 2015), isso se deve pela falta de incentivo público trabalhando lado a lado com produtores e pelo no clima que é favorável a ocorrência de doenças, que não acomete seringais de outros países.

Uma delas que vem se destacando nos últimos anos é a crosta negra, devido seu ataque as folhas os prejuízos gerados pela mesma vêm aumentando e gerando preocupações (GONÇALVES; GOES, 2017). Na América do Sul, além do Brasil, esta doença já foi relatada na Venezuela, Trinidad, Colômbia, Bolívia, Peru e Suriname (STERLING; RODRIGUEZ, 2018). No Brasil ela era frequentemente encontrada no Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso, porém em 2011 a crosta negra foi registrada em São Paulo, na Região de Tupã. Em seguida, no ano de 2012, ela foi observada na região de Votuporanga e em 2017, muitas áreas, em diferentes regiões foram atacadas pela doença. Segundo Gonçalves e Goes (2017) foram relatados casos em: Palestina, Olímpia, Barretos, Colômbia, Colina, Guaraci, Guaíra, São José do Rio Preto, Paulo de Faria, Tanabi, Bebedouro, Bálsamo, José Bonifácio, Ipiranga, Mirassolândia, Mendonça.

Antes da expansão do plantio de seringueiras, a queda das folhas com sintomas de crosta negra, era atribuída a senescência natural da planta do que ao patógeno. Após a década de 1980, com o aumento cultivo da seringueira, explorando diferentes condições ecológicas, o patógeno se disseminou e os sintomas vistos no campo se tornaram mais frequentes. Estudos realizados com o clone IAN717 com sete anos de idade, na região de Manaus (AM), mostram que a

doença completa seu ciclo dois a três meses após a troca de folhas da planta e que ainda ela pode causar uma desfolha nos períodos chuvosos, o que leva a planta a emitir novas folhas em épocas com condições favoráveis à ocorrência de outras doenças como mal das folhas e antracnose (GASPAROTO *et al.*, 2012).

Esta doença pode ser causadas por dois fungos fungo *Phyllachora huberi* faz parte da família Phyllachoraceae composta por fungos biotróficos (PEARCE *et al.*, 1999). O número de gêneros reconhecidos nessa família é muito discutido, sendo que atualmente, Phyllachoraceae compreende 59 gêneros (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.* 2015; MARDONES *et al.*, 2017). E *Rosenscheldiella heveae* que é atualmente aceito como membro da família Mycosphaerellaceae (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2014). Membros desta família são capazes de colonizar diversos nichos e variam no estilo de vida, podendo ser de patógenos a endófitos, sapróbios e epífitas. A fim de facilitar invasão no hospedeiro, algumas espécies de fungos dessa família são conhecidas por produzir toxinas que suprimem as respostas de defesa do hospedeiro, facilitando seu crescimento (DE WIT, 2016).

Assim como a família Phyllachoraceae, a família Mycosphaerellaceae possui grupos polifiléticos, pois a identificação dos indivíduos era baseada em dados morfológicos. Esses fungos representam um grupo heterogêneo muito grande para os quais os trabalhos existentes precisam ser revisados e as espécies redefinidas caso necessário (BRAUN *et al.*, 2015; VIDEIRA *et al.*, 2017). Isso levou a existência poucas sequências presentes no GenBank para estudos comparativos, sendo que a maioria das espécies estudadas possuem apenas dados da região ITS. Isso indica a instabilidade taxonômica ainda presente nas ambas as famílias (DAYARATHNE *et al.*, 2017).

Trabalhos relacionados ao controle da crosta negra em seringueira são escassos. Não há produtos químicos registrados para o controle desta doença nessa cultura no Brasil (BRASIL, 2022). O uso de materiais resistentes seria a melhor alternativa para manejo da crosta negra. Guen Seguin e Mattos (2000), avaliaram 200 clones quanto a resistência a crosta negra no campo. Segundo estes autores, 42 clones se mostraram resistentes, sendo eles derivados de *H. brasiliensis*, *H. benthamiana*. Porém, os autores relatam que alguns materiais resistentes se tornavam suscetíveis durante o período de avaliação. Esta variação na reação a

doença, segundo os autores, isso se deu devido a interação do genótipo com o ambiente. Monitoramentos do desenvolvimento dos sintomas de crosta negra em 16 clones por pelo menos três anos na Guiana Francesa (GUEN; SEGUIN; MATTOS, 2000), mostraram que há variação da resistência do clone conforme o local do plantio, pois os clones IRCA 519 e RO 38, que demonstraram resistência a crosta negra no Mato Grosso, foram suscetíveis na Guiana Francesa.

Com essa escassez de conhecimento genético sobre os agentes causais desta doença gera uma lacuna sobre o conhecimento dela, isso implica em uma dificuldade no reconhecimento etiológico e epidemiológico da crosta negra e consequentemente no manejo do seu controle dentro e fora do campo.

REFERÊNCIAS

BRAGA, C. **Seringueiros contribuem para a geração de emprego e renda**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/seringueiros-contribuem-para-a-geracao-de-emprego-e-renda_347620.html. Acesso em: 19 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Sistema Agropecuário Fitossanitário - Agrofit. **Agrofit Consulta aberta**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 19 out. 2022.

BRAUN, U.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C. Cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae) 3. Species on monocots (Poaceae, true grasses). **IMA fungus**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 25-98, 2015.

DAYARATHNE, M.C. *et al.* Neophyllachora gen nov. (Phyllachorales), three new species of *Phyllachora* from Poaceae and resurrection of Polystigmataceae (Xylariales). **Mycosphere**, Guiyang, v. 8, p. 1598–1625, 2017.

DE WIT, P.J.G.M. **Cladosporium fulvum effectors: weapons in the arms race with tomato**. Annual Review of Phytopathology, v.54, p.1–23, 2016.

GASPAROTTO, L. *et al.* Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L; REZENDE PEREIRA, J. C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Embrapa, 2012. Cap. 3, p. 35.

GONÇALVES, E. C. P; GOES, A. Ocorrência de crosta: negra na cultura da seringueira no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPALOGIA, 50., 2017, Uberlândia. **Anais [...]** Uberlândia: CFB, 2017. Disponível em: http://www.infobibos.com/anais/CBFito/50/Resumos/Resumo50CBFito_0674.pdf. Acesso em: 19 out. 2022.

GUEN, V.; SEGUIN, M.; MATTOS, C. R. Qualitative resistance of *Hevea* to *Phyllachora huberi* P. Henn. **Euphytica**, Dordrecht, v. 11, p. 211-217, 2000.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. *et al.* Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. **Fungal Divers**, Dordrecht, v. 72, p. 199-301. 2015.

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

SCALOPPI JÚNIOR, E.J. O poder público precisa olhar para os seringais. In: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-404.

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

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

VIDEIRA, S. I. R. *et al.* Mycosphaerellaceae—Chaos or clarity?. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 87, p. 257-421, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

- a. Realizar a coleta e identificação dos fungos associados a crosta negra nos principais Estados produtores de seringueira do Brasil;

2.2 ESPECÍFICOS

- a. Realizar o levantamento amostral, por meio de visitas, coleta de materiais com sintomas típicos da crosta negra e isolamento dos agentes causais, em seringais, viveiros e jardins clonais localizados em diferentes Estados do Brasil;
- b. Caracterizar e identificar os isolados *Phyllachora* sp. e *Rosenscheldiella* sp., por meio da avaliação de características genéticas e patogênicas;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A SERINGUEIRA (*HEVEA BRASILIENSIS*)

A família Euphorbiaceae é a quarta maior família em número de espécies e uma das mais complexas e diversificadas das Magnoliopsida, com aproximadamente 317 gêneros e mais de 6000 espécies (PRITCHARD, 2003). As Euphorbiaceae é uma das famílias mais importantes economicamente e são bastante utilizadas para materiais, alimentação e na medicina popular (SECCO *et al.*, 2012).

O gênero *Hevea*, pertencente à família das Euphorbiaceae, tem origem na região amazônica e constitui um táxon bem definido, suas folhas são compostas e trifoliadas o que permite sua fácil identificação (RAMAER, 1935). Dentro do gênero a espécie *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. A. de. Juss. Müll-Arg.), conhecida por seringueira, se destaca por ser a principal fonte de produção e extração de borracha natural (NAWAMAWAT *et al.*, 2011). É uma espécie decídua, perene, com crescimento rítmico e ortotrópico, pode atingir 30 metros de altura e um perímetro de mais de 3 metros em espécies nativas (VAYSSE *et al.*, 2012). Devido as características dessa matéria-prima, como elasticidade, flexibilidade, resistência a brasão e à corrosão, impermeabilidade e fácil adesão a tecidos e ao aço, a torna insubstituível (ALVARENGA, 2021)

Por ser a matéria prima da borracha natural, despertou-se o interesse por sua domesticação, que se iniciou em 1876, onde o inglês Henry Wickham enviou 70.000 sementes retiradas da região do Rio Tapajós localizado na cidade de Santarém no Estado do Pará, para o Jardim Botânico Kew Gardens na Inglaterra (PRIYADARSHAN; CLÉMENT-DEMANGE, 2004; CLÉMENT-DEMANGE *et al.*, 2007). As sementes que germinaram foram enviadas para o Sri Lanka e Cingapura, essa domesticação resultou em um aumento gradual de borracha partindo de 650 kg/ha, de mudas não selecionadas, em 1920, para 1.600 kg/ha nos melhores clones em 1950. Nos anos de 1990, a produtividade aumentou para 2.500 kg/ha em alguns cultivos comerciais (PRIYADARSHAN; CLÉMENT-DEMANGE, 2004).

Segundo GONÇALVES *et al.* (1990), a domesticação da espécie ocorreu em seis etapas distintas: i) retirada da espécie do ambiente nativo; ii) aperfeiçoamento

do sistema de extração; iii) fixação genética da espécie obtida pelo sistema de enxertia; iv) propagação desses clones obtidos pelos híbridos superiores; v) a descoberta e desenvolvimento de mecanismos de resistência a pragas e vi) utilização de estimulantes para aumentar o volume da produção.

Juntamente com a domesticação o desenvolvimento de novos clones foi e continua sendo amplamente pesquisado com objetivo de selecionar clones produtivos e resistentes a pragas e doenças, principalmente o *Microcyclus ulei* que é o agente causal do mal das folhas que é a principal doença que atinge a seringueira e foi responsável pela devastação de diversas tentativas do plantio de Hevea, (SENA, 2008). Antigamente o tempo para o desenvolvimento de um clone era em média de 30 anos, hoje com o avanço das técnicas de melhoramento genético esse tempo pode ser reduzido pela metade. Atualmente, o RRIM 600, um clone secundário, originalmente desenvolvido a partir dos clones Tjir 1 e PB 86, é o clone mais plantado no mundo (PRIYADARSHAN, 2017).

