



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

GLÍCIA SILVA DE MORAES

**FILOGENIA E MORFOLOGIA DE *Pseudoperonospora* ASSOCIADA À
CUCURBITÁCEAS NO BRASIL**

Recife
2022

GLÍCIA SILVA DE MORAES

**FILOGENIA E MORFOLOGIA DE *Pseudoperonospora* ASSOCIADA À
CUCURBITÁCEAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Alexandre Reis Machado

Coorientador: Ailton Reis

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Moraes, Glícia Silva de
Filogenia e morfologia de *Pseudoperonospora* associada à Cucurbitáceas no Brasil
/ Glícia Silva de Moraes. – 2022.

44 f. : il.

Orientador: Alexandre Reis Machado.

Coorientador: Ailton Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Pragas agrícolas. 2. Fungos. 3. Filogenia. I. Machado, Alexandre Reis (orientador) II. Reis, Ailton (coorientador). III. Título.

632.603

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-202

GLÍCIA SILVA DE MORAES

**FILOGENIA E MORFOLOGIA DE *Pseudoperonospora* ASSOCIADA À
CUCURBITÁCEAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 22/ 02 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Examinadora Interna Titular)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André Ângelo Medeiros Gomes (Examinador Externo Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Examinadora Interna Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira (Examinador Externo Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Chega ao fim mais um ciclo da minha trajetória acadêmica, após dois anos de muito aprendizado, eu não poderia deixar de agradecer aqueles que tiveram alguma contribuição, seja de forma direta ou indireta, para a realização deste projeto.

Toda minha gratidão, amor e respeito aos meus pais, Maria Joeciclecia Ferreira da Silva e Gildenor Rodrigues de Moraes e também aos meus irmãos, Gildemberg Silva de Moraes, Gildenclecio Silva de Moraes e Giusepe Silva de Moraes.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco e ao CNPq pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos e todos os professores por todo suporte e conhecimento transmitido durante o mestrado, essenciais para a minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Reis Machado, o qual tenho grande admiração, agradeço por todas as palavras de incentivo, dedicação e conhecimento compartilhado durante esses dois anos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ailton Reis, por sua colaboração durante a pesquisa.

Ao grupo de pesquisa "Taxonomia de Fungos Fitopatogênicos" em especial Juliana Mello e Amanda Cupertino por toda disponibilidade e apoio, fico muito feliz em ter encontrado pessoas tão receptivas e atenciosas.

Não poderia deixar de agradecer a minha querida professora, ex-orientadora e amiga, Dra. Virgínia Svedese que me apresentou ao mundo dos fungos, me incentivou a tentar esse mestrado e sempre esteve ao meu lado quando precisei, obrigada por todo amparo!

Aos meus amigos Matheus de Jesus, Deivid Moraes, Laysla Motta e Carlos Lima que conviveram comigo durante todo esse período de mestrado e foram meu ponto de apoio em Recife, sem vocês tudo teria sido mais difícil.

E, por fim, agradeço todos aqueles que não mencionei nomes, mas estiveram torcendo por mim e contribuíram de alguma forma. Obrigada!

RESUMO

Dentre os gêneros de oomicetos causadores de míldios, *Pseudoperonospora* se destaca devido ao impacto gerado na agricultura mundial. Uma das espécies mais importantes desse gênero é a espécie *Pseudoperonospora cubensis*, conhecida por causar o míldio das cucurbitáceas, doença relatada em aproximadamente 70 países e que atinge culturas comerciais importantes da família Cucurbitaceae como o pepino (*Cucumis sativus*), a melancia (*Citrullus lanatus*), as abóboras (*Cucurbita máxima*, *C. moschata* e *C. pepo*) e o melão (*Cucumis melo*). Estudos sobre a diversidade e filogenia de *Pseudoperonospora* apontam que a epidemia que ocorreu em 2004 nos EUA, e as epidemias em outras partes do mundo como Israel e parte da Europa, podem estar relacionadas ao surgimento de uma nova espécie críptica de *Pseudoperonospora*. O conhecimento sobre essa nova possível espécie é o ponto de partida para o desenvolvimento de cultivares de cucurbitáceas resistentes e para o manejo eficiente da doença. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a filogenia de *Pseudoperonospora* associada ao míldio das cucurbitáceas em áreas de diferentes regiões do Brasil. Para isso, foram realizadas coletas de folhas com sintomas de míldios em áreas de produção de Cucurbitáceas nos estados de Pernambuco, Minas Gerais, Ceará, Goiás e no Distrito Federal. Para as análises filogenéticas foi realizada a extração de DNA, depois as reações de PCR utilizando primers DC-6 e LR-0; Cox2-F e Cox2-RC4; Ypt1F e Ypt4R, para amplificação da região espaçador transcrito interno (ITS), da região mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II (cox2) e proteína relacionada a Ras (Ypt1), respectivamente. Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências de nucleotídeos foram analisadas, editadas e alinhadas para realização da análise filogenética de Inferência Bayesiana (BI). Para análises morfológicas as estruturas do patógeno foram montados em lactoglicerol para visualização em microscópio de luz e foram realizadas 30 medições de todos os caracteres morfológicos relevantes. Foram obtidas 36 amostras de DNA de *Pseudoperonospora* e o sequenciamento resultou em 26 sequências da região Cox2 e 25 sequências de ITS (totalizando 51 sequências). As análises filogenéticas das regiões genicas Cox2 e ITS foram realizadas separadamente e em conjunto, o que gerou uma árvore filogenética de ITS que apresentou um grande grupo monofilético com todas as amostras. Na análise filogenética de sequências de Cox2 assim como na árvore concatenada (Cox2/ITS)

as amostras do presente estudo foram separadas em dois grupos. A existência desses dois agrupamentos sugere que no Brasil ocorre diversidade filogenética entre as linhagens de *P. cubensis*, reforçando a possibilidade de existirem espécies crípticas causadoras do míldio das Cucurbitáceas. Porém as análises não apresentam dados robustos o suficiente para a proposição de uma espécie críptica de *P. cubensis*. Como consequência da íntima relação filogenética existente nesse grupo são necessárias análises de genes adicionais com alto sinal filogenético.

Palavras-chave: COX2; espécie críptica; ITS; míldio; oomiceto.

ABSTRACT

Among the genera that cause downy mildew, *Pseudoperonospora* stands out due to the impact generated in globally agriculture. One of the most important species of this genus is *Pseudoperonospora cubensis*, known for causing the downy mildew of cucurbits, a disease reported in approximately 70 countries and that affects important commercial members of the Cucurbitaceae family, such as cucumber (*Cucumis sativus*), watermelon (*Citrullus lanatus*), pumpkin (*Cucurbita maximus*), squash (*C. moschata*), zucchini (*C. pepo*) and melon (*Cucumis melo*). Studies on the diversity and phylogeny of *Pseudoperonospora* shows that the epidemic that occurred in 2004 in the USA, and epidemics in other parts of the world such as Israel and part of Europe, may be related to the emergence of a new cryptic species of *Pseudoperonospora*. Knowledge about this possible new species is the starting point for the breeding of resistant cucurbits and the management of the disease. Therefore, the objective of this study was to determine the phylogeny of *Pseudoperonospora* associated with downy mildew of cucurbits in areas of different regions of Brazil. For this, leaves with symptoms of downy mildew were collected in areas of Cucurbit production in the states of Pernambuco, Minas Gerais, Ceará, Goiás and the Distrito Federal. For the phylogenetic analyses, DNA extraction was performed. Then PCR reactions using primers DC-6 and LR-0, Cox2-F, Cox2-RC4, Ypt1F and Ypt4R, for amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region, the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II (cox2) and Ras-related protein (Ypt1), respectively. PCR products were sequenced and nucleotide sequences were analyzed, edited and aligned to perform phylogenetic analysis by Bayesian Inference (BI). For morphological analyses the pathogen structures were mounted in lactoglycerol for viewing under a light microscope and 30 measurements of all relevant morphological characters were performed. Thirty-six *Pseudoperonospora* DNA samples were obtained and sequencing resulted in 26 sequences of the Cox2 region and 25 ITS sequences (totaling 51 sequences). The phylogenetic analyses of the genetic regions Cox2 and ITS were done separately and together, which generated a phylogenetic tree of ITS that presented a big monophyletic group with all the samples. In the tree of Cox2 as well as in the concatenated tree (Cox2/ITS) the samples of the present study were separated in two groups. The existence of these two clusters indicates that there is phylogenetic diversity among the lineages of *P. cubensis* in Brazil, reinforcing the

possibility of the existence of cryptic species that cause Cucurbits mildew. However, the analyses do not present data robust enough for the proposition of a cryptic species of *P. cubensis*. As a result of the close phylogenetic relationship existing in this group, analyses of additional genes with high phylogenetic signal are necessary.

Keywords: COX2; cryptic species; downy mildew; ITS; oomycete.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ilustração de um esporangióforo e esporângios de *Pseudoperonospora cubensis* coletados de *Cucumis sativus*. Foram medidas o comprimento do esporangióforo (a), altura da primeira ramificação (b), largura do tronco (c), comprimento dos ramos finais mais longos (d) e mais curtos (e), bem como o comprimento (f) e a largura (g) dos esporângios..... 28
- Figura 2 – Árvore filogenética de *Pseudoperonospora* obtida por inferência bayesiana da região ITS. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425..... 33
- Figura 3 – Árvore filogenética de *Pseudoperonospora* obtida por inferência bayesiana da região Cox2. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425 (GenBank: JN618604.1) 34
- Figura 4 – Árvore filogenética obtida por inferência bayesiana das regiões Cox2 e ITS concatenadas. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425 35

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Doenças que afetam culturas de cucurbitáceas..... | 16 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Amostras de <i>Pseudoperonospora</i> utilizadas nas análises filogenéticas..... | 29 |
| Tabela 2 – Comparação das características morfológicas de <i>Pseudoperonospora</i> | 36 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 15 |
| 2.1 | A FAMÍLIA CUCURBITACEAE | 15 |
| 2.1.1 | Doenças das Cucurbitáceas | 16 |
| 2.2 | MÍLDIOS..... | 17 |
| 2.3 | O GENERO <i>Pseudoperonospora</i> | 18 |
| 2.4 | MÍLDIO DAS CURCUBITACEAS..... | 19 |
| 2.4.1 | Taxonomia e Morfologia de <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | 19 |
| 2.4.2 | Ciclo de vida, modo de infecção, sintomas e sinais..... | 20 |
| 2.4.3 | Manejo da doença e Controle..... | 21 |
| 2.4.4 | Patogenicidade e surgimento de espécies crípticas de <i>Pseudoperonospora</i> | 22 |
| 2.4.5 | Panorama do míldio das cucurbitáceas no Brasil..... | 24 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1 | ÁREA DE COLETA..... | 26 |
| 3.2 | EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E FILOGENIA..... | 26 |
| 3.3 | ANÁLISE MORFOLÓGICA..... | 28 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 4.1 | ANÁLISES FILOGENÉTICAS..... | 29 |
| 4.2 | ANÁLISES MORFOLÓGICAS..... | 36 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 38 |
| | REFERÊNCIAS..... | 39 |

1 INTRODUÇÃO

Os míldios representam um grupo de doenças que ocorre em uma elevada gama de espécies de plantas e são causados por espécies de oomicetos biotróficos da família Peronosporaceae (Oomycota; Chromista/Stramenopiles). Esse tipo de doença geralmente ocorre em folhas, mas também pode ocorrer em frutos jovens e ramificações novas, e muitas vezes causa grandes prejuízos à agricultura (VOGLMAYR, 2008).