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A seringueira é a cultura responsável por produzir um dos principais commodity agrícola, a borracha natural é matéria prima utilizada na produção de mais de 50 mil produtos, que incluem materiais médico-hospitalares, preservativos, calçados, roupas, pneus, peças automotivas, pisos, manta asfáltica, utensílios domésticos, brinquedos, móveis, material bélico e muitos outros. Esses produtos são essenciais ao nosso cotidiano. (BRAGA, 2015; ALVARENGA, 2020).

A seringueira demora sete anos para começar a produzir, isso desestimula o cultivo desta cultura, mas temos a opção de utilizá-la como cultura principal atrelado ao cultivo em consórcio com culturas complementares como o café, cacau, mamão, abacaxi, arroz, feijão, soja, hortaliças, entre diversas outras, como alternativa de renda para os produtores em períodos de baixa ou de nenhuma extração do látex (ALVARENGA, 2020).

A cultura da seringueira promove impactos econômicos e sociais extremamente positivos para o agronegócio brasileiro. Com um manejo adequado o seringal pode apresentar um melhor desempenho, com isso proporciona uma rentabilidade atrativa ao agricultor, é uma atividade adequada à pequena produção e

à agricultura familiar, fixando populações no meio rural, além disso um seringal pode ter uma vida útil que ultrapassa os 50 anos. No Estado de São Paulo foi relato propriedades onde a cultura possui uma rentabilidade superior à do gado de corte. Dependendo do manejo é uma cultura que tem possibilidade de produzir praticamente o ano todo, conseguindo-se extrair o látex durante 11 meses do ano, dependendo até 12 meses. (ALVARENGA,2020.)

Mantendo as técnicas adequadas de manejo do plantio, sua produção de látex pode durar 30 anos. Sua madeira também pode ser aproveitada, gerando renda para renovação do seringal. (NETO, GUGLIELMETTI, 2012). A seringueira desempenha um papel positivo no aspecto ambiental, sendo eficiente na estocagem de carbono, contribuindo para o cumprimento das metas brasileiras de redução de emissão de carbono, estipuladas por acordos internacionais. Também desempenha resultados satisfatório em áreas degradadas, podendo ser utilizada para recuperação de solos degradados. (BRAGA, 2015, ALVARENGA,2020).

3.3 CROSTA NEGRA

A maioria das pesquisas das doenças que acometem a seringueira no Brasil são voltadas para o mal-das-folhas, causado pelo *Microcyclus ulei*. Entretanto, a crosta-negra foi a primeira doença da seringueira relatada na Amazônia, em 1899, por Jacques Hubber (DANTAS, 1947). Essa doença ocorre no Brasil, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Peru e Suriname (CHEE; WASTIE, 1980). Essa doença é acomete seringais adultos. A doença e o patógeno têm desenvolvimento anual e possui ligação à fenologia da seringueira, afetando constantemente a folhagem madura ou velha.

Acreditava-se que a queda das folhas maduras, amarelecidas e com sintomas da crosta-negra, durante os meses após o reenfolhamento, ocorreria devido senescência natural do que à ação do patógeno, devido isso essa doença era considerada uma doença de pouca importância (CHEE; WASTIE, 1980; (GASPATOTTO *et al.*,1984c).

Experimentos realizados com o clone IAN 717 com sete anos de idade, com o objetivo de observar o progresso da doença, em Manaus, AM, demonstraram que o desenvolvimento completo da doença ocorreu dois a três meses após a troca anual

das folhas e posteriormente, observou-se a queda gradativa das folhas nos três a quatro meses subsequentes, ocorrendo a reposição dessas em meados ou no final do período chuvoso. Nesse estudo, o seringal teve duas reposições foliares, uma normal no período de estiagem, e outra, anormal em meados ou no final do período chuvoso. Nessa última reposição foliar, promovida pela crosta negra, as folhas repostas surgiram em época favorável de desenvolvimento de outras doenças causadas por *Microcyclus ulei* e *C. gloeosporioides* (GASPAROTTO *et al.*, 1997).

3.4 SINTOMATOLOGIA

Os primeiros sintomas da crosta-negra ocorrem nos folíolos maduros. O desenvolvimento da doença é lento, com o desenvolvimento dos folíolos, se observam placas circulares negras, constituídas de estromas do fungo na face abaxial (inferior), que se localizam na nervura dos folíolos. Outro tipo de sintoma que se observa é o surgimento de áreas cloróticas circundadas por tecidos esverdeados na face adaxial (JUNQUEIRA; BEZERRA, 1990; GASPAROTTO; PEREIRA, 2012)

No início do desenvolvimento da doença, na face abaxial, se observa a presença de manchas circulares escuras. Nas partes correspondentes a cada crosta, é observado o desenvolvimento de uma mancha circular clorótica na face adaxial (superior) do limbo foliar. Quando ocorre invasão por outros fungos como o *Colletotrichum sp.* e *Fusarium sp.* surgem áreas necróticas em torno da crosta em ambas as epidermes (FURTADO; GASPAROTTO; PEREIRA, 2016).

A agressividade dos sintomas da crosta negra demonstra a prevalência desta doença nos danos causados às folhas. A ocorrência da crosta negra pode se confundir com outra doença comum na seringueira, porém podemos diferenciá-las através da observação dos sintomas delas. Onde o sintoma de *Colletotrichum sp.* agente causal da antracnose se caracteriza pela presença de manchas circulares alaranjadas na face adaxial que apresentam aspereza com o leve passar da mão, enquanto a crosta-negra se caracteriza pela presença de crostas enegrecidas na face abaxial que também são ásperas ao passar a mão. Sob condições de ataque do complexo crosta-negra, as seringueiras apresentam queda de folhas, reduzindo o enfolhamento da copa a até 90% (FILHO *et al.*, 2022).

3.5 GÊNERO *CLADOSPORIUM*

Este gênero pertence à família Cladosporiaceae, onde está inserido no Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Dothideomycetes, Subclasse Dothideomycetidae, Ordem Capnodiales e Família Cladosporiaceae (FREIRE, 2015).

Bensch *et al.* (2012) demonstraram dados mais atuais sobre esse gênero, onde descreveram 169 espécies dentro desse gênero. Porém o cenário sobre essas espécies ainda é vago devido à alta variabilidade morfológica e a ocorrência de algumas espécies em uma grande diversidade de substratos. Outro fato que reforçou essa dificuldade foi que todos os tipos de Hyphomycetes dematiáceos, caracterizados pela presença de conídios amero/fragmosporos formados em cadeias acropetais foram atribuídos a *Cladosporium*, e sendo considerado pela Comissão Internacional para a Taxonomia de Fungos como um gênero que necessita urgentemente de revisão (BENSCH *et al.*, 2012).

Todas as espécies do gênero *Cladosporium* são caracterizadas pela produção de conídios em cadeias acropetais que podem ser simpodiais ou, frequentemente, ramificadas. Estes conídios possuem forma altamente variável, septados ou asseptados, podendo ser cilíndricos, ovóides, fusiformes, limoniformes ou elipsóides e formados em cadeia ou solitários, sendo uma característica que auxilia na diferenciação de algumas espécies, porém não exerce o mesmo efeito diferenciação a nível de gênero. Dentro das cadeias de conídios eles podem variar de tamanho e forma da base ao ápice, apresentando conídios intercalares muito pequenos e conídios terminais ainda menores e sem septos (MENEZES, 2010; BENSCH *et al.*, 2012).

Cladosporium possui fácil distribuição geográfica, estando entre os micro-organismos mais comuns encontrados na terra (DUGAN *et al.*, 2004), podendo ser encontrados em todos os tipos de plantas, outros fungos e detritos e no ar atmosférico e seu isolamento pode ser feito em amostras de solo, alimentos, tintas e matérias orgânicas, havendo relatos de apresentar comportamento endofíticos (NASCIMENTO *et al.*, 2015), Algumas espécies aproveitam as lesões ocasionadas pelo ataque de fungos fitopatogênicos, como porta de entrada e assumem o papel de invasores secundários, podem atuar como hiperparasitas em outros fungos

(HEUCHERT *et al.*, 2005). Atuam como importantes agentes na decomposição, deterioração e são responsáveis de alergias, doenças respiratórias no homem e doenças em animais e plantas (ALCANTARA, 2012).

3.6 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS

As metodologias usadas na identificação morfológica de fungos utilizam aspectos como textura da colônia, diâmetro, velocidade de crescimento, pigmentação, forma e cor da hifa, presença ou não de septos, forma e ornamentação dos esporos, entre outras estruturas (QUADROS *et al.*, 2009)

Os micologistas tradicionalmente usam a morfologia (caracteres fenotípicos), como estruturas produtoras de esporos formadas como resultado da reprodução assexuada (mitose) ou sexuada (meiose), como único meio de identificar espécies fúngicas (HYDE *et al.*, 2010) e ainda hoje é adotado como meio de identificação de espécies dentro da comunidade micológica. O uso da morfologia na identificação de espécies fúngicas é muito importante para entender a evolução dos caracteres morfológicos, porém para espécies que apresenta alta especificidade, a caracterização morfológica pode ser ineficiente na caracterização a nível de espécie (GEISER, 2004) Isso ocorre devido à hibridização (HUGHES *et al.*, 2013) especiação críptica (LUCKING *et al.*, 2014) e evolução convergente (BRUN *et al.*, 2010).

Outro fator negativo da caracterização morfológica é que alguns fungos nem sempre esporulam em meio de cultura, dificultando essa caracterização, adicionado a isso temos fungos que em meio de cultura esporulam estruturas assexuadas, que podem apresentar uma plasticidade genética e os esporos sexuais são difíceis de serem produzidos em meio de cultura (KO *et al.*, 2010).

3.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS

Em meio dessas falhas dentro da identificação de fungos usando dados morfológicos, surgiram métodos baseados em sequências de DNA para identificar espécies dentro dos fungos mega diversos (HIBBETT, 2013).

Em 1985 Karry Mullis criou o PCR (reação em cadeia da polimerase) que é um método de análise molecular que permite a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de um determinado segmento do DNA através do uso de um par de oligonucleotídeos (primers) específicos para região a ser amplificada. Esta técnica gera produtos em quantidades suficientes para análises de DNA mesmo a partir de pequenas quantidades de amostra (FUNGARO, 2001).

A partir das análises feitas usando o PCR, juntamente com técnicas de sequenciamento parcial de genes realiza-se estudos sobre a taxonomia e filogenia de fungos, isto gera-se bancos de dados genéticos gratuitos, onde reúne e fornece informações genéticas de táxons de todo o mundo, fornecendo referências para a realização de pesquisas em diversas áreas como taxonomia e sistemática (BUENO-SILVA, 2012). O NCBI (National Center for Biotechnology) é um banco central de informação genômica que armazena uma série de bancos que armazenam dados obtidos de informações biológicas dos organismos como sequências de nucleotídeos, aminoácidos, e informações detalhadas sobre taxonomia. Temos também o GenBank (Genetic Sequence Database) que é o principal banco de dados de sequências genéticas disponíveis para o público, o qual possui dados de genomas completos e de pesquisas em andamento (SANTOS *et al.*, 2003).