Dentre os gêneros causadores de míldios, pode-se destacar *Pseudoperonospora* devido ao impacto gerado na agricultura mundial. A espécie mais comum e importante desse gênero é *Pseudoperonospora cubensis* ((Berk. & M.A. Curtis) Rostovtzev 1903), conhecida por causar os míldios das cucurbitáceas (AGRIOS, 2005; VOGLMAYR, 2008; LEBEDA e COHEN, 2011; ARAFA e SHIRASAWA, 2018). *P. cubensis* já foi relatado em 70 países, variando de ambientes subtropicais a temperados a semiáridos (PALTÍ e COHEN, 1980).

O míldio das cucurbitáceas pode ocorrer em qualquer idade da hospedeira. De forma geral, se caracteriza por lesões cloróticas, irregulares, limitadas pelas nervuras (manchas angulares) que evoluem para necrose na parte adaxial das folhas. Na parte abaxial, pode-se observar uma fina camada micelial contendo esporangióforos que sustentam esporângios de coloração amarronzada ou violeta (LEBEDA e COHEN, 2011). *P. cubensis* infecta aproximadamente 20 gêneros de cucurbitáceas, incluindo pepino (*Cucumis sativus* L.), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), abóboras (*Cucurbita máxima* Duchesne, *C. moschata* (Duchesne) Duchesne ex Poir e *C. pepo* L.) e melão (*Cucumis melo*) (LEBEDA e URBAN, 2007). No Nordeste brasileiro, o míldio das cucurbitáceas é a principal doença foliar que afeta a produção do meloeiro no período chuvoso (SANTOS *et al.*, 2003).

Por apresentar alto potencial evolutivo capaz de superar rapidamente a resistência do hospedeiro e a efetividade de alguns fungicidas (LEBEDA e URBAN, 2007), o controle do míldio das cucurbitáceas tem sido difícil nos últimos anos. Nos Estados Unidos (EUA) por exemplo, esse patógeno foi facilmente controlado anteriormente, com resistência do hospedeiro no pepino, porém em 2004 ressurgiu causando grandes perdas econômicas (COLUCCI *et al.*, 2006). Para explicar o ressurgimento do míldio das cucurbitáceas nos Estados Unidos algumas hipóteses foram investigadas, como as que apontam que o motivo poderia ter sido a introdução

de uma nova linhagem ou patótipo, ou mesmo de uma nova espécie do patógeno (COLUCCI, 2008; RUNGE *et al.*, 2011). Foi levantada também a possibilidade da existência de linhagens crípticas dentro de *P. cubensis* que teriam hibridado, resultando no surgimento de cepas hipervirulentas (RUNGE *et al.*, 2011).

A plasticidade genética de *P. cubensis* e a capacidade de se reproduzir sexualmente permite que ocorra uma rápida evolução (THOMAS *et al.*, 2017), o que talvez resulte em um alto risco de desenvolver resistência aos fungicidas disponíveis e a menor durabilidade da resistência em novas cultivares que possam ser empregadas no controle do míldio (THOMAS, COHEN e OJEOMBA 2017).

Cohen *et al.* (2015) relatam que apesar das recentes descobertas como o surgimento de novas raças agressivas nos Estados Unidos, de novos patótipos em Israel e na Europa e o aparecimento de novos tipos de acasalamento A2 em Israel, Estados Unidos, Ásia e Europa, os motivos responsáveis pelo ressurgimento de *P. cubensis* em muitas regiões do mundo ainda não foram inteiramente compreendidos, pois existem grandes lacunas a serem preenchidas sobre a biologia populacional, epidemiologia, genética e genômica de *P. cubensis*.

Sendo assim, para entender as mudanças na patogenicidade assim como a resistência à fungicidas para conseguir um manejo integrado eficiente, é preciso investir em pesquisas detalhadas para o entendimento das forças evolutivas responsáveis pela variação genética temporal dentro e entre as populações de *P. cubensis* (LABEDA e URBAN, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a filogenia de *Pseudoperonospora* associada ao míldio das cucurbitáceas em áreas de diferentes regiões do Brasil.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A FAMÍLIA CUCURBITACEAE

Cucurbitaceae Juss é uma família botânica pertencente à ordem Cucurbitales com ocorrência predominante em regiões tropicais e subtropicais, bastante diversa com aproximadamente 95 gêneros e 980 espécies. No Brasil são registrados cerca de 30 gêneros e 157 espécies de cucurbitáceas (SCHAEFER e RENNER, 2011; GOMES-KLEIN *et al.*, 2015; APG IV, 2016; LUTZ *et al.*, 2021). Muitos dos representantes da família Cucurbitaceae possuem importância econômica e são cultivados tanto para uso na alimentação como uso ornamental ou fonte de matéria-prima (LUTZ *et al.*, 2021).

As plantas pertencentes a essa família são em sua maioria herbáceas de hábito rasteiro ou trepadeiras, anuais ou perenes, monóicas ou dióicas, com flores solitárias ou em inflorescências racemosas/cimosas, pentâmeras, epíginas, actinomorfas, apresentam gavinhas simples ou compostas, caule angulosos ou sulcados com feixes vasculares bicolaterais e folhas alternas sem estípulas, pecioladas, lâmina simples ou composta; base geralmente cordada e margem com pequenos dentes remotos (GOMES-COSTA e ALVES, 2012; FLORA DO BRASIL, 2020).

Entre os representantes da família Cucurbitaceae mais conhecidos podemos citar as abóboras (*Cucurbita* spp.), melancia [(*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai)], melões (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), o chuchu [*Sechium edule* (Jacq.) Sw] o maxixe (*Cucumis anguria* L.) o melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.); a cabaça (*Lagenaria* Ser.) e a bucha (*Luffa* Mill.) (GOMES-KLEIN *et al.*, 2015; LUTZ *et al.*, 2021).

No Brasil as cucurbitáceas representam 23% do volume de hortaliças comercializadas, com destaque para a produção de melancia, abóbora, chuchu e melão. Em menor escala são produzidos o pepino, o maxixe e a bucha vegetal (LOPES *et al.*, 2014; IBGE, 2017). No contexto mundial o Brasil está entre os dez maiores produtores de melancia e entre os onze maiores produtores de melão, sendo as regiões Sul e Nordeste as maiores responsáveis pela produção de melancia e

melão do Brasil nos últimos anos (DIAS e REZENDE, 2010; RESENDE e COSTA, 2010).

2.1.1 Doenças que afetam cucurbitáceas

Considerando a grande importância das cucurbitáceas para a alimentação e para o mercado, é indispensável que se conheça as doenças que atingem essa cultura. No Brasil ocorrem doenças causadas por diversos vírus, bactérias, fungos e oomicetos (Quadro 1). Entre elas, o míldio, considerado uma doença importante em melão, pepino, melancia e abóbora que pode afetar outras cucurbitáceas cultivadas ou selvagens (PAVAN *et al.*, 2016). Nos últimos anos ocorreram epidemias de míldio causadas por *P. cubensis* em diversos países e para que possa ser combatido com eficácia é preciso investigar as causas dessas epidemias e conhecer melhor o patógeno.

Quadro 1. Doenças que afetam culturas de cucurbitáceas.

| Viroses | Bacterioses | Doenças causadas por fungos/oomicetos | Doenças causadas por nematoides |
|--|--|---|---|
| Mosaico amarelo da abobrinha-de-moita - (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> - ZYMV) | <i>Mancha angular</i> - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> | Antracnose- <i>Colletotrichum orbiculare</i> (sin. <i>C. /agenarium</i>) | Nematoides de Galhas - <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Mosaico do mamoeiro - estirpe melancia (<i>Papaya ringspot virus</i> - type W - PRSV-W) | Mancha bacteriana do fruto - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> | Crestamento gomoso do caule - <i>Didymella bryoniae</i> (sin. <i>Mycosphaerella melonis</i>) | |
| Mosaico do pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i> - CMV) | | Míldio - <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | |
| Mosaico da abóbora (<i>Squash mosaic virus</i> - SqMV) | | Mancha zonada - <i>Leandria momordicae</i> | |
| Mosaico da melancia (<i>Watermelon mosaic virus</i> - WMV) | | Oídio - <i>Podosphaera xanthii</i> | |

| | | | |
|---|--|--|--|
| Vírus da clorose letal da abobrinha-de-moita (<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i> - ZLCV) | | Sarna ou queima - <i>Cladosporium cucumerinum</i> | |
| Vírus da mancha anelar do amendoim (<i>Groundnut ringspot virus</i> - GRSV) | | Murcha de <i>Fusarium</i> da melancia - <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> | |
| Vírus da necrose da abóbora (provavelmente um <i>Necrovirus</i>) | | Podridão das raízes e do colo - <i>Fusarium solani</i> | |
| Vírus do amarelão do meloeiro (<i>Melon yellowing-associated virus</i> - MyaV) | | Mancha de <i>Alternaria</i> - <i>Alternaria cucumerina</i> | |
| | | Mancha de <i>Cercospora</i> - <i>Cercospora citrullina</i> | |
| | | Mancha Alvo - <i>Corynespora cassiicola</i> | |
| | | Podridão de <i>Choanephora</i> - <i>Choanephora cucurbitarum</i> | |

Fonte: Pavan *et al.*, (2016)

2.2 MÍLDIOS

Míldio é uma doença causada por oomicetos (Chromista/Stramenopiles, Oomycetes, Peronosporales), com mais de 700 espécies distribuídas em 19 gêneros, sendo considerado o grupo mais diverso no filo Oomycota. Este grupo é composto por patógenos biotróficos obrigatórios de plantas (BEAKES *et al.*, 2014) e atualmente podem ser divididos em quatro subgrupos: Míldios de gramíneas; Míldio de brassicolous; Míldios com conídios coloridos e Míldios com haustório piriforme (BEAKES *et al.*, 2014; THINES e CHOI, 2016).