As sequências de DNA são pouco susceptíveis a alterações ambientais o que não ocorre quando tratamos das características morfológicas, com isso conseguimos trabalhar com caracteres mais estáveis no processo de identificação de espécies (GOMES, 2011). Com resultados obtidos através de identificação molecular, complementam ou não as hipóteses demonstradas em estudos de morfologia, (SAMUELS; SEIFERT, 1995).

Dados moleculares são fundamentais para análises de relações filogenéticas entre os organismos. A filogenia descreve e entender como ocorreu a história evolutiva da espécie estudada, isso é demonstrado por meio de árvores filogenéticas. As árvores representam as hipóteses das relações evolutivas, como ocorreu a ordem de separação das espécies, podendo representar a história evolutiva de um pequeno grupo de organismos ou mesmo de grandes linhagens (VIANA, 2007). No início dos estudos de elaboração das árvores utilizava-se dados obtidos de análises morfológicas, porém isso resultava em dados imprecisos pois as

espécies que evoluíram de ancestrais distintos poderiam sofrer transformações originando características morfológicas semelhantes. Com o desenvolvimento e avanço da biologia molécula, permitindo o estudo das estruturas de macromoléculas como o DNA, as análises filogenéticas passaram a apresentarem mais precisão em seus dados (VIANA, 2007).

3.8 ESPAÇO INTERNO TRANSCRITO (ITS)

As regiões internas transcritas (ITS - Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal (rDNA), estão situadas entre regiões altamente conservadas e são o principal alvo da PCR para análise filogenética em fungos (LARENA, 1999).

A região ITS está dividida em ITS1, que separa os genes 18S e 5.8S, e ITS2 que está localizado entre os genes 5.8S e 28S (SCHLOTTERER *et al.*, 1994). As regiões 18S, 28S e 5.8S não apresentam variações de sequência, como das regiões ITS, que apresentem rápida evolução, como isso demonstram um alto nível de polimorfismo, isso resultam em uma variação intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento, tornando-as mais apropriadas para discriminação de espécies próximas ou até variedades de uma mesma espécie (FREIRE, 2015).

Para identificação em nível de espécie, o ITS é o mais eficiente, pois é a amplificação, por isso o ITS foi escolhido como o código de barras oficial para fungos por um consórcio de micologistas. O ITS pode ser usado sozinho ou em conjunto com outros genes codificadores de proteínas para identificação de espécies. Esses genes têm sido amplamente utilizados em importantes estudos de referência em sistemática fúngica (JAMES *et al.*, 2006).

Schoch *et al* encontraram a região ITS entre os marcadores com maior probabilidade de identificações corretas para uma grande diversidade de fungos amostrados. E a realização de outros estudos fúngicos forneceram dados que a região ITS seja utilizada como um código de barras fúngico adequado (KELLY *et al.*, 2011) A região ITS é um marcador de código de barras útil pois pode ser sequenciado a partir de fungos previamente descritos e aqueles que não temos dados de sequência, no segundo caso é realizado um sequenciamento do material

tipo (ou seja, o espécime no qual uma espécie é originalmente descrita e depositada em uma micoteca oficial).

Além do ITS, pode-se usar os genes codificadores de proteína, que realizam a identificação via código de barras devido à presença de regiões de íntrons, que às vezes evoluem em um ritmo mais rápido em comparação com o ITS (GEISER, 2004) e são empregados em análises filogenéticas devido à sua melhor resolução em níveis taxonômicos mais elevados em comparação com genes de Rna (SCHOCH *et al.*, 2009) com isso podemos obter uma classificação menos instável e adquirir um conhecimento sobre as relações evolutivas entre os fungos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2009). Os marcadores codificadores de proteína que tem sido mais utilizados são as subunidades da RNA polimerase (LIU *et al.*, 2004) fator de alongamento de translação 1-alfa (*tef1*), (REHNER *et al.*, 2005) e beta-tubulina (*tub2/BenA*) (O'DONNELL *et al.*, 1997).

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, M. *et al.* Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 6, p. 1-20, 2012.
- ALVARENGA, A. A.; CARMO, C.A.F. **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. 894 p.
- ALVARENGA, A. P. **Versatilidade e lucro no cultivo da seringueira**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/versatilidade-e-lucro-no-cultivo-da-seringueira/>. Acesso em: 20 dez. 2022.
- ALVAREGA, A. P. **Seringueira**. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), 2021. 65 p.
- BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: um breve histórico, contribuições e desafios. **Estud. Biol., Ambiente Divers.**, [s. l.], v. 34, p. 157-163, 2012.
- BENSCH, K. *et al.* The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 72, p. 1–401. 2012.
- BENSCH, K. *et al.* Espécies de *Cladosporium* em ambientes internos. **Estudos em micologia**, [s. l.], v. 89, p. 177-301, 2018.
- BRAGA, C. **Indicadores econômicos da produção de borracha natural no Brasil**. [S. l.]: CNA BRASIL, 2015.
- BRUN, S.; SILAR, P. **Em biologia evolutiva**: conceitos, evolução molecular e morfológica. Berlim; Heidelberg: Springer, 2010.
- CLÉMENT-DEMANGE, A. *et al.* Hevea Rubber Breeding and Genetics. In: JANICK, J. (ed.). **Plant breeding reviews**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- CHEE, K.H.; WASTIE, R.L. The status and luture prospects of rubber disease in tropical America. **Review of Plant Pathology**, Udaipur, v. 59, n. 12, p. 541-548, 1980.
- DANTAS. D. **Outras moléstias da seringueira e o controle biológico da "mosca-de-renda "**. Belém: IAN. 1947. 9 p.
- DUGAN, F.M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Check-list of *Cladosporium* names. **Schlechtendalia**, Halle, v. 11, p. 1–103, 2004.
- FILHO, A. D. C. V. *et al.* **Ocorrência da crosta-negra em seringais do sudeste da Bahia**. [S. l.: s. n.], 2022.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia: diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlandia, v. 14, p. 12–16, 2001.

FURTADO, E. L.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Doenças da Seringueira. In: AMORIM, L. et al. **Manual de fitopatologia**. 5.ed. São Paulo: Ceres, 2016. p. 359-372.

FREIRE, K. T L. de S. **Caracterização taxonômica de espécies do complexo *Cladosporium cladosporioides* depositadas na micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D.R.; SILVA, H.M. e. **Doenças de seringueira**. Manaus: Embrapa-CNPDS, 1984c. 71 p. (Embrapa-CNPDS.Circular Técnica. 4)
GASPAROTTO, L. DOS SANTOS Á, F. PEREIRA, J.C.R, FERREIRA, F.A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Manaus: Embrapa-CPAA, 1997.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FURTADO, E.L. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, Cap. 3, p. 35-176, 2012.

GEISER, D. M. **Avanços em biotecnologia de fungos para indústria, agricultura e medicina**. [S. l.]: Springer, 2004.

GOMES, S. I. F. **Caracterização morfológica e molecular de *Tricholoma equestre* / *T. Auratum* para uma abordagem taxonômica**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2011.

GONÇALVES, P. D. S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A. A. Origem, variabilidade e domesticação da hevea: uma revisão. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, DF, v. 25, n. 2, p. 135–156, 1990.

GONÇALVES, E. C. P.; GOES, A. Ocorrência de crosta negra na cultura da seringueira no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50. 2017, Uberlândia. **Anais [...]** Uberlândia: [s. n.], 2017.

GUEN, V.; SEGUIN, M.; MATTOS, C. R. Qualitative resistance of *Hevea* to *Phyllachora huberi* P. Henn. **Euphytica**, Dordrecht, v. 11, p. 211-217, 2000.

HEUCHERT, B.; BRAUN, U.; SCHUBERT, K. Morphotaxonomic revision of fungicolous *Cladosporium* species (hyphomycetes). **Schlechtendalia**, Halle, v. 13, p. 1–78, 2005.
, D.

HIBBETT, D, S.; TAYLOR, J, W. Sistemática fúngica: uma nova era de esclarecimento está próxima? **Nature Reviews Microbiology** , v. 11, n. 2, pág. 129-133, 2013.

HUGHES, K.W, PETERSEN, R.H, LODGE, D.J, BERGEMANN, S.E, BAUMGARTNER, K., TULLOSS, R.E, CIFUENTES, J. Consequências evolutivas da suposta hibridização intra e interespecífica em fungos agáricos. **Mycologia**, v. 105, n. 6, pág. 1577-1594, 2013.

HYDE, K.D; ABD-ELSALAM, K.; CAI, L Morfologia: ainda essencial em um mundo molecular. **Mycotaxon**, v. 114, p. 439-451, 2010.

INFORMA ECONOMICS FNP. Seringueira. *In*: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-408.

JAMES, T. Y. *et al.* Miadlikowska. **J. Nature**, London, v. 443, p. 818-822, 2006.

JUNQUEIRA, N. T.; BEZERRA, J. L. Nova doença foliar em seringueira (*Hevea spp.*) causada por *Rosenscheldiella hevea* n. sp. (Loculoascomycetes, Dothideales, Stigmatellaceae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 1, p. 24-28, 1990.

KELLY, L. J. *et al.* **New Phytol.**, Chichester, v. 191, p. 288-300, 2011.

KO, T.W.K, STEPHENSON, S.L, BAHKALI, A.H, HYDE, K.D. Da morfologia à biologia molecular: podemos usar dados de sequência para identificar fungos endófitos?. **Fungal Divers**, Dordrecht, v. 50, p. 113-120, 2011.

LARENA. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 187-194, 1999.

LIU, Y. J; HALL, B. D. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)** 101: 4507– 4512, 2004.

LUCKING, R., DAL-FORNO, M., SIKAROODI, M., GILLEVET, P.M., BUNGARTZ, F., MONCADA, B., YÁNEZ-AYABACA, A., CHAVES, J. L., COCA, L. F, LAWREY J. D. A single macrolichen constitutes hundreds of unrecognized species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111: 11091–11096, 2014 b.

MENEZES, J. P. *et al.* Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma spp.* (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum f. sp. Chrysanthemi*. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 34, p. 132-139, 2010.

MCLAUGHLIN, D. J. *et al.* **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 17, p. 488-497, 2009.

NASCIMENTO, T. L. *et al.* Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, London, v. 14, p. 79-86, 2015.

NETO, P. G.; GUGLIELMETTI, L. C. **Heveicultura, a cultura da seringueira**. São José do Rio Preto: Grafisa, 2012. 344 p.

O'DONNELL, K. ; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, 103–116, 1997. doi: 10.1006/mpev.1996.0376

PRITCHARD, A. **Introduction to the Euphorbiaceae**. Venegono: Cactus & Co., 2003.

PRIYADARSHAN, P. M.; CLÉMENT-DEMANGE, A. Breeding Hevea Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 52, p. 51–115, 2004.

PRIYADARSHAN, P. M. **Biology of hevea rubber**. New York: Springer International, 2017.