São os causadores de Míldios de gramíneas, os gêneros (*Erapthora* Telle & Thines, *Graminívora* Thines & Göker, *Peronosclerospora* (S. Ito) Hara, *Poakatesthia* Thines & Göker, *Sclerospora* J. Schröter, *Sclerophthora* Thirumalachar, C.G. Shaw & Narasimhan e *Viennotia* Göker, Voglmayr, Riethm., M. Weiss & Oberwinkler) (BEAKES *et al.*, 2014; THINES e CHOI, 2016). Esse grupo parasita plantas da família Poaceae, principalmente as com fotossíntese C4 (SPENCER e DICK, 2002), possui

distribuição tropical e acredita-se que sua origem foi no centro ao sudeste da Ásia (SPENCER e DICK 2002).

Os causadores de Míldios de gramíneas estão associados a doenças devastadoras das gramíneas cultivadas como a cana-de-açúcar, sorgo e milho. Por possuir uma alta diversidade é considerado como clado basal nos estudos que apresentam as relações filogenéticas dos míldios. Existe a hipótese que a diversificação de todos os míldios tenha começado a partir de hospedeiros na família *Poaceae* (THINES *et al.*, 2007).

Míldios de Brassicaceous é causada por um grupo composto por dois gêneros, *Hyaloperonospora* e *Perofascia*, essa doença é favorecida em regiões com clima temperado no período de outono-inverno. Eles atingem culturas da família Brassicaceae e causam grandes perdas econômicas. Dentre as culturas afetadas estão: couve-flor, brócolis, repolho, couve de bruxelas e nabo (COELHO, 2011; LEE *et al.*, 2017).

Míldios com haustório piriforme é um subgrupo formado pelos gêneros que possuem como característica haustórios piriformes a vesiculares, sendo o grupo mais diverso dos míldios com oito gêneros (*Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Novotelnova*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna* e *Protobremia*) (THINES *et al.*, 2006; THINES *et al.*, 2009; BEAKES *et al.*, 2014). E por fim, temos os Míldios com conídios coloridos, com dois gêneros de grande importância econômica (*Peronospora* e *Pseudoperonospora*) e mais de 500 espécies (BEAKES *et al.*, 2014).

2.3 O GÊNERO *Pseudoperonospora*

O gênero *Pseudoperonospora* [(Berk. et Curt.) Rostovzev, 1903], descrito inicialmente pela espécie-tipo *Peronospora cubensis*, sendo assim classificado como *Peronospora*, através de um exemplar vegetal originário de Cuba em 1868 por Berkeley. Foi reclassificado como *Pseudoperonospora*, no ano de 1903 por Rostovzev, que conseguiu observar e descrever esse patógeno pela primeira vez em plantas vivas, no Jardim Botânico de Moscou na Rússia (LEBEDA e COHEN, 2011).

As diferenças morfológicas mais evidentes entre *Pseudoperonospora* e *Peronospora* são a parede do esporo não poróide e uniformemente espessa em *Peronospora* além de sua germinação que é apenas por tubo germinativo, já em *Pseudoperonospora* os esporos são esporângios verdadeiros, possuem um ápice

poróide e germinam por zoósporos (PALTI e COHEN, 1980). *Pseudoperonospora* e *Peronospora* são dois gêneros intimamente relacionados.

Como mencionado anteriormente esses dois gêneros pertencem ao subgrupo dos míldios de conídios coloridos (BEAKES *et al.*, 2014) e compartilham semelhanças como a cor dos conidiosporângio e a morfologia do haustório e do conidiosporangióforo (LEBEDA e COHEN, 2011). Dentro de *Pseudoperonospora* são aceitas cinco espécies (*P. cubensis*, *P. humuli*, *P. cannabina*, *P. celtidis*, *P. urticae*), sendo *P. cubensis* e *P. humuli* as que possuem maior importância econômica (RUNGE *et al.*, 2011).

Por não possuírem diferenças morfológicas significativas e pelo fato de algumas características serem influenciadas tanto pelo hospedeiro quanto por fatores ambientais, a classificação das espécies desse gênero leva em consideração principalmente os seus hospedeiros (RUNGE *et al.*, 2011). Sendo assim, para uma melhor resolução das relações filogenéticas dessas espécies, é importante que sejam utilizados marcadores moleculares (SAVORY *et al.*, 2011).

2.4 MÍLDIO DAS CURCUBITACEAS

2.4.1 Taxonomia e Morfologia de *Pseudoperonospora cubensis*

O míldio das cucurbitáceas é uma doença foliar de grande importância econômica que ocorre em vários gêneros de cucurbitáceas. O seu agente causal é a espécie de oomiceto *P. cubensis*, essa espécie é uma das poucas espécies causadoras de míldio que consegue infectar mais de um gênero de hospedeiro (RUNGE *et al.*, 2011; BEAKES *et al.* 2014).

Quanto à sua morfologia *P. cubensis* apresenta haustórios pequenos, ovados e intercelulares que infectam o tecido foliar, através dos estômatos ou lesões. Surgem os esporangióforos que são hialinos retos, não septados, ligeiramente túrgidos na base e possuem ramificação monopodial podendo ser dicotômica ou pseudo-dicotômica. Os ramos finais são de reto à sub-reto com um vértice subtruncado (PALTI e COHEN, 1980; SALCEDO *et al.*, 2020).

No ápice dos esporangióforos estão os esporângios que podem ser de ovóides a elipsoidal em forma de limão, de cor marrom-oliváceo, paredes finas e pedicelo curto e protuberante. Em condições favoráveis os esporângios podem germinar e liberam

zoósporos, que são caracterizados pelos seus dois flagelos laterais (PALTI e COHEN, 1980; SALCEDO *et al.*, 2020). As espécies causadoras do míldio estão classificadas dentro do Reino Chromista; Filo Oomycota; Classe Peronosporomycetes; Ordem Peronosporales; Família Peronosporaceae; Gênero *Pseudoperonospora* (BEAKES *et al.* 2014).

2.4.2 Ciclo de vida, modo de infecção, sintomas e sinais

A principal forma de reprodução de *P. cubensis* é a assexuada, que ocorre através da germinação indireta de esporângios. Inicialmente os esporângios se desprendem do esporangióforo e são dispersos pelo vento ou respingos de água, (LEBEDA e COHEN, 2011). Quando encontram a planta hospedeira, são depositados sob as folhas e se existir a presença de uma lâmina de água na folha, alta umidade e temperatura na faixa de 16 a 22°C, o protoplasto multinucleado do esporângio de *P. cubensis* pode se diferenciar em até 15 zoósporos biflagelados (PALTI E COHEN, 1980; PAVAN *et al.*, 2016).

Os zoósporos, com auxílio de seus flagelos, nadam até os estômatos por onde se inserem, perdem seus flagelos e encistam. A próxima fase ocorre após o cisto gerar um tubo germinativo e a partir desse tubo emerge o apressório, permitindo ao patógeno se fixar no hospedeiro possibilitando que a hifa de penetração se desenvolva e penetre na abertura estomática para a cavidade subestomática do tecido foliar (LEBEDA e COHEN, 2011).

Em até sete dias *P. cubensis* consegue colonizar o tecido foliar do hospedeiro e a presença de esporangióforos pode ser observada, principalmente na parte abaxial das folhas. Assim é iniciado um novo ciclo de infecção da doença, que possui um ciclo classificado como policíclico, um fator importante para a rápida disseminação da doença (KRANZ, 2003). A reprodução sexuada ocorre por meio de oósporos, porém é um processo raro de ser observado. Existem relatos da formação de oósporo em países como a Rússia, China, Japão, Índia e Itália (LEBEDA e COHEN, 2011).

Em um experimento de laboratório Cohen e Rubin (2012), conseguiram produzir oósporos de *P. cubensis*, que foi possível apenas em alta umidade, baixa temperaturas e com a presença de dois tipos de acasalamento: A1 e A2, sugerindo assim que esse oomiceto é heterotático. Os oósporos diferiram em cor quanto ao

hospedeiro, hialinos (no pepino) a castanho-avermelhado (no melão), esféricos, com paredes lisas, com um diâmetro médio de 40,8 µm.

Quanto aos sintomas, o míldio das cucurbitáceas é caracterizado pela presença de lesões angulares cloróticas nas folhas, que podem apresentar um centro necrótico com o avançar da doença (SAVORY *et al.*, 2011). Em estágios onde a infecção está muito forte pode ocorrer a formação de esporangióforos nos caules, pecíolos das folhas, gavinhas e pedúnculos (PALTI E COHEN, 1980). Dependendo das condições ambientais, da carga de inóculo e da resistência da planta hospedeira, o período entre a penetração do patógeno na célula hospedeira até os primeiros sintomas visíveis é de 4 a 12 dias (LEBEDA e COHEN, 2011).

Esses sintomas podem variar dependendo da espécie do hospedeiro. No pepino e no melão que são as culturas com os sintomas mais marcantes da doença, é inicialmente observado na parte superior da folha as manchas cloróticas e angulares que se espalham por todo limbo da folha principalmente ao longo das nervuras e na parte inferior são observados os esporângios e esporangióforos. Na melancia podemos observar que as lesões são irregulares, mas os sinais do patógeno são semelhantes aos descritos para pepino e melão. Por outro lado, na abóbora as lesões são menores e circulares com centro esbranquiçado (SAVORY *et al.*, 2011; PAVAN *et al.*, 2016).

2.4.3 Manejo da doença e Controle

Algumas medidas são recomendadas para controle ou prevenção do míldio das cucurbitáceas, como: evitar plantios em locais sujeitos a alta umidade; usar variedades e/ou híbridos resistentes; pulverizar com fungicidas protetores ou com sistêmicos registrados para a cultura. Essas medidas podem ser realizadas em conjunto com algumas práticas culturais como: evitar irrigação por aspersão, utilizar quebra-ventos, evitar plantios próximos de lavouras velhas, adubação equilibrada evitando excesso de adubação nitrogenada e evitar área mal drenada (PAVAN *et al.*, 2016).

Porém, por se tratar de um patógeno que ainda não foi totalmente compreendido e que vem causando frequentes surtos, essas medidas nem sempre são eficazes, é o caso de alguns fungicidas que já não controlam mais a doença de forma satisfatória, *P. cubensis* foi o primeiro oomiceto a desenvolver resistência ao

metalaxil e sensibilidade reduzida ao mancozebe (LEBEDA e COHEN, 2012). Quando ocorreu o surto de míldio no pepino em 2004 nos Estados Unidos os produtores recorreram ao uso de fungicidas à base de mefenoxam e estrobilurina, mas estes foram ineficazes no controle da doença (HOLMES *et al.*, 2015).

Entre a década de 1960 e 2004 o míldio foi controlado no pepino através de cultivares resistentes, graças ao gene *dm*. Após a quebra de resistência do hospedeiro por *P. cubensis* os surtos de míldio causaram grandes perdas econômicas e gastos com fungicidas, pois sem a presença de resistência efetiva do hospedeiro, os produtores passaram a realizar aplicações de fungicidas a cada 5 a 7 dias, dependendo da presença da doença (GRANKE *et al.*, 2014; HOLMES *et al.*, 2015; OJIAMBO *et al.*, 2015). Desde então estudos para tentar compreender a diversidade genética de hospedeiros como a melancia, o melão e o pepino em busca de conseguir desenvolver cultivares resistentes foram realizados (OJIAMBO *et al.*, 2015).

Para tentar diminuir o uso de fungicidas, pesquisas mostram resultados promissores de controle biológico combinado com uso de fungicidas ou sozinho em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). *Trichoderma* que já é bastante usado no controle de outras doenças, se mostrou um antagonista do míldio com resultados satisfatórios para uso no controle da doença em pepino, (EL-KHALILI *et al.*, 2021; ORTEGA *et al.*, 2020).

Alinhadas a pesquisas para desenvolver plantas resistentes ou substituição de fungicidas por controle biológico, a compreensão sobre a diversidade genética dentro e entre as populações assim como conhecer as forças evolutivas responsáveis por mudanças espaço-temporais na patogenicidade de *P. cubensis* pode ser de grande ajuda para desenvolver estratégias de manejo eficientes ao míldio das cucurbitáceas (LEBEDA e CHEN, 2011; LEBEDA *et al.*, 2012).

2.4.4 Patogenicidade e surgimento de espécies crípticas de *Pseudoperonospora*

Nas últimas décadas estudos investigaram a patogenicidade de *P. cubensis* e verificaram a existência de diferentes raças e patótipos desse patógeno que diferem em virulência e capacidade de infecção em diferentes hospedeiros (PALTÍ e COHEN, 1980; THOMAS *et al.*, 1987; SHETTY *et al.*, 2002; LEBEDA e URBAN, 2004). Por esses estudos serem baseados na virulência em hospedeiros diferenciais e pela inviabilidade em se conseguir cultivar *in vitro* *P. cubensis*, são necessários estudos

genéticos para um melhor entendimento dos fatores ligados à sua evolução e especificidade (WALLACE *et al.*, 2020).

Com o aumento da incidência da doença nos Estados Unidos em 2004 foram levantadas hipóteses de novas raças ou patótipos mais virulentos (HOLMES *et al.*, 2006) ou até mesmo de uma nova espécie críptica de *Pseudoperonospora* (RUNGE *et al.*, 2011). Por causa das lacunas existentes sobre o conhecimento da filogenia do gênero e as epidemias de míldio em cucurbitáceas, diversas pesquisas foram publicadas entre os anos de 2004 e 2022, acerca das relações filogenéticas existentes dentro do gênero *Pseudoperonospora* e sobre sua patogenicidade (Lebeda e Urban, 2007; RUNGE *et al.*, 2011; RSALIYEV *et al.*, 2018; WALLACE *et al.*, 2020; TOPOREK *et al.*, 2021).

Para a obtenção de informações sobre os processos evolutivos em espécies de míldios intimamente relacionadas como as pertencentes ao gênero *Pseudoperonospora* as filogenias precisam ser baseadas em análises multilocus, com a utilização de marcadores moleculares de alta resolução filogenética (VOGLMAYR, 2008), como podemos observar comparando os estudos de Choi *et al.* (2005) e Runge *et al.* (2011).

Choi *et al.* (2005) utilizaram apenas a região nrITS para a resolução da filogenia de *P. cubensis* e *P. humuli* e seus resultados apontaram que essas duas espécies deveriam ser consideradas sinônimos. Já em Runge *et al.* (2011), que utilizaram três regiões gênicas, nrITS, a região mitocondrial *cox2* e o gene da proteína relacionada com Ras altamente variável (*ypt1*). As análises filogenéticas confirmaram que são duas espécies distintas, confirmando assim a importância na utilização das análises multilocus.

As análises realizadas por Runge *et al.* (2011) indicaram que as novas epidemias de míldios na América do Norte estariam sendo causadas por uma nova linhagem filogenética com alto grau de adaptabilidade e plasticidade de virulência e que poderia ser uma nova subespécie ou até mesmo uma nova espécie de *Pseudoperonospora*. Entretanto, os autores optaram por não descrever um novo táxon, pois seria necessário estudos com mais isolados e mais locais para verificar se essa linhagem filogenética deveria ser considerada uma nova espécie distinta de *P. cubensis* ou uma subespécie.

Estudos posteriores relataram a co-ocorrência de dois clados filogenéticos na República Tcheca e recentemente um estudo filogenético realizado na Coreia relatou

dois clados filogenéticos de *P. cubensis*, e mais uma vez foi enfatizada a suspeita que o míldio das cucurbitáceas pode ser causado por duas espécies distintas (LEE *et al.*, 2021; KITNER *et al.*, 2015). Em seu estudo realizado na Carolina do Norte, Wallace *et al.* (2020) também traz dois clados distintos de isolados de *P. cubensis*.

Onde independente da localização ou tempo de amostragem foi evidenciado que os clados se distinguiram pela preferência ao hospedeiro infectado, os isolados do clado 1 infectam preferencialmente *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Citrullus lanatus* e os hospedeiros selvagens *Momordica charantia* e *Momordica balsamina* enquanto os isolados do clado 2 infectam preferencialmente *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, e o hospedeiro selvagem *Lagenaria siceraria* (WALLACE *et al.*, 2020).

Thomas *et al.* (2017) realizaram uma análise genômica com isolados dos Estados Unidos e além de descreverem a presença de duas linhagens evolutivas, I e II, relataram que a linhagem I estava associada ao o tipo de acasalamento A2 e a linhagem II com o tipo A1. Essas duas linhagens foram consideradas pelos autores congruentes com os clados relatados em Runge *et al.* (2011). Além disso, assim como Wallace *et al.* (2020) as linhagens foram associadas a diferentes tipos de hospedeiros, a linhagem I aos isolados infectando abóbora e melancia e a linhagem II aos isolados infectando *Cucumis* spp.

Esses estudos apontam que as epidemias de 2004 nos EUA, e as epidemias em outras partes do mundo como Israel e parte da Europa, podem estar relacionadas ao surgimento desse novo clado de *P. cubensis*. O conhecimento sobre essa nova possível espécie e o seu tipo de acasalamento são o ponto de partida para a criação de cucurbitáceas resistentes e o manejo da doença (TOPOREK *et al.*, 2021).

2.4.5 Panorama do míldio das cucurbitáceas no Brasil

As principais cucurbitáceas cultivadas no Brasil são abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga e pepino, com maior ocorrência do míldio no melão, na melancia, na abóbora e no pepino (SANTOS *et al.*, 2013; PAVAN *et al.*, 2016). Essa doença está presente em todas as regiões do Brasil, porém tem destaque na região Sul e Sudeste onde as condições ambientais são mais favoráveis para a sua ocorrência (KUROZAWA e PAVAN, 1997; REIS, 2007). No estado do Amazonas,

por exemplo, é encontrada no pepino, porém não é considerada uma doença relevante devido às altas temperaturas da região (CARDOSO *et al.*, 2001a).

Na região Nordeste o míldio é relatado como uma das principais doenças que afetam o meloeiro, chegando a reduzir a produção de frutos em até 60%. Um dos fatores importantes para sua ocorrência pode ser a irrigação de outras culturas situadas próximas ao seu cultivo, que podem transportar o inóculo primário (VIANA *et al.*, 2001). Outro fator a ser considerado como influência para o aumento da ocorrência do míldio no Nordeste do Brasil é o cultivo intensivo e contínuo do melão (CARDOSO *et al.*, 2001b).