QUADROS, M.E. *et al.* Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. **Engenharia. Sanitaria e Ambiental.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, 2009.

RAMAER, H. **Cytology of Hevea**. London: Springer-Science Business Media, 1935. v. 84.

REHNER, S. A ; BUCKLEY, E. **Mycologia**, Philadelphia, v. 97, p. 84-98, 2005.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A. The impact of molecular characters on systematic of filamentous ascomycetes. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 37-67. 1995.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. **Bioinformática aplicada à Genômica: melhoramento genômico**. Minas Gerais: UFV, 2003.

SCALOPPI JÚNIOR, E.J. O poder público precisa olhar para os seringais. *In*: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-404.

SCHLOTTERER, C. *et al.* Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 11, p. 513-522, 1994.

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

SECCO, R. D. S. *et al.* An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae in Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 227–242, 2012.

SENA, C. Fordlândia: breve relato da presença americana na Amazônia. **Cadernos de História e Ciência**, v. 4, n. 2, p. 89–108, 2008.

SCHOCH, C. L. *et al.* **Syst. Biol.**, Oxford, v. 58, p. 224, 2009.

SCHOCH, C. L. *et al.* Código de barras fúngico, C.; Fungal Barcoding Consortium. **Proc. Nacional Acad. ciência EUA**, [s. l.], v. 109 , p. 6241-6246, 2012.

VAYSSE, L. *et al.* Natural Rubber. *In: Polymer Science: a Comprehensive Reference*. New York: Elsevier, 2012. p. 281–293.

VIANA, G. V. R. **Técnicas para construção de árvores filogenéticas**. 2007. Tese (Doutorado) – UFCE, Fortaleza, 2007.

WHITE, T. J. *et al.* **PCR: um guia para métodos e aplicação**. San Diego: [s. l.], 1990. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1, 1990.

4. CAPÍTULO 1- *Complexo Cladosporium ssp* causando crosta negra em seringueira no Brasil.

RESUMO

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) no decorrer destes últimos anos no Brasil, vem sofrendo o ataque severo de uma doença denominada crosta negra. Sua disseminação acelerada e à queda precoce das folhas na cultura, está causando preocupação. Até os anos 90, esta doença vinha sendo associada aos fungos *Phyllachora huberi* e *Rosenscheldiella heveae*, porém em 2022, após análise de amostras coletadas nos Estados de Minas gerais e São Paulo, foram isoladas diferentes espécies do fungo *Cladosporium* dos estromas causados por esta doença. Após análise morfológica e análise filogenética, utilizando sequências parciais da região do ITS-5.8S rDNA, α -elongase e da actina, os isolados foram identificados como *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum* e *C. xanthochromaticum*. Nos testes de patogenicidade realizados em estufa agrícola verificou-se que os sintomas aparecem rapidamente, como morte apical, lesão na haste desfolha intensa e a produção de crostas negras nas hastes e folhas. Após 120 dias da inoculação observou-se a formação de estromas, que permitiram associar este fungo com a fase assexuada de *R. heveae* devido as características dos ascos bitunicados. Desde modo este é o primeiro relato destas espécies de *Cladoporium* causando sintomas de crosta negra em seringueira no Brasil.

Palavras-Chave: fungo; fase assexuada; desfolha.

ABSTRACT

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) over the last few years in Brazil has been suffering a severe attack from a disease called black crust. Its accelerated spread and the early fall of leaves in the crop is causing concern. Until the 1990s, this disease had been associated with the fungi *Phyllachora huberi* and *Rosenscheldiella heveae*, but in 2022, after analyzing samples collected in the states of Minas Gerais and São Paulo, different species of the fungus *Cladosporium* were isolated from the stroma caused by this disease. After morphological analysis and phylogenetic analysis, using partial sequences from the ITS-5.8S rDNA, α -elongase and actin region, the isolates were identified as *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum* and *C. xanthochromaticum*. In the pathogenicity tests carried out in an agricultural greenhouse, it was verified that the symptoms appear quickly, such as apical death, damage to the stem, intense defoliation and the production of black crusts on the stems and leaves. After 120 days of inoculation, stroma formation was observed, which allowed the association of this fungus with the asexual phase of *R. heveae* due to the characteristics of bitunicate asci. Therefore, this is the first report of these *Cladosporium* species causing black scab symptoms on rubber trees in Brazil.

Keywords: *Hevea brasiliensis* Müell. Arg; fungus; asexual phase; defoliation.

4.1 INTRODUÇÃO

As maiores áreas de cultivo comercial de seringueira estão localizadas nos países do sudeste asiático, com destaque à Malásia, Indonésia e Tailândia. No Brasil, a seringueira é cultivada em 17 estados, porém o Estado de São Paulo é o principal produtor de borracha natural do país, representando 60% da produção desta matéria prima (INFORMA ECONOMICS FNP, 2015; OLIVEIRA, GONÇALVES 2019).

A crosta-negra vem causando preocupação no setor. devido à queda precoce das folhas que ela vem ocasionando, ou da diminuição da área fotossintética da planta, já que ela causa manchas foliares (GONÇALVES; GOES, 2017). Os sintomas característicos desta doença são áreas amareladas na parte adaxial da folha e manchas necróticas que correspondem as placas circulares negras na parte abaxial da folha, coincidente com as incrustações estomáticas do fungo, sendo estes os sintomas e sinais característicos desta doença. Durante o período de desfolha, o fungo sobrevive como estroma nas folhas que caem no chão. Os ascósporos se tornam a principal fonte de inoculação para o microrganismo começar mais uma vez o ciclo nas folhas recém-formadas. A ocorrência de crosta negra em seringueira também facilita a entrada de outros patógenos como *Colletotrichum*, já que com o passar do tempo, as placas negras ressecam, provocando a ruptura do tecido foliar, agravando desta maneira a situação sanitária da cultura (GASPAROTO *et al.*, 2012).

Em 1899 o fungo *P. huberi* foi o primeiro associado à crosta negra na cultura da seringueira no Brasil em 1899 na região amazônica. Em 1990 *R. heveae*, foi associado a esta mesma doença (JUNQUEIRA; BEZERRA, 1990; GONÇALVES; GOES, 2017). Junqueira e Bezerra (1990), chegam a citar o isolamento do fungo *Cladosporium* a partir de estromas nas lesões de crosta negra e sua possível associação coma forma assexuada de *R. heveae*, mas não houve estudos aprofundados sobre o assunto. A partir deste momento poucas informações foram atualizadas sobre esta doença, possivelmente por ela ter sido tratada como secundária até o presente (GASPAROTTO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2016)

Para o desenvolvimento ou adoção de um método eficaz de manejo da crosta negra em seringueiras, é imprescindível o conhecimento sobre quais espécies do patógeno ocorrem. Assim, pose-se entender a epidemiologia dessa doença,

possibilitando estudos direcionados visando minimizar os danos causados por ela, contribuindo com a maior produtividade das plantas e melhor atendimento às demandas pela borracha natural no mercado brasileiro. Diante disso o estudo teve como objetivo identificar o agente causal da crosta negra em duas importantes regiões que cultivam esta cultura.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2 Obtenção dos isolados

No ano de 2022, amostras de folhas atacadas foram coletadas em seringais severamente afetados do clone RRIM600 pela crosta negra no Estado de Minas Gerais (município de Campina Verde) e São Paulo (município de Barretos). As folhas coletadas foram levadas para o laboratório de fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (UNESP-Dracena) e o isolamento do fungo foi na metodologia descrita por Junqueira e Bezerra (1990) e Gasparotto *et al.* (2012) para isolamento de *P. huberi* e *R. heveae*. A partir deste método de isolamento somente foram obtidos isolados que pertenciam ao gênero *Cladosporium*. Deste modo, devido à alta frequência de isolamento deste fungo das lesões e com base no fato de Junqueira e Bezerra (1990) terem citado este fungo como possível forma assexuada da *R. heveae*, foram realizados testes de patogenicidade com os isolados obtidos em casa de vegetação.

4.2.3 Teste de patogenicidade com os isolados

Para a caracterização patogênica, foram usados 10 isolados, um do município de Campina Verde (MG) (CN4) e nove do município de Barretos (SP), (CN6, CN8, CN10, CN11, CN12, CN17, CN22, CN24 e CN26) que foram inoculados em mudas de 6 meses do clone RRIM 600. A aplicação do fungo nas mudas foi via pulverização até o ponto de escorrimento de uma suspensão de esporos dos isolados cultivados em placa de petri contendo meio BDA (50ml de suspensão de 10^6 esporos. mL⁻¹ de esporos assexuados). Após a inoculação, todas as mudas foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas sob alta umidade (acima de 80% de UR), no laboratório. Posteriormente as mudas foram levadas para estufa agrícola, com

irrigação diária. Cada isolado foi inoculado em três planta (sendo assim tivemos três repetições para cada isolado). O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado e foi repetido duas vezes. A avaliação dos sintomas foi realizada semanalmente durante 6 meses.

Nas mudas que apresentam sintomas, realizamos a retirada de fragmentos de tecidos afetados pela doença e em seguida foi feito o reisolamento em mudas sadias para que desta forma pudéssemos confirmar se este foi o responsável pelo sintoma.

4.2.4 Análise morfológica dos isolados

A caracterização morfológica foi realizada a partir de lâminas semipermanentes, preparadas com lactofenol, contendo conídios obtidos de colônias de cada isolado, cultivadas em meio BDA por 14 dias, sob fotoperíodo alternado e temperatura de 25 ± 1 °C. Com auxílio de microscópio óptico de luz, 50 conídios de cada isolados foram medidos (comprimento e largura) utilizando-se sistema de videocâmara instalada em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2 calibrado com a utilização de lâmina micrométrica. A identificação morfológica dos isolados foi realizada conforme metodologia descrita por Bensch *et al* (2018).

4.2.5 Análise genética dos isolados

O DNA dos isolados obtidos foram extraídos das estruturas formadas em placa de petri conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) com modificações. As concentrações de DNA foram determinadas usando um Nanodrop ND-1000 Espectrofotômetro (Nanodrop Technologies, Rockland, Delaware). O DNA obtido foi diluído para as concentrações de trabalho de 30-60 ng. mL⁻¹.

Foram realizadas a identificação e análise filogenética baseada região do ITS-5.8S rDNA, parte dos genes de actina (act) e do fator de alongamento de tradução 1-alfa (tef1), conforme metodologia descrita por Bensch *et al* (2018), utilizando oligonucleotídeos referente a cada região gênica, apresentados na tabela a seguir (Tabela 1).

TABELA 1: Regiões gênicas e oligonucleotídeos nas reações de PCR realizadas nos isolados.

Região	Oligonucleotídeos	Referências
ITS-5.8S rDNA	ITS- 1F ITS-4	White et al. (1990) Gardes e Bruns (1993)
Actina	ACT 783R ACT 512F	Freire (2015) Freire (2015)
α -elongase	EF1-986R EF1-728F	Carbone e Kohn (1999) Carbone e Kohn (1999)

Fonte: Próprio Autor.

Posteriormente as sequências obtidas foram editadas, alinhadas e sua filogenia foi realizada usando o programa Mega 11.0 (TAMURA *et al.* 2021). As sequências geradas neste estudo foram comparadas com outras sequências obtidas no GenBank.

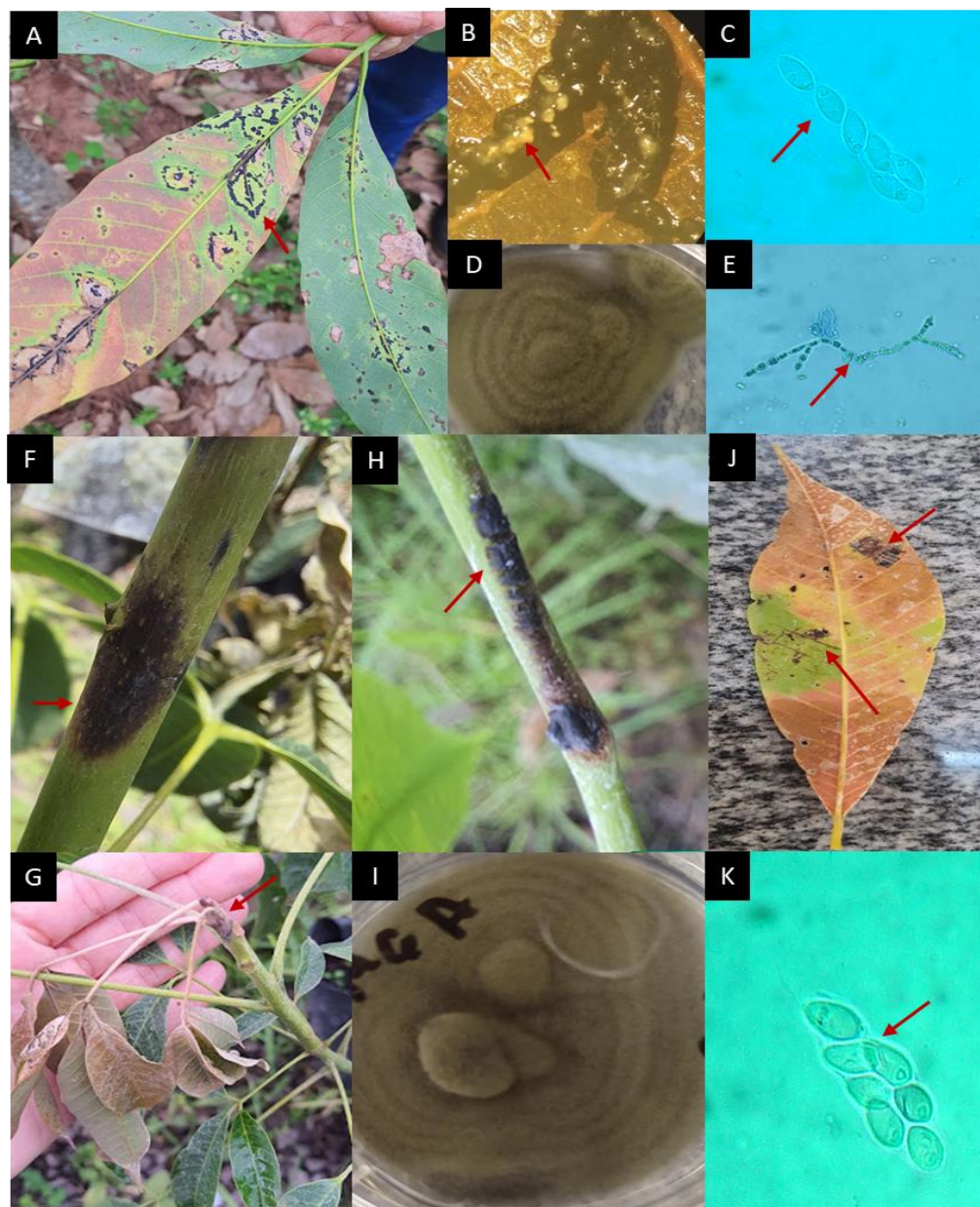
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de patogenicidade realizados com os isolados obtidos verificou-se que os que todos os isolados foram patogênicos, porém mostraram agressividade diferenciada. O isolado CN4, CN10, CN12, CN17, CN22 e CN26 causaram morte apical, desfolha e lesão na haste, caule e folha da planta (Figura 1), em média, 15 dias após sua inoculação, enquanto os outros isolados somente causaram lesão na folha 30 dias após a inoculação. Após 120 dias da inoculação as plantas começaram a apresentar pequenos estromas, característicos da fase sexuada da crosta negra e as “ilhas verdes” em torno dos estromas, sendo está uma característica dessa doença (Figura 1). Destes estromas foram retirados ascos bitunicados, típicos do fungo *R. heveae*. A partir dos fragmentos de tecido que mostraram sintomas foram reisolados novamente fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium*.

Acredita-se que a variação no aparecimento dos sintomas está ligada a dois fatores. O primeiro seria a temperatura na nossa região, principalmente na casa de vegetação, que ficou na média de 38°C, conforme termômetros instalados nela. É possível que altas temperaturas possam influenciar o aparecimento de sintomas típicos da doença, já que os estromas só começaram a aparecer no início de junho, quando as temperaturas estão mais amenas em nossa região. Essa hipótese corrobora com o fato de que o fungo pode sobreviver como estroma nas folhas que

caem no chão, principalmente na época de senescência da planta. Fazendo com que os ascósporos formados nestes estromas em ambiente favorável se tornem a principal fonte de inoculação para o microorganismo começar mais uma vez o ciclo nas folhas recém-formadas (GASPAROTO *et al.*, 2012), agravando desta maneira a situação sanitária da cultura. Este fato pode sugerir que a crosta negra pode ter um ciclo de vida parecido com o do mal das folhas, causado pelo fungo *Pseudocercospora ulei* (*Microcyclus ulei*), já que esta variação de tipo de sintoma e comportamento conforme o ambiente já foi descrito para este fungo, principalmente quando sua forma assexuada era usada em inoculações (GASPAROTO *et al.*, 2012, MACEDO *et al.*, 2014).

FIGURA 1: **A.** Sintomas visualizados no campo. **B e C;** Estromas com ascósporos usados no isolamento do fungo; **D e E.** Colônia de *Cladosporium* (isolado CN4) e esporos do fungo usados no teste de patogenicidade; **F e G.** Sintomas de lesões no caule e morte apical das mudas 15 dias após a inoculação; **H e I.** Sintomas de crosta negra nas hastes com formação de estromas 30 dias após a inoculação e colônia de *Cladosporium* reisolado, respectivamente; **J e K.** Sintomas de “ilhas verdes” com pequenos estromas nas folhas 120 dias após a inoculação e ascocarpo bitunicado visualizado nos estromas da folha inoculadas.



Fonte: Próprio Autor.

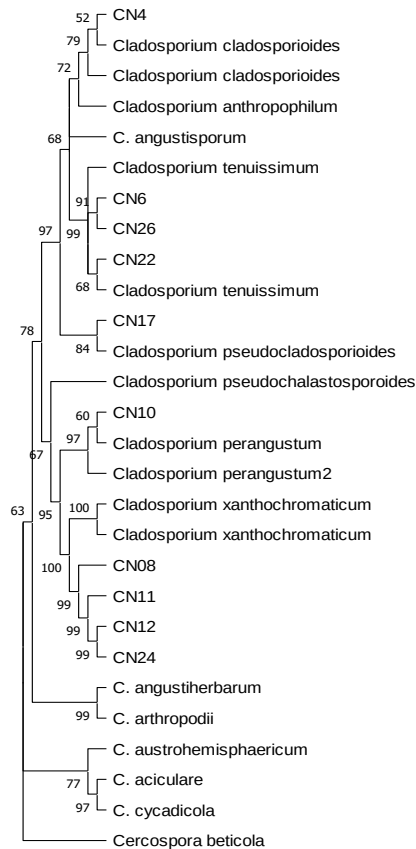
O segundo fator que pode estar ligado a variação de sintomas e até agressividade do fungo é variação genética deste e as espécies envolvidas. Segundo as análises genéticas foram encontradas cinco espécies de *Cladosporium* (*C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum* e *C. xanthochromaticum*) como podemos observar na (Tabela 2 e Figura 2) que corroboraram com as análises morfológicas observadas e descritas por Bensch *et al* (2018). Observou-se que três (CN8, CN11 e CN24) dos 5 isolados que pertenciam a espécies *C. xanthochromaticum* foram os que mostraram sintomas tardios e mais brandos. Porém é importante ressaltar que foram entradas cinco diferentes espécies em um conjunto de 10 isolados, sendo que somente em uma propriedade que coletamos as amostras na cidade de Barretos encontramos todas as cinco espécies, apontando uma alta diversidade genética deste fungo em apenas um ponto. Isso mostra a importância da realização de um levantamento de maiores dimensões desta doença, já que este fungo vem mostrando uma disseminação rápida e uma capacidade de adaptação a diferentes regiões do Brasil (GONSALVES E GOES, 2017; FILHO *et al.*, 2022).

TABELA 2: Identificação dos isolados.

Isolado	Local de Coleta	Espécie
C.N 4	Campina Verde /MG	<i>Cladosporium angustisporum</i>
C.N 6	Barretos /SP	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
C.N 8	Barretos /SP	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
C.N 10	Barretos /SP	<i>Cladosporium angulosum</i>
C.N 11	Barretos /SP	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
C.N 12	Barretos /SP	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
C.N 17	Barretos /SP	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>
C.N 22	Barretos /SP	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
C.N 24	Barretos /SP	<i>Cladosporium xanthochromaticum</i>
C.N 26	Barretos /SP	<i>Cladosporium tenuissimum</i>

Fonte: Próprio autor.

FIGURA 2: Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining com sequências concatenadas das regiões ITS-5.8S rDNA, parte dos genes de actina (act) e do fator de alongamento de tradução 1-alfa (tef1) dos isolados de *Cladosporium* ssp (bootstrap com 10.000 replicações).



Fonte: Próprio Autor.

4.4 CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum* e *C. xanthochromaticum* associados a crosta negra em seringueira.