O controle do míldio no Brasil tem sido realizado por meio do uso de fungicidas, como Metalaxyl, Fosetil-Al e Cimoxanil, uma vez que não existem variedades de melão resistentes disponíveis no país (ALBUQUERQUE, 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2017). Em busca de reverter essa situação e diminuir o uso de agroquímicos, a maioria dos estudos no Brasil são voltados à resistência do hospedeiro ao míldio (SANTOS *et al.*, 2004, ALBUQUERQUE, 2015), mas não existe nenhum dado publicado sobre a diversidade genética ou filogenia da população desse patógeno. Essas informações seriam essenciais para entender sobre a interação patógeno-hospedeiro e assim auxiliar no manejo da doença e criação de plantas resistentes (TOPOREK *et al.*, 2021).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE COLETA

Foram realizadas coletas em 21 áreas de produção de Cucurbitáceas nos estados de Pernambuco, Minas Gerais, Ceará, Goiás e no Distrito Federal. As áreas amostradas foram selecionadas no período das coletas de acordo com a disponibilidade. Em cada área foram coletadas até três amostras (três plantas diferentes) das espécies de Cucurbitaceae disponíveis em campo, com sintomas de míldio, em seguida essas amostras foram imediatamente herborizadas em prensa botânica para preservar as estruturas e levadas para o laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA, PCR E FILOGENIA

Em laboratório, as amostras herborizadas foram analisadas em microscópio estereoscópio para visualização das estruturas do oomiceto (esporângios e esporangióforos), posteriormente foi realizada a coleta dessas estruturas para extração de DNA com o auxílio de uma agulha estéril transferindo-as para tubos de 1,5 mL contendo 30 microlitros de água ultrapura (livre de DNAses e RNAses). As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido e o auxílio de um pistilo para tubos de 1,5 mL. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit) seguindo o protocolo do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas utilizando primers DC-6 (COOKE *et al.*, 2000) e LR-0 (reverse para LR-0R, MONCALVO *et al.* 1995), Cox2-F (HUDSPETH *et al.*, 2000) Cox2-RC4 (CHOI *et al.*, 2015), Ypt1F (CHEN e ROXBY, 1996) e Ypt4R (MOORMAN *et al.* 2002), para amplificação da região espaçador transcrito interno (ITS), da região mitocondrial citocromo c oxidase subunidade II (cox2) e proteína relacionada a Ras (Ypt1), respectivamente. Para todas as regiões as reações de PCR foram realizadas em um volume total de 12,5 µL contendo 6,25 µL da Taq polimerase (Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), 0,5 µL de cada primer (reverse e forward) a 10 µmol, 4,25 µL de água livre de nuclease (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) e 1 µL de DNA genômico.

As amostras foram levadas para termociclador (Bio-Rad, T100) para a região ITS foram utilizadas as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 42 segundos, 52 °C por 42 s, 72 °C por 1 minuto e 42 segundos, sucedido por uma etapa de alongamento final de 4 minutos e 20 segundos a 72 °C. Para a região *cox2* foi uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos; 36 ciclos de 95°C por 40 segundos, 48°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. Para *Ypt1* foi utilizada uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; 43 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto (foi testada também a 58°C, 60°C e 62°C), 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos, para *cox2* e ITS o resultado da reação apresentou banda única visualizado gel de agarose, porém *Ypt1* apresentou bandas inespecíficas e, portanto, não foram utilizadas.

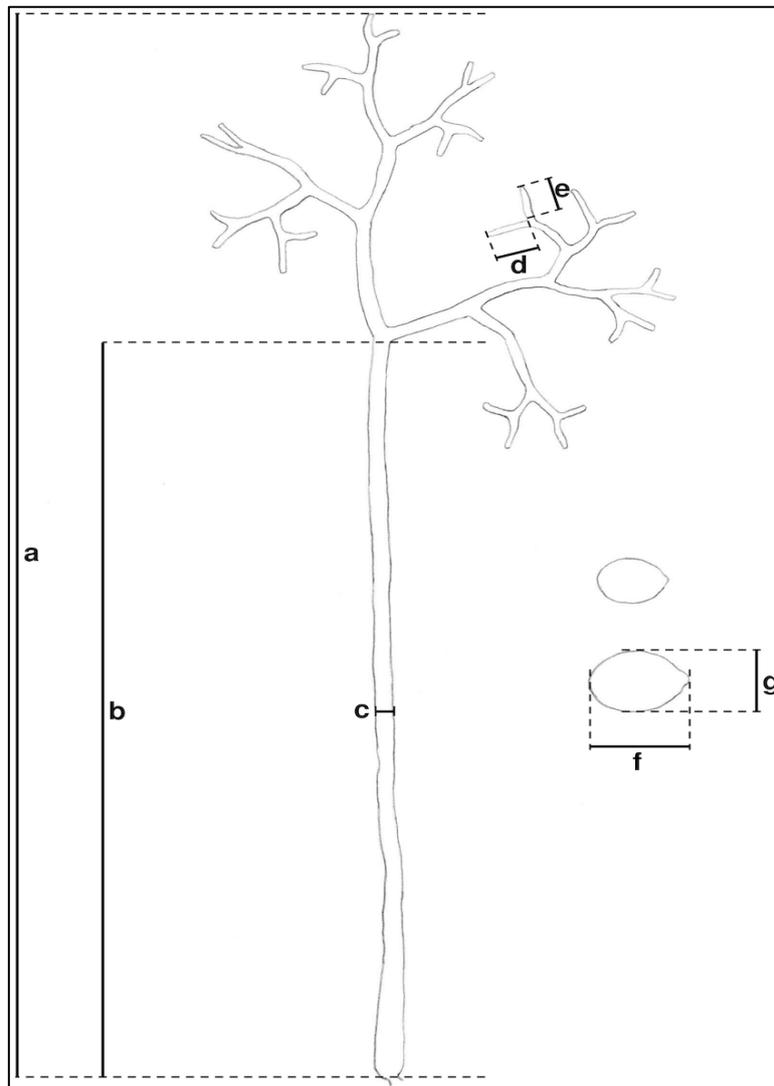
Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima Exo + SAP (Cellco Biotec) e sequenciados na plataforma de sequenciamento do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). As sequências de nucleotídeos foram analisadas e editadas com o software MEGA v. 7 (KUMAR *et al.*, 2015). As novas sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a análise filogenética, regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (EDGAR, 2004) existente no software MEGA v. 7 (KUMAR *et al.*, 2015).

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi efetuada aplicando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Os modelos de substituição de nucleotídeos foram selecionados através do Mr. MODELTEST 2.3 (POSADA e BUCKLEY, 2004), sendo estimados separadamente para cada região gênica de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). A análise de BI foi concluída com Mr. Bayes v.3.1.1 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003) a 50 000 000 de gerações com uma árvore amostrada a cada 1 000 gerações, resultando em 50 000 árvores. As primeiras 12500 árvores com menores valores de probabilidade serão descartadas da análise e os valores de probabilidade posterior (RANNALA e YANG, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 37 500 árvores remanescentes. A árvore filogenética resultante foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2009).

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As estruturas do patógeno foram montados em lactoglicerol para visualização em microscópio de luz, posteriormente foram realizadas 30 medições de todos os caracteres morfológicos relevantes (esporângios e esporangióforos – Fig.1).

Figura 1 - Ilustração de um esporangióforo e esporângios de *Pseudoperonospora cubensis* coletados de *Cucumis sativus*. Foram medidas o comprimento do esporangióforo (a), altura da primeira ramificação (b), largura do tronco (c), comprimento dos ramos finais mais longos (d) e mais curtos (e), bem como o comprimento (f) e a largura (g) dos esporângios.



Fonte: Runge e Thines, (2012)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Foram coletadas folhas de pepino, melão, maxixe, bucha, abóbora e abobrinha, infectadas com *Pseudoperonospora*, em 21 áreas distribuídas em quatro estados (Pernambuco, Ceará, Distrito Federal e Minas Gerais) entre os anos de 2017 e 2020. Foram obtidas 36 amostras de DNA de *Pseudoperonospora*, essas amostras de DNA foram quantificadas e verificou-se que a quantidade variava de 4 ng/ul a 205 ng/ul de DNA, devido a pequena quantidade de DNA na maioria das amostras, foi essencial a utilização de uma Taq polimerase de alta precisão para se obter sucesso nas reações de PCR.

O sequenciamento resultou em 26 sequencias da região Cox2 com aproximadamente 500 pb e 25 sequencias de ITS com aproximadamente 1000 pb (totalizando 51 sequencias), todas as sequencias foram depositadas no *GenBank* (Tabela 1). As amostras amplificadas com o gene Ypt1 apresentaram bandas inespecíficas (múltiplas bandas) e não foi obtido sucesso nas tentativas de ajuste do protocolo para resolver o problema, portanto essa região não foi utilizada para análise filogenética.

Tabela 1 - Amostras de *Pseudoperonospora* utilizadas nas análises filogenéticas.

| Código DNA | Gênero/Espécie | Hospedeiro | Local de coleta | Área | GenBank Cox2 | Genbank nrITS |
|-------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|-------------|---------------------|----------------------|
| G01 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | I | OP244675 | OP142403 |
| G03 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Chã Grande - PE | II | _ | OP142404 |
| G04 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Chã Grande - PE | II | OP244676 | _ |
| G07 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | IV | _ | OP142405 |
| G09 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | V | OP244677 | _ |
| G10 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | V | OP244678 | OP142406 |
| G11 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Camocim de São Félix - PE | VI | OP244679 | OP142407 |
| G12 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Camocim de São Félix - PE | VI | OP244680 | OP142398 |
| G13 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Chã Grande - PE | VII | OP244681 | OP142399 |
| G14 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Chã Grande - PE | VII | OP244682 | OP142408 |
| G15 | <i>Pseudoperonospora</i> | Maxixe | Chã Grande - PE | VIII | OP244683 | OP142400 |
| G16 | <i>Pseudoperonospora</i> | Maxixe | Chã Grande - PE | VIII | OP244684 | OP142401 |

| | | | | | | |
|--------|--------------------------|-----------|---------------------------|-------|----------|----------|
| G18 | <i>Pseudoperonospora</i> | Maxixe | Minas Gerais | IX | OP244685 | OP142409 |
| ARM283 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Brasília-DF | XI | OP244661 | – |
| ARM289 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abobrinha | Brasília-DF | XII | OP244662 | – |
| ARM306 | <i>Pseudoperonospora</i> | Maxixe | Chã Grande - PE | XIII | OP121124 | OP114924 |
| ARM307 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Chã Grande - PE | XIV | OP244663 | OP142386 |
| ARM445 | <i>Pseudoperonospora</i> | Melão | Brasília-DF | XV | OP244664 | OP142387 |
| ARM446 | <i>Pseudoperonospora</i> | Melão | Brasília-DF | XV | OP244665 | OP142388 |
| ARM447 | <i>Pseudoperonospora</i> | Melão | Brasília-DF | XV | OP244666 | OP142389 |
| ARM448 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Chã Grande - PE | XVI | OP244667 | OP142390 |
| ARM449 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Chã Grande - PE | XVI | OP244668 | OP142391 |
| ARM450 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Chã Grande - PE | XVI | OP244669 | OP142392 |
| ARM487 | <i>Pseudoperonospora</i> | Melão | Crato-Ce | XVII | OP244670 | OP142393 |
| ARM488 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | São Joaquim do Monte- Pe | XVIII | OP244671 | OP142402 |
| ARM489 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | XIX | – | OP142394 |
| ARM490 | <i>Pseudoperonospora</i> | Pepino | Camocim de São Félix - PE | XIX | OP244672 | OP142395 |
| ARM491 | <i>Pseudoperonospora</i> | Abóbora | Camocim de São Félix - PE | XX | OP244673 | OP142396 |
| ARM519 | <i>Pseudoperonospora</i> | Maxixe | Chã Grande - PE | XXI | OP244674 | OP142397 |

Fonte: Moraes, (2022)

Realizou-se análises filogenéticas das regiões genicas Cox2 e ITS separadamente gerando uma árvore filogenética de ITS (Fig. 2) e uma de Cox2 (Fig. 3), também foi realizada análise filogenética utilizando as duas regiões gerando a árvore concatenada (Fig. 4), esta última com 22 isolados dos quais foi possível obter sequencias tanto de Cox2 quanto de ITS (G01, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G18 ARM306, ARM307, ARM445, ARM446, ARM447, ARM448, ARM449, ARM450, ARM487, ARM488, ARM490, ARM491 e ARM519). As árvores foram enraizadas com a espécie *Phytophthora botryosa*, pertencente a um gênero basal a *Pseudoperonospora* (BEAKES *et al.*, 2014) e as demais sequencias foram obtidas no bando de dados do *Genbank*, depositadas por Runge *et al.* (2011).

A árvore filogenética gerada da análise Bayesiana de ITS (Fig. 2) apresentou um grande grupo monofilético com todos os isolados do presente estudo e do banco de dados, incluindo a espécie *P. humuli*, isso se deve ao fato da baixa resolução da região ITS para conseguir diferenciar grupos intimamente relacionados, o que requer a inclusão de regiões genicas com maior resolução (VOGLMAYR, 2008; RUNGE *et al.*, 2011). Uma região gênica que vem demonstrando alto potencial para uso em análises filogenéticas de grupos de Oomicetos é a região mitocondrial citocromo c

oxidase subunidade II (Cox2), por oferecer alta resolução ao nível de espécie (VOGLMAYR, 2008; CHOI *et al.*, 2015).

Diferente da árvore de ITS, na árvore gerada somente com sequências de Cox2 e na árvore concatenada (Cox2/ITS), os isolados do presente estudo são separados em dois grupos, onde o pepino é o hospedeiro de todos que se agrupam com a linhagem críptica de *Pseudoperonospora* relatada por Runge *et al.* (2011), e os demais isolados que foram coletados de outros hospedeiros, agrupam-se com as linhagens de *Pseudoperonospora cubensis* do Clado I de Runge *et al.* (2011).

Quando executada a análise filogenética apenas com Cox2, a árvore possui baixo valor de suporte <95%, para o clado monofilético de *P. cubensis* e *P. humuli*, que aumentou na árvore concatenada de Cox2-ITS, e para os dois agrupamentos das linhagens de *P. cubensis* ambas apresentam valores de probabilidades posteriores >95%, porém a relação filogenética entre os isolados não foi completamente resolvida, não sendo possível a visualização de clados bem definidos.

Provavelmente essa politomia seria resolvida com a adição da região Ypt1 nas análises, uma vez que grupos de mírdios necessitam de uma abordagem multigênica para melhor entendimento das suas relações filogenéticas (GÖKER *et al.* 2007; RUNGE e THINES, 2011). Devido à dificuldade em amplificar a região Ypt1 torna-se necessário que outras regiões genicas informativas, de fácil amplificação e adequadas para filogenia de *Pseudoperonospora* sejam testadas. Assim será possível confirmar a monofilia da nova linhagem e a proposição de uma nova espécie filogenética.

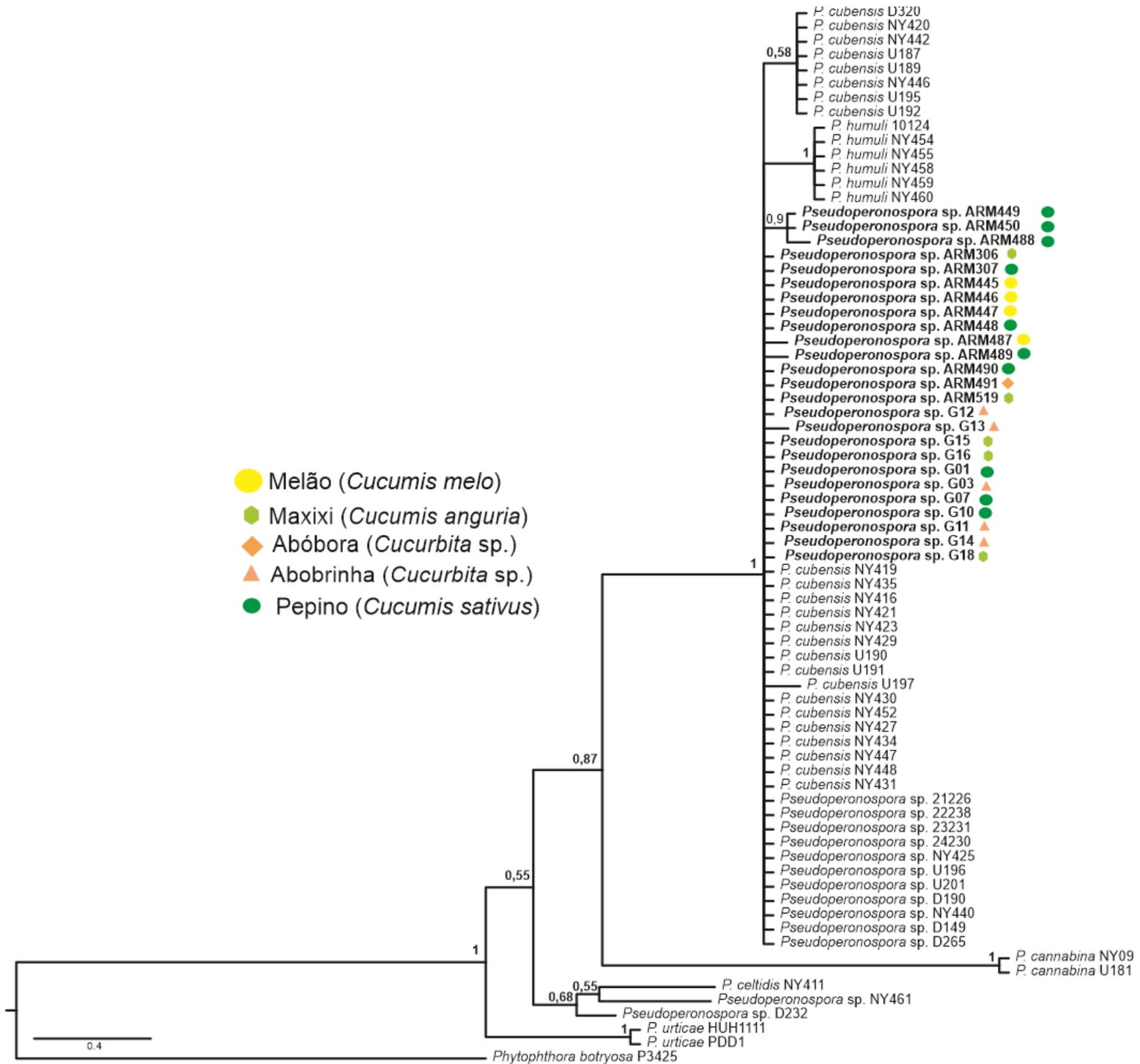
Embora somente os isolados de *P. cubensis* coletados das folhas de pepino tenham se agrupado com a possível linhagem críptica, não é possível relacionar os dois grupos ao tipo de hospedeiro, pois seria preciso fazer uma amostragem maior para ter certeza que no Brasil a linhagem críptica de *P. cubensis* está relacionada com o hospedeiro pepino. Outro fator importante para ser observado é que apesar das coletas terem sido realizadas em cinco estados brasileiros, todas as amostras de DNA de *P. cubensis* coletado parasitando o pepino, que foram utilizadas nas análises filogenéticas, são provenientes do estado de Pernambuco.

A abobrinha, o maxixe e a abóbora também tiveram amostras coletadas em Pernambuco e agruparam-se separadamente dos isolados coletados de folhas de pepino, ou seja, para o estado de Pernambuco foi possível observar a existência de diversidade dentro de *P. cubensis*. Em seu estudo Lee *et al.* (2021) conseguiram detectar, através da filogenia, a presença de dois clados de *P. cubensis* coexistindo

em uma pequena parcela de cultivo infectando melão (*C. melo* var. *conomon*) na Coreia do Sul. Demonstrando assim que além de existirem clados de *P.cubensis* que coexistem em um mesmo país, essa coexistência pode estar ocorrendo em conjunto em um mesmo cultivo.