REFERÊNCIAS

- BENSCH, K. *et al.* Espécies de Cladosporium em ambientes internos. **Estudos em micologia**, [S. l.], v. 89, p. 177-301, 2018.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation filamentous ascomycetes. **Mycologia**, Philadelphia, v. 91, p. 553-556, 1999.
- FILHO, A. D. C. V. *et al.* **Ocorrência da crosta-negra em seringais do sudeste da Bahia**. [S. l.: s. n.], 2022.
- FURTADO, E. L.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Doenças da Seringueira. *In*: AMORIM, L. *et al.* **Manual de fitopatologia**. 5.ed. São Paulo: Ceres, 2016. p. 359-372.
- FREIRE, K. T. L. DE S. **Caracterização taxonômica de espécies do complexo Cladosporium cladosporioides depositadas na micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- GASPAROTTO, L. *et al.* **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília, DF: Editora Embrapa, 2012. Cap. 3, p. 35 – 176.
- GONÇALVES, E. C. P.; GOES, A. Ocorrência de crosta negra na cultura da seringueira no estado de São Paulo. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 50., 2017, Uberlândia. **Anais [...]** Uberlândia: [s. n.], 2017.
- INFORMA ECONOMICS FNP. Seringueira. *In*: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-408.
- JUNQUEIRA, N. T.; BEZERRA, J. L. Nova doença foliar em seringueira (*Hevea spp.*) causada por *Rosenscheldiella hevea* n. sp. (Loculoascomycetes, Dothideales, Stigmatellaceae). **Fitopatologia Brasileira**, Heidelberg, v. 15, n. 1, p. 24-28, 1990.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

5. CAPÍTULO 2 – Identificação e caracterização de agente causal

RESUMO

A ocorrência do ataque da crosta negra vem aumentando nos últimos anos, desta forma ela vem se tornando preocupante devido à queda precoce das folhas que ela acarreta. Esta doença sempre foi associada aos fungos *Phyllachora huberi* e *Rosenscheldiella heveae*. mas estudos relacionados ainda são escassos. Assim, este trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar espécies de fungos associados à crosta negra da seringueira plantios de seringueira no Brasil. A partir de amostras obtidas de diferentes locais do Estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia, foram obtidos 72 amostras do fungo *Cladosporium* sp., que já foi relatado como fase assexuada de *R. heveae*, que é um dos fungos causadores da crosta negra. Estes isolados tiveram a região ITS do seu DNA e parte do gene da β -tubulina sequenciados. As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e sua filogenia foi realizada usando o programa Mega 11. Os isolados também foram caracterizados patogenicamente por meio da inoculação no clone RRIM600 em estufa agrícola e em laboratório. Verificamos que houve um predomínio de diferentes espécies de *Cladosporium*. Nos testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação com a fase assexuada do fungo verificou-se que os sintomas aparecem rapidamente, porém, alguns isolados mostraram menor agressividade, pois os sintomas apareceram após 120 dias da inoculação. Já em laboratório, todos os isolados se mostraram agressivos. Com formação de crosta 10 dias após a inoculação. Concluímos que através do sequenciamento da região ITS e de parte do gene da β -tubulina os isolados o gênero *Cladosporium* apresenta um domínio nas regiões do país estudada e que esses mesmos isolados apresentam uma capacidade patogênica.

Palavras-Chave: *Phyllachora huberi*; *Rosenscheldiella heveae*; *Cladosporium*.

ABSTRACT

The occurrence of black crust attack has been increasing in recent years, thus it has become worrying due to the early fall of the leaves that it causes. This disease has always been associated with the fungi *Phyllachora huberi* and *Rosenscheldiella heveae*, but related studies are still scarce. Thus, this work aims to identify and characterize species of fungi associated with the black crust of rubber trees in rubber tree plantations in Brazil. From samples obtained from different locations in the State of São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais and Bahia, 71 samples of the fungus *Cladosporium* sp., which has already been reported as the asexual phase of *R. heveae*, which is a of the fungi that cause black scab. These isolates had the ITS region of their DNA and part of the β -tubulin gene sequenced. The obtained sequences were edited, aligned and their phylogeny was carried out using the Mega 11 program. The isolates were also characterized pathogenically by inoculating the RRIM600 clone in an agricultural greenhouse and in the laboratory. We verified that there was a predominance of different species of *Cladosporium*. In the pathogenicity tests carried out in a greenhouse with the asexual phase of the fungus, it was verified that the symptoms appear quickly, however, some isolates showed less aggressiveness, since the symptoms appeared after 120 days of inoculation. In the laboratory, all isolates were aggressive. With crust formation 10 days after inoculation. We conclude that through the sequencing of the ITS region and part of the β -tubulin gene, the isolates of the genus *Cladosporium* have a dominance in the studied regions of the country and that these same isolates have a pathogenic capacity.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; *Phyllachora huberi*; *Rosenscheldiella heveae*, *Cladosporium*.

5.1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) é uma espécie oriunda da região amazônica, pertencente à família Euphorbiaceae. Esta espécie possui grande importância econômica devido à produção de látex, fonte de borracha natural (ALVARENGA; CARMO, 2008).

Alguns fatores são limitantes ao aumento da produtividade da cultura no Brasil, entre os quais estão os problemas fitossanitários. Dentre as doenças foliares mais importantes da seringueira encontra-se o mal-das-folhas, a antracnose, o oídio e a mancha areolada, causadas por *Microcyclus ulei*, *Colletotrichum* ssp., *Oidium heveae* e *Rhizoctonia solani*.

A crosta negra também é uma doença que acomete os seringais, porém sempre foi considerada de pouca importância (GASPAROTTO *et al.*, 2012; FURTADO *et al.*, 2016). Entretanto, no decorrer destes últimos anos, a ocorrência da crosta negra aumentou passando a causar prejuízos devido à queda precoce das folhas, (GONÇALVES; GOES. 2017; VIRGENS FILHO *et al.*, 2022), causando redução de 38% na produção de borracha entre os anos de 2017 e 2020 (VIRGENS FILHO *et al.*, 2022)

No ano de 2022, amostras de folhas atacadas foram coletadas em seringais severamente afetados do clone RRIM600 pela crosta negra no Estado de Minas Gerais e São Paulo, Mato Grosso do Sul e Bahia. As folhas coletadas foram levadas para o laboratório e delas foram isolados somente o fungo *Cladosporium*, o que levou a hipótese que este poderia ser um dos agentes causais predominantes da doença no campo.

Como poucos estudos são realizados sobre esta doença (FURTADO *et al.*, 2016), e esta vem se disseminando com rapidez na cultura da seringueira viu-se a necessidade de se aprofundar as informações sobre a epidemiologia da crosta negra, desta forma o objetivo deste estudo é a realização da identificação das espécies de fungos associados a ela, assim como suas características patogênicas.

5.2 MATERIAL E METÓDOS

5.2.1 Coleta de material e isolamento dos fungos

Foram efetuadas coletas e solicitação de amostras de folhas com sintomas característicos da antracnose, em áreas de cultivo de seringueira, viveiros e jardins clonais, em diferentes municípios, localizados nos principais Estados produtores de seringueira do Brasil.

O isolamento dos fungos em laboratório foi baseado na metodologia descrita por Junqueira e Bezerra (1990) e Gasparotto *et al.* (2012) para isolamento de *P. huberi* e *R. heveae*. As colônias de fungos obtidas foram mantidas em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) sob fotoperíodo alternado de 12 horas de luz e escuro a 25°C.

5.2.2 Identificação dos fungos obtidos

O DNA das amostras obtidas foi extraído das estruturas formadas em placa de petri conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) com modificações. As concentrações de DNA foram determinadas usando um Nanodrop ND-1000 Espectrofotômetro (Nanodrop Technologies, Rockland, Delaware). O DNA obtido foi diluído para as concentrações de trabalho de 30-60 ng. mL⁻¹.

A identificação dos fungos foi realizada a partir da análise filogenética baseada região do ITS-5.8S rDNA com os pares nucleotídeos ITS1/ITS4 e de parte do gene da β -tubulina (WHITE *et al.*, 1990). Com isso realizamos as reações de polimerase em cadeia (PCR) de acordo com Bragança (2013), utilizando oligonucleotídeos referente a cada região gênica, apresentados na Tabela 3.

TABELA 3: Regiões gênicas e oligonucleotídeos nas reações de PCR realizadas nos isolados.

Região	Oligonucleotídeos	Referências
ITS-5.8S rDNA	ITS -1F ITS-4	White et al. (1990) Gardes e Bruns (1993)
β -tubulina	BT2-F BT2b	Glass e Donaldson (1995) Woundenberg et al.

Fonte: Próprio autor.

As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e sua filogenia foi realizada usando o programa Mega 11.0 (TAMURA *et al.* 2021). Elas também foram comparadas com outras sequências obtidas no GenBank e em publicações relevantes recentes (SANTOS *et al.* 2016, MARDONES *et al.* 2017; BENSCH *et al.*, 2018).

5.2.3 Caracterização patogênica

5.2.3.1 Em estufa agrícola

Para a caracterização patogênica, os isolados foram inoculados em mudas de seis meses de idade do clone RRIM 600, que é o mais cultivado e se mostra suscetível à doença no campo. A inoculação dos fungos obtidos foi realizada via pulverização manual até o ponto escorrimento de uma suspensão de esporos dos isolados obtidos em placa de petri (50ml de suspensão de 10^6 esporos. mL⁻¹ de esporos assexuados).

Cada isolado foi inoculado em 3 mudas (assim tivemos 3 repetições para cada isolado). O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado e repetido duas vezes. Os sintomas foram acompanhados e avaliados semanalmente.

5.2.3.2 Em condições de laboratório

A inoculação em laboratório foi realizada conforme metodologia descrita por Antônio *et al.* (2021). Todas as inoculações foram mantidas em uma câmara úmida (UR

de 90%), a 25° C, montadas em caixas plásticas. Cada isolado foi inoculado em três folíolos, com 3 repetições por tratamento. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, sendo que cada câmara úmida continha um tratamento e foi repetido duas vezes. Os sintomas foram acompanhados e avaliados semanalmente. Este foi dado como encerrado quando a folha já se apresentava escura, devido a sua degradação natural por ter sido destacada da planta.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Isolados obtidos e identificação

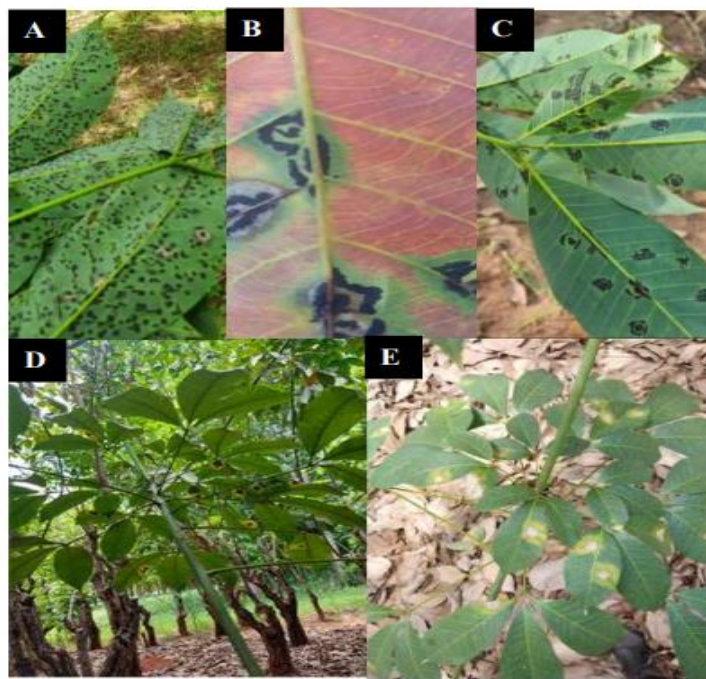
Foram obtidos 72 isolados de diferentes locais do Estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Bahia (Tabela 4). Foram observados a ocorrência de dois sintomas em folhas nas amostras processadas, placas negras pontuais e placas negras em formação de círculo, com e sem presença de estromas (Figura 3). Em alguns casos mais severos foi crosta negra na haste da planta.