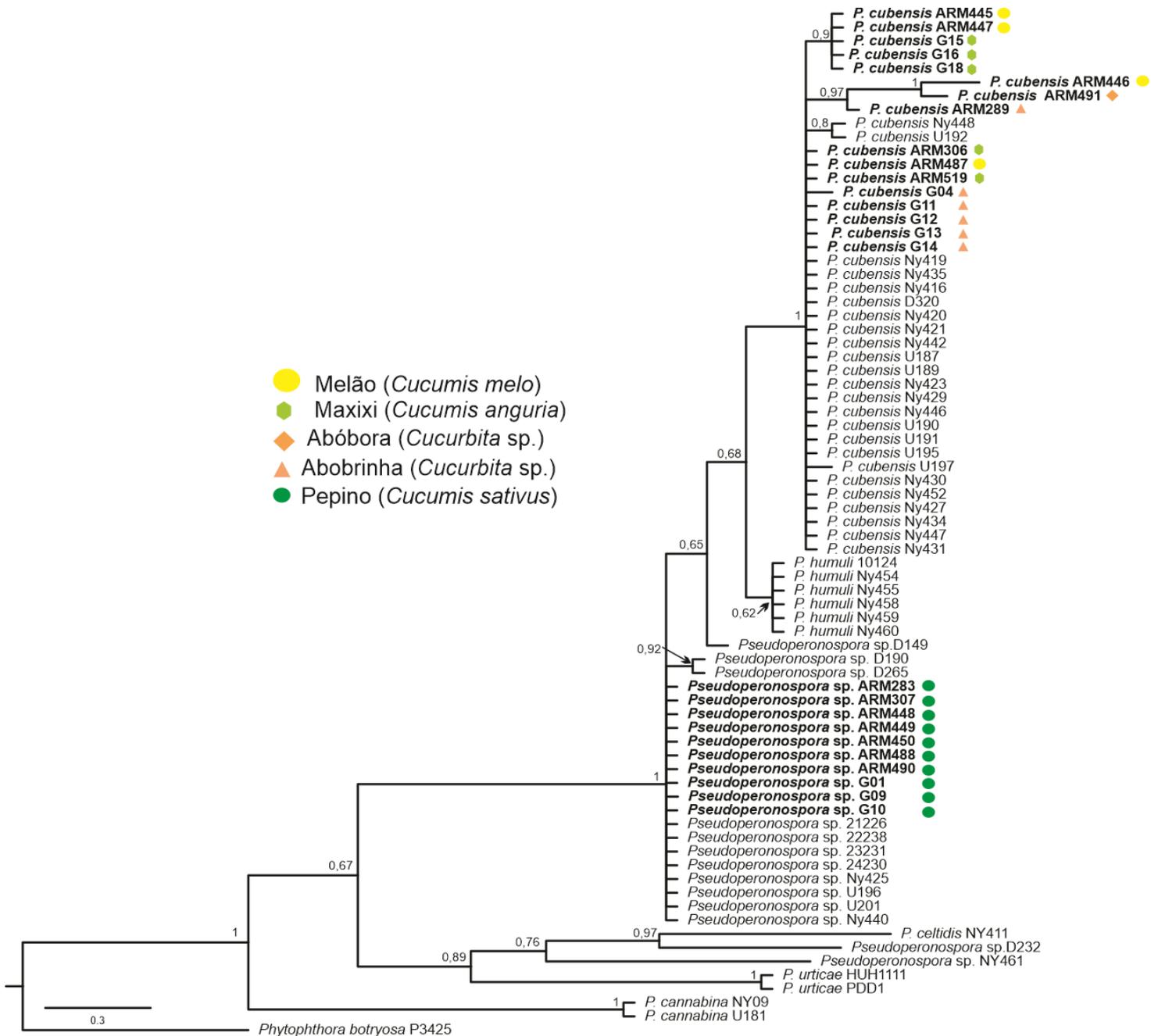
A existência desses dois agrupamentos aponta que no Brasil ocorre diversidade filogenética entre as linhagens de *P. cubensis*, reforçando a possibilidade de existirem espécies crípticas causadoras do míldio das Cucurbitáceas, como relatado em trabalhos anteriores que foram realizados com amostras dos Estados Unidos, República Tcheca, Alemanha, Filipinas, Japão e Coréia do Sul (LEE *et al.*, 2021; KITNER *et al.*, 2015; RUNGE *et al.*, 2011).

Figura 2 - Árvore filogenética de *Pseudoperonospora*, obtida por interferência bayesiana da região ITS. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425.



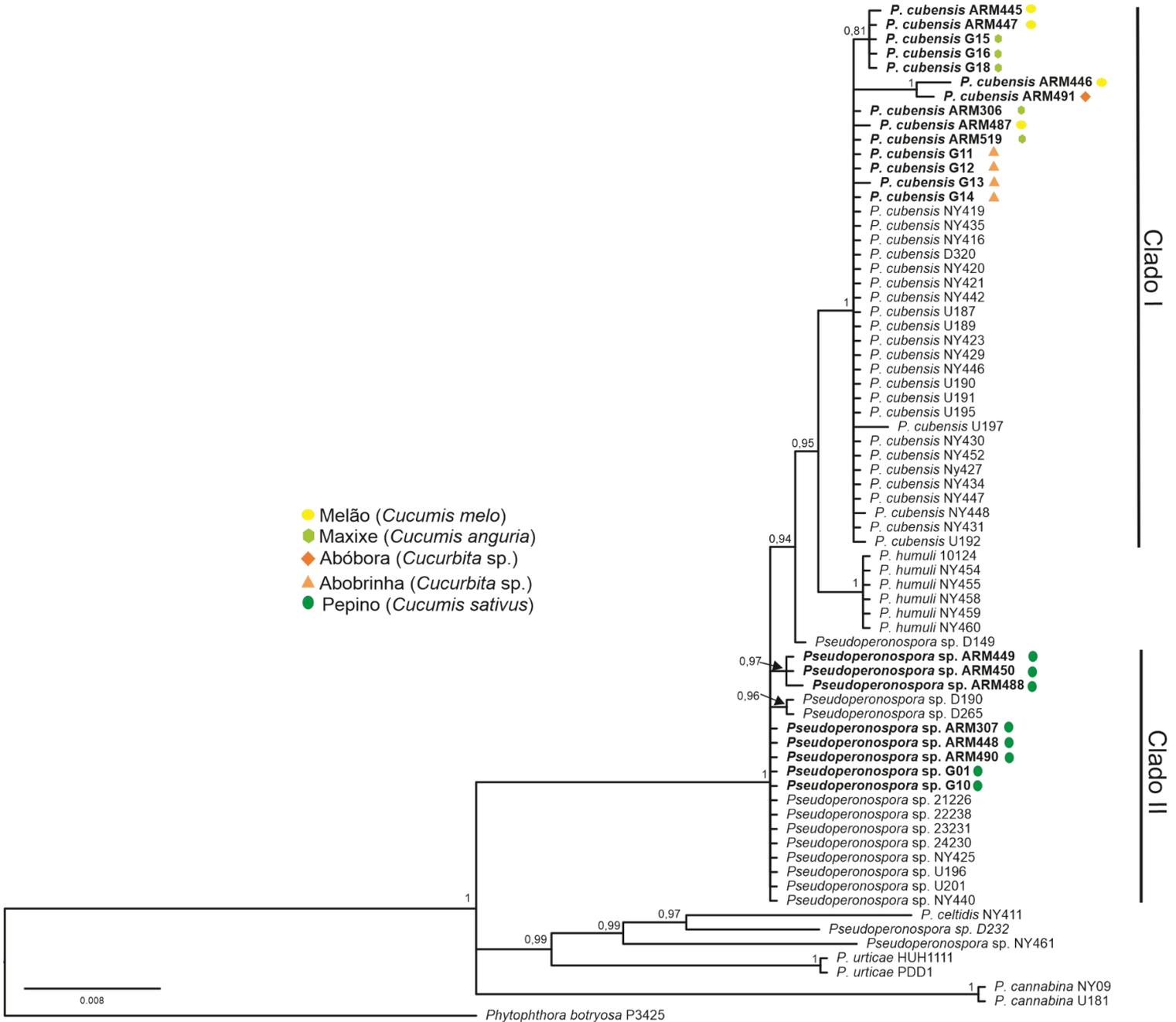
Fonte: Moraes, (2022)

Figura 3 - Árvore filogenética de *Pseudoperonospora* obtida por interferência bayesiana da região Cox2. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425 (GenBank: JN618604.1).



Fonte: Moraes, (2022)

Figura 4 - Árvore filogenética obtida por interferência bayesiana das regiões Cox2 e ITS concatenadas. As probabilidades posteriores são indicadas acima dos nós e os símbolos a frente dos isolados indicam quais os respectivos hospedeiros. A árvore foi enraizada com a espécie *Phytophthora botryosa* P3425.



Fonte: Moraes, (2022)

4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para as análises morfológicas foram utilizadas lâminas das estruturas dos isolados G13 (Clado I) e G10 (Clado II) os caracteres mensurados foram comprimento do esporangióforo inteiro e a altura do esporangióforo até o início da primeira ramificação (n=30), a largura do tronco do esporangióforo (n=30), comprimento das ramificações terminais, mais longa (n=30) e mais curta (n=30) e comprimento e largura do esporângio (n=30), como mostra a (Fig. 1).

Na Tabela 2, podem ser observados os valores absolutos mensurados das estruturas tanto de G10 quanto de G13 que apresentam apenas pequenas variações de tamanho, todas as estruturas permanecem dentro dos valores apresentados em outros estudos sobre a morfologia de *P. cubensis* como Choi et al., (2005), Runge e Thines (2012a) e Runge e Thines (2012b).

Essas pequenas diferenças de tamanho podem ser devidas a temperatura, ou de outras condições ambientais, especialmente em espécimes que foram coletados na natureza. Outro fator importante que pode influenciar é a matriz do hospedeiro, as dimensões dos esporângios e o número de ramificação são caracteres altamente dependentes da matriz hospedeira. (RUNGE e THINES, 2012; RUNGE e THINES, 2011).