TABELA 4: Descrição e procedência dos isolados utilizados no trabalho.

C.N (Crosta Negra)	Local de Coleta	Clone
C.N 1 - C.N 3	Avaí/SP	RRIM 600
C.N 4	Campina Verde/ MG	RRIM 600
C.N 5 - C.N 28	Barretos/ SP	RRIM 600
C.N 29 - C.N 38	Campina Verde /MG	RRIM 600
C.N 39 - C.N 46	Colina/SP	RRIM 600
C.N 47	Iguapíuna/BA	FDR5788
C.N 48 - C.N 49	Votuporanga/SP	RRIM 600
C.N 50	Ilheus/BA	FDR5788
C.N 51- C.N 52	Inocência/ MS	RRIM 600
C.N 53 -C.N 54	Jáu/SP	RRIM 600
C.N 55 - C.N 58	Junqueira/SP	RRIM 600
C.N 59 - C.N 70	Mendonça/SP	RRIM 600
C.N 71	Mirassolândia / SP	RRIM 600
C.N 72	Selvíria/MS	RRIM 600

Fonte: Próprio Autor.

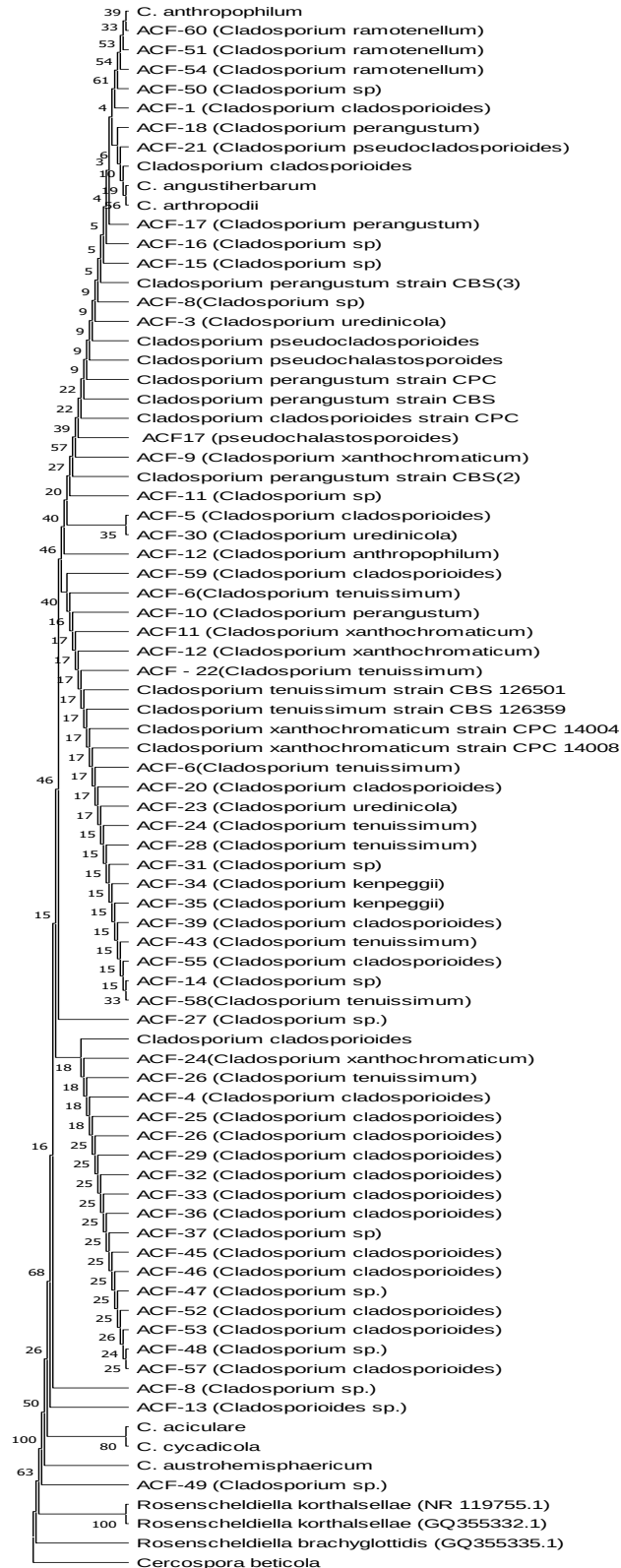
Figura 3: **A.** Sintomas encontrados no campo de crosta negra em forma de pontos. **B e C.** Sintomas visualizados no campo de crosta negras circulares. **D e E:** sintomas de crosta negra em jardim clonal.



Fonte: Próprio Autor.

Com base nos dados obtidos até o momento, não foi encontrado nenhuma espécie de *Phyllachora* associada a crosta negra nas amostras processadas. Houve um predomínio do fungo *Cladosporium* (Figura 4), que segundo Junqueira, Bezerra (1990), é a forma assexuada de *R. heveae*. Assim, foram encontradas as seguintes espécies: *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum*, *C. anthropophilum*, *C. delicatulum*, *C. uredinicola*, *C. ramotenellum*, *C. kenpeggii*. Sendo que 15 isolados somente foram identificados como *Cladosporium* sp.

FIGURA 4: Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining com sequências concatenadas das regiões ITS-5.8S rDNA, parte do gene da beta tubulina dos isolados de *Cladosporium* ssp (bootstrap com 1.000 replicações).



Fonte: Próprio Autor.

O predomínio *Cladosporium*, ou do gênero *Rosenscheldiella* no campo, pode elucidar algumas questões, principalmente em relação ao seu ciclo que pode ser parecido com o do mal das folhas, causado pelo fungo *Pseudocercospora ulei* (*Microcyclus ulei*), já que ambos os fungos são atualmente aceitos como membro da família Mycosphaerellaceae (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2014). Para exemplificar, no item em que discutiremos a patogenicidade, mostraremos que quando inoculamos *Cladosporium*, ocorre sintomas de placas negras pontuais na maioria dos casos, com pouca formação de estromas, sendo esta forma mais agressiva. Enquanto, quando inoculamos os ascósporos, a expressão da doença é mais lenta, com maior presença de estromas e mais circulares. E isso foi observado nas fotos de microscopia eletrônica de varredura, que ainda aponta a formação de estruturas assexuadas a partir da inoculação com ascósporos. Este comportamento é muito similar ao do fungo *Pseudocercospora ulei*, que tinha como nome de sua forma assexuada *Fusicladium macroporum* (GASPAROTO *et al.*, 2012), mostrando diferentes sintomas conforme a fase em que se encontrava na folha.

Sabe-se que existem três grandes complexos de espécies reconhecidos dentro do gênero *Cladosporium*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. No presente levantamento houve predomínio de espécies do complexo *C. cladosporioides*, como *C. pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, *C. perangustum*, *C. antropophilum*, *C. delicatulum*, *C. uredinicola* e *C. ramotenellum* (Figura 4). Porém houve três isolados (C.V 64, 1 e 37) que não foram identificados com base nas regiões analisadas, mas que podem pertencer a outro complexo, já apesar da região ITS do DNA não conseguir distinguir muitas espécies de *Cladosporium*, especialmente em *C. cladosporioides* e *C. herbarum*, ela tem a capacidade de diferenciar em grandes linhas na árvore filogenética a existência destes três complexos de espécies (BENSCH *et al.*, 2018).

No presente estudo, mesmo usando análises conjuntas da região ITS com parte do gene da Beta tubulina, ainda tiveram sobreposição de espécies. Zalar *et al.* (2007), ao estudarem a filogenia e ecologia de diferentes espécies de fungos do gênero *Cladosporium*, tiveram o mesmo problema. Segundo os autores, apesar do uso de análises da beta tubulina e ITS em conjunto permitirem a identificação da grande parte das espécies de *Cladosporium*, para diminuir esta sobreposição entre espécies nos estudos de filogenia, é necessário o acréscimo das análises de parte

do gene da actina. Com isso, acredita-se que futuras análises desta região nos isolados trabalhados pode finalmente elucidar a quais espécies os isolados não identificados pertencem.

Como pode ser observado na árvore filogenética, nas maiores regiões produtoras de látex, ou seja, que possuem maiores áreas plantadas de seringueira, foi encontrada maior diversidade genética, com mais espécies de *Cladosporium*. O fungo *Pseudocercospora ulei* também demonstra essa grande variabilidade morfológica e fisiológica (JUNQUEIRA *et al.*, 1984). No país tem o conhecimento de 22 raças do patógeno (FURTADO; TRINDADE, 2005). Essa grande capacidade de mutação, possibilita que o patógeno se adapte as diferentes condições climáticas, isso afeta totalmente o controle dessas doenças (GASPAROTTO; JUNQUEIRA, 1994). Infelizmente, um dos fatores que limita uma maior aproximação das espécies de *Rosenscheldiella* usadas nas análises filogenéticas com os isolados de *Cladosporium* obtidos, foi a falta de informações e depósitos da forma sexuada no Genebank e das sequencias da Beta tubulina. Há menos de sete sequências depositadas no NCBI, e as que existem pertencem a outro país.

5.3.2 Caracterização patogênica

Nos testes de patogenicidade realizados em estufa agrícola com a fase assexuada do fungo verificou-se que para alguns isolados os sintomas aparecem rapidamente, pois a maioria demonstrava causaram morte apical, lesão na haste e consequentemente, uma desfolha intensa. Estes sintomas foram vistos em campo na Bahia, onde as árvores sofreram uma desfolha intensa. No nosso caso, após 120 dias foi observada a evolução dos sintomas de alguns isolados, porém somente foi visto manchas pontuais que não evoluíram.

TABELA 5: Período de aparecimento (Dias) de sintomas em mudas de seringueira inoculadas em estufa agrícola.

<i>Isolado</i>	<i>Morte Apical</i>	<i>Lesão na Haste</i>	<i>Lesão</i> <i>Caule</i>	<i>noLesão</i> <i>na</i> <i>folha</i>
ACF01	15	15	-	-
ACF02				
ACF03	15	15	-	-
ACF04	15	15	20	20
ACF05	15	15	15	30
ACF06*	-	-	-	-
ACF07*				
ACF08	-	-	-	-
ACF09	15	15	-	30
ACF10	-	-	20	30
ACF11*	-	-	-	-
ACF12	15	15	20	-
ACF13	-	15	-	-
ACF14*				
ACF15	15	20	-	-
ACF16*	-	-	-	-
ACF17	-	15	-	30
ACF18	15	15	-	-
ACF20	-	-	-	-
ACF21	15	15	-	-
ACF22	15	15		
ACF23	-	30	-	-
ACF24*				
ACF25*				
ACF26	15	15	-	-
ACF27	-	15	-	-
ACF28	-	15	-	-
ACF29	15	15	-	-
ACF30	-	30	-	-

ACF31	15	15	-	-
ACF32	15	15	-	-
ACF33	15	15	-	-
ACF34	15	15	-	-
ACF35	15	15	-	30
ACF36	15	15	-	-
ACF37	15	15	30	-
ACF39	15	15	-	-
ACF41	-	20	-	-
ACF43	20	20	-	-
ACF45*	-	-	-	-
ACF46	-	15	-	-
ACF47	-	15	-	-
ACF48	-	-	-	-
ACF49	15	15	-	-
ACF50	-	15	-	-
ACF51	-	15	-	-
ACF52	-	15	-	-
ACF53	-	15	-	-
ACF54	15	15	-	30
ACF55	-	15	-	-
ACF57	15	20		
ACF58	15	15	-	-
ACF59	-	15	-	30
ACF60	-	-	-	20
ACF61	-	15	-	-
ACF62	-	20	-	-
ACF63	15	20	-	-
ACF64	-	20	-	30
ACF65	-	15	-	-
ACF66	15	15	-	-

Fonte: Próprio Autor.

TABELA 6: Período de aparecimento (Dias) de sintomas em folhas de seringueira inoculadas em laboratório.

<i>Isolado</i>	<i>Início das manchas</i>	<i>Enegrecimento das manchas</i>	<i>Sintomas de crosta salientes</i>	<i>de estrutura negra sexuada</i>
ACF01	13	17	-	-
ACF02	-	13	17	-
ACF03	-	17	-	-
ACF04	-	17	-	-
ACF05	-	-	17	-
ACF06	-	-	17	-
ACF07	-	-	20	-
ACF08	-	-	17	-
ACF09	-	13	17	-
ACF10	17	-	-	-
ACF11	-	17	20	-
ACF12	-	17	-	-
ACF13	-	17	-	-
ACF14	17	20		
ACF15	13	17	-	-
ACF16	-	17	-	-
ACF17	-	13	17	-
ACF18	-	17	-	-
ACF20	-	17	-	-
ACF21	-	13	17	-
ACF22	7	13	17	-
ACF23	-	13	17	-
ACF24	-	13	17	-
ACF25	-	13	17	-
ACF26	13	17	-	-
ACF27	13	17	-	-
ACF28	-	17	20	-
ACF29	17	20	-	-

ACF30	17	20	-	-
ACF31	13	17	-	-
ACF32	13	17	20	-
ACF33	13	17	-	-
ACF34	13	17	-	-
ACF35	-	-	17	-
ACF36	-	13	17	-
ACF37	13	-	17	-
ACF39	17	20	-	-
ACF41	13	17	20	-
ACF43	-	20	-	-
ACF45	-	7	17	-
ACF46	-	-	17	-
ACF47	13	17	-	-
ACF48	-	13	17	-
ACF49	7	13	-	-
ACF50	-	17	-	-
ACF51	7	13	-	-
ACF52	-	13	20	-
ACF53	-	13	17	-
ACF54	-	20	-	-
ACF55	-	17	-	-
ACF59	-	17	20	-
ACF58	-	13	17	-
ACF59	-	14	20	-
ACF60	-	-	17	-
ACF61	-	14	17	-
ACF62	13	17	-	-
ACF63	-	13	17	-
ACF64	-	13	17	-
ACF65	7	13	17	-
ACF66	-	13	17	-

Fonte: Próprio Autor.

Acredita-se que esse comportamento dos sintomas apresentados na condução da caracterização patogênica em estufa agrícola está relacionado com a temperatura na nossa região, principalmente na casa de vegetação, que ficou em média de 38°C, conforme termômetros instalados nela. É possível que altas temperaturas possam influenciar o aparecimento de sintomas típicos da doença, o que foi extremamente difícil de reproduzir. Essa hipótese foi levantada com base em observações realizadas nos testes de temperatura com visualização em microscopia eletrônica, que apontavam melhor desenvolvimento do patógeno, independente da sua fase, em temperaturas menores de 25°C (VALARINI *et al.*, 2022). Este fato corrobora com os resultados obtidos em inoculações realizadas em laboratório, todos os isolados se mostraram patogênicos nesta situação (25°C de maneira constante).

Firmino *et al.* (2022), ao correlacionar o comportamento de diferentes clones de seringueira afetados pela crosta negra observou que quando se teve maior amplitude térmica e médias de temperaturas abaixo de 30°C no campo houve maior severidade da doença, novamente corroborando com as observações realizadas nas análises realizadas em microscopia eletrônica de varredura (VALARINI *et al.*, 2022).

5.4 CONCLUSÕES

Através do sequenciando da região ITS do DNA e da parte do gene da beta tubulina, foram obtidos a predominância do gênero *Cladosporium*, que apresentou uma diversidade genética a depender do isolado da região do país estudada.

Nos testes de patogenicidade realizados na estufa e em condições laboratoriais a os isolados demonstraram patogenicidade.

Essas informações contribuem para o entendimento da epidemiologia da doença e podem auxiliar no seu manejo de controle no campo.

REFERÊNCIAS

- ADASKAVEG, J. E.; HARTIN, R. J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 9, p. 979-987, 1997.
- ALVARENGA, A.A.; CARMO, C.A.F. **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. 894 p.
- ANTONIO, G. L. *et al.* Clonal resistance of rubber tree to *Colletotrichum* spp. **Forest Pathology**, Berlin, v. 51, n. 3, p. e12685, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/efp.12685>
- ANTONIO, G. L. **Caracterização e identificação molecular, morfo-cultural, fisiológica e patogênica de isolados de *Colletotrichum* spp. de seringueira e avaliação de resistência de diferentes clones a esse patógeno**. 2020. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Ilha Solteira, 2020.
- BOAVA, L. P. *et al.* Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical plant pathology**, Heidelberg, v. 35, n.2, p. 124-128, 2010.
- BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 2013. 69 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- CAI, L. *et al.* A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 183-204, 2009.
- CANNON, P. F. *et al.* *Colletotrichum*: current status and future directions. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 181-213, 2012.
- CARBONE, I.; J. B.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v. 91, p. 553-556, 1999.
- CROUCH, J. A. *et al.* Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 717-732, 2009.
- DAMM, U. *et al.* The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 37-113, 2012a.
- DAMM, U. *et al.* The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 1-36, 2012b.
- DAMM, U. *et al.* *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 45-87, 2009.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC, 1985. 355 p.

ESCANFERLA, M. E. *et al.* Pre-penetration stages of *Guignardia psidii* in guava: effect of temperature, wetness duration and fruit age. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, p. 618-624, 2009.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.

FURTADO, E.L.; TRINIDADE, D.R. Doenças da seringueira. In: KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 559-569.

FURTADO, E. L.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Doenças da Seringueira. In: AMORIM, L. *et al.* **Manual de fitopatologia**. 5. ed. São Paulo: Ceres, 2016. P. 359-372.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, Malden, v. 2, p. 113-118, 1993.

GASPAROTTO, L. *et al.* Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea* spp.) por *Microcyclus ulei*. **Fitopatologia Brasileira Heidelberg**, v. 14, p. 38-41, 1989.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FURTADO, E.L. Doenças das Folhas. In: GASPAROTTO, L.; REZENDE PEREIRA, J.C. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Editora Embrapa, 2012. cap. 3, p. 35 – 176.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GUEN, V.; SEGUIN, M.; MATTOS, C. R. Qualitative resistance of *Hevea* to *Phyllachora huberi* P. Henn. **Euphytica**, Dordrecht, v. 11, p. 211-217, 2000.

GUERBER, J. C.; LIU, B.; CORRELL, J. C.; JOHNSTON, P. R. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycologia**, Lancaster, v. 95, n. 5, p. 872-895, 2003.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.;

YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 147-182, 2009.

INFORMA ECONOMICS FNP. Seringueira. In: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-408.

JUNQUEIRA, N. T. V., BEZERRA, J. L. **Ocorrência e controle de nova doença fúngica em seringais de cultivo no estado do Amazonas**. Brasília, DF: Embrapa - CNPDS, 1986. p.1-3 (Comunicado Técnico, 54).

KISS, L., Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 109, E1811-E1811 (2012). <https://doi.org/10.1073/pnas.1207143109>.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.E.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum**: host specificity, pathology and host-pathogen Interaction. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 45-56.

MELO, D. F. **Produção, armazenamento, estabilidade e eficiência de linhagens de *Dicyma pulvinata* no biocontrole para o mal-das-folhas da seringueira**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p.170-179, 2006.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of highmolecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

PIEROZZI, C. G. **Efeito de fungos sapróbios do semiárido nordestino como indutores no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

PRIHASTUTI, H. *et al.* Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 39, p. 89-109, 2009.

SANTOS, R. S.; BARBOSA, J. J. **Template para produção de trabalhos acadêmicos na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Unesp**. Ilha Solteira: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Biblioteca, 2021. 41 f. Disponível em: <https://www.feis.unesp.br/#!/biblioteca/>. Acesso em: 01 jun. 2021.

SARMIENTO, S. S. **Identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose foliar da seringueira**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SCALOPPI JÚNIOR, E.J. O poder público precisa olhar para os seringais. In: INFORMA ECONOMICS FNP. **Agrianual 2015**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2015. p. 403-404.

SCHOCH, C.L. *et al.* Código de barras fúngico, C.; Fungal Barcoding Consortium. **Proc. Nacional Acad. ciência EUA**, [s. l.], v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SIERRA-HAYER, J. F. **Caracterização e controle de *Colletotrichum* spp. em seringueira (*Hevea brasiliensis*)**. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

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

SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, R. M. G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 13, n. 1-2, p. 19, 1987. Resumo.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. **Antracnose**: nova doença do painel de sangria da seringueira. São Paulo: Instituto Biológico, 1992.

SMITH, B. J.; BLACK, L. L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 1, p. 69-76, 1990.

TAMURA, K, STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 38, p. 3022-3027, 2021.

TOZZE JÚNIOR, H.J. **Caracterização e identificação de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annuum*) no Brasil**. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 71-79, 2006.

TUITE, J. **Plant pathological methods**: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess Publ., 1969. 239 p.

WASTIE, R. L. Secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*: factors affecting the production, germination and viability of spores of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 72, n. 3, p. 273-282, 1972.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 73, p. 115-180, 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M. A. (ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

WOUDENBERG, J. H. C. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. **Persoonia**, Utrecht, v. 22, p. 56-62, 2009.

ZALAR, P. *et al.* Filogenia e ecologia do onipresente sapróbio *Cladosporium sphaerospermum*, com descrições de sete novas espécies de ambientes hipersalinos. **Estudos em micologia**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 157-183, 2007.