Tabela 2 - Comparação das Características morfológicas de *Pseudoperonospora*.

| Caractere | <i>P. cubensis</i> (G10) | <i>P. cubensis</i> (G13) | <i>P. cubensis</i> ^a | <i>P. cubensis</i> ^b | <i>P. cubensis</i> ^c |
|---|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Hospedeiro | <i>Cucumis sativus</i> | <i>Cucurbita</i> sp | <i>Cucurbita moschata</i> | <i>Cucumis sativus</i> | <i>Cucumis sativus</i> |
| Comprimento do esporangióforo | 226,55 -- 443,25 µm | 197 – 443,25 µm | 120 – 480 µm | 173 – 518 µm | 173 – 606 µm |
| Altura da primeira ramificação | 157,6 – 315,2 µm | 128,05 – 334,9 µm | -- | 101 – 387 µm | 101 – 434 µm |
| Largura do tronco | 5 – 10 µm | 5 – 10 µm | 5 – 10 µm | 3,07 – 7,15 µm | 3,1 – 7,2 |
| Comprimento Ramificação terminal mais longa | 7,5 – 15 µm | 7,5 – 15 µm | -- | 3,99 – 15,2 µm | 4 – 15,2 µm |

| | | | | | |
|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| Comprimento | 5 – 12,5 μm | 5 – 12,5 μm | -- | 2,93 – 13,7 μm | 2 – 13,7 μm |
| Ramificação terminal mais curta | | | | | |
| Comprimento do esporângio | 25 – 32,5 μm | 17,5 – 37,5 μm | 22 – 38 μm | 17 – 36,9 μm | 14,2 – 36,9 μm |
| Largura do esporângio | 15 – 25 μm | 12,5 – 25 μm | 15 – 22 μm | 12,5 – 25,1 μm | 10,3 – 25,10 μm |
| Número de ramificações | 3 – 6 | 2 – 6 | 3 – 5 | 3 – 6 | 4 -- 7 |

^a Choi et al., (2005);

^b Runge e Thines (2012a);

^c Runge e Thines (2012b)

5 CONCLUSÕES

- Os resultados das análises filogenéticas apresentados na árvore concatenada de Cox2-ITS, indicam que no Brasil o míldio das cucurbitáceas é causado por linhagens filogenéticas distintas de *P. cubensis*;

- A morfologia não permitiu a separação das linhagens, possivelmente por se tratar de uma espécie críptica;

- As análises não apresentam dados robustos o suficiente para a proposição de uma espécie críptica de *P. cubensis*;

REFERENCIAS

- AGRIOS, G. N., **Plant pathology**. Elsevier Academic Press, 2005.
- ALBUQUERQUE, L. B., ANTONIO, R. P., NUNES, G.H.S., MEDEIROS, R.V., DA SILVA-FILHO, A. J.R., Caracterização morfológica de fontes de resistência de meloeiro a *Pseudoperonospora cubensis*. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 100-107, 2015.
- ARAFA, R. A., SHIRASAWA, K. Technical review of molecular markers and next-generation sequencing technology to manage plant pathogenic oomycetes. **African Journal of Biotechnology**, 17-12: 369-79, 2018.
- BEAKES G.W., HONDA D., THINES M. 3 Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota. In: McLaughlin D., Spatafora J. (eds) **Systematics and Evolution**. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), vol 7A. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.
- BERKELEY, M.S. AND CURTIS, A. *Peronospora cubensis*. J. Linn. Soc. Bot. 10: 363,1868.
- CARDOSO, J. E., SANTOS, A. A., VIDAL, J.C., BADU, F. O., VIANA, F. M. P., FREIRE, F. C. O., Eficiência de Tiofanato Metílico e Clorotalonil no controle do míldio do meloeiro. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2001b.
- CARDOSO, M. O., BOHER, B. ÁVILA, A. C., ASSIS, L. A. G., Doenças das cucurbitáceas no Estado do Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001a.
- CHASE, M. W., CHRISTENHUSZ, M. J. M., FAY, M. F., BYNG, J. W., JUDD, W. S. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- CHEN, Y., ROXBY, R. Characterization of *Phytophthora infestans* gene involved in the vesicle transport. **Gene**, 181: 89–94,1996.
- CHOI, Y. J., HONG, S. B., SHIN, H. D. A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data. **Mycological Research**, v. 109, n. 7, p. 841-848, 2005.
- CHOI, Young-Joon et al. Towards a universal barcode of oomycetes—a comparison of the cox1 and cox2 loci. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 6, p. 1275-1288, 2015.
- COELHO, P. A importância da doença do míldio na cultura das brássicas. In book: **Agrorrrural: Contributos científicos** (pp.123-134), 2011.
- COHEN, Y., LANGENBERG K. M. V., WEHNER, T. C., OJIAMBO, P. S., HAUSBECK, M., QUESADA-OCAMPO, L. M., LEBEDA, A., SIEROTZKI, H., GISI, U. Resurgence of *Pseudoperonospora cubensis*: the causal agent of cucurbit downy mildew. **Phytopathology**. 105-7: 998-1012, 2015.
- COHEN, Y., RUBIN, A. E. Mating type and sexual reproduction of *Pseudoperonospora cubensis*, the downy mildew agent of cucurbits. **Eur J Plant Pathol** 132, 577–592, 2012.

COLUCCI, S. J. 2008. **Host range, fungicide resistance and management of *Pseudoperonospora cubensis*, causal agent of cucurbit downy mildew.** A thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University In partial fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science.

COLUCCI, S. J., WEHNER, T. C., HOLMES, G. J. The downy mildew epidemic of 2004 and 2005 in the eastern United States. **Cucurbitaceae**, Asheville, North Carolina, USA, 17-21: 403-411, 2006.

Cucurbitaceae in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17036>>. Acesso em: 23 out. 2021.

DIAS, R.C., REZENDE, G. M. Embrapa Semiárido. Sistema de produção de Melancia. 2010. Disponível em <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>> Acesso em 24 de outubro de 2021.

DONG JAE LEE, D. J., LEE, J. S., CHOI, Y. J. Co-Occurrence of Two Phylogenetic Clades of *Pseudoperonospora cubensis*, the Causal Agent of Downy Mildew Disease, on Oriental Pickling Melon, **Mycobiology**, 49: 2, 188-195, 2021.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** 32(5):1792-1797, 2004.

EXCOFFIER L., SMOUSE, P. E., QUATTRO, J. M. Analyses of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics.** 131:479–491, 1992.

FIGUEIREDO, M. C. B.; GONDIM, R. S.; DE ARAGAO, F. A. S. Produção de melão e mudanças climáticas: sistemas conservacionistas de cultivo para redução das pegadas de carbono e hídrica. **Embrapa Agroindústria Tropical-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2017.

GÖKER, M., VOGLMAYR, H., RIETHMÜLLER, A., OBERWINKLER, F. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 105-122, 2007.

GOMES-COSTA, G. A., ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Cucurbitaceae. **Rodriguésia**, v. 63, p. 817-829, 2012.

GOMES-KLEIN, V.L.; LIMA, L.F.P.; GOMES-COSTA, G. A.; MEDEIROS, E.S. *Cucurbitaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17036>>.

GRANKE, L. L.; MORRICE, J. J.; HAUSBECK, M. K. Relationships between airborne *Pseudoperonospora cubensis* sporangia, environmental conditions, and cucumber downy mildew severity. **Plant disease**, v. 98, n. 5, p. 674-681, 2014.

HOLMES, G. J. et al. Resurgence of cucurbit downy mildew in the United States: A watershed event for research and extension. **Plant Disease**, v. 99, n. 4, p. 428-441, 2015.

HUDSPETH, D. S. S., NADLER, S. A., HUDSPETH, M. E. S. A COX2 molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. **Mycologia**, 92: 674–684, 2000.

- IBGE. Sistema de Recuperação Automática - SIDRA. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017#extracao-vegetal>> Acesso em 24 de outubro de 2021.
- KITNER, M., LEBEDA, A., SHARMA, R., RUNGE, F., DVOŘÁK, P., TAHIR, A., CHOI, Y. J., SEDLÁKOVÁ, B., THINES, M. Coincidence of virulence shifts and population genetic changes of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic. **Plant Pathology**. Dec;64(6):1461-70, 2015.
- KRANZ, J. Comparative epidemiology of plant diseases. Berlin: Springer, 2003.
- KUMAR, S., STECHER, G. TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33: 1870-1874, 2015.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, A. Doenças cucurbitáceas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamni Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, (Ed.). **Manual de fitopatologia: volume 2: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: CERES, p. 325- 337, 1997.
- LEBEDA, A. et al. Structure and temporal shifts in virulence of *Pseudoperonospora cubensis* populations in the Czech Republic. **Plant pathology**, v. 62, n. 2, p. 336-345, 2013.
- LEBEDA, A. URBAN, J. Disease impact and pathogenicity variation in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. In: **Progress in cucurbit genetics and breeding research. Proceedings of Cucurbitaceae**. p. 267-273, 2004.
- LEBEDA, A., COHEN, Y. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)—biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. **European journal of plant pathology**. 129 – 2: 157-192, 2011.
- LEBEDA, A., URBAN, J. Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. *Acta Horticulturae*. 731: 327-336, 2007.
- LEBEDA, A.; COHEN, Y. Resistance to fungicides in *Pseudoperonospora cubensis*, the causal pathogen of cucurbit downy mildew. In: Thind, T. S. **Resistance to fungicides in crop protection: risk and management**. Wallingford, UK: CABI, 44-63, 2012.
- LEE, J. S., et al. Diversity, phylogeny, and host-specialization of *Hyaloperonospora* species in Korea. **Mycobiology**, v. 45, n. 3, p. 139-149, 2017.
- LOPES, J. F.; CARVALHO, S. I. C.; PESSOA, H. B. S. V. Recursos Genéticos de melão e pepino na Embrapa Hortaliças. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2014.
- LUTZ, B.E., ALZER, F.C., GOMES-KLEIN, V. L. MENDONÇA, C. B. F., ESTEVES, V. G. Pollen morphology of selecte species of Cucurbitaceae Juss. from the Cerrado. **Braz. J. Bot** 44, 449–456, 2021.
- MONCALVO, J. M.; Wang, H. H.; Hseu, R. S. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 87, 223–223.1995.
- MOORMAN, G. W., KANG, S., GEISER, D. M., KIM, S. H. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. **Plant Disease**, 86: 1227–1231, 2002.

- OJIAMBO, P. S. et al. Epidemiology and population biology of *Pseudoperonospora cubensis*: A model system for management of downy mildews. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 223-246, 2015.
- ORTEGA, J. G, PEREIRA, M. E., VILLAO, F. A., Carlos Castro-PIGUAVE, C. C., GARCÍA, I. D., CASTILLO, J. A. Development of an ecological strategy for the control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in cucumber cultivation (*Cucumis sativus* L.). *Bionatura*, v. 5, n. 2, p. 1101-05, 2020.
- PALTI, J., COHEN, Y., 1980. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. *Phytoparasitica*, 8(2), pp.109-147, 1980.
- PAVAN, M. A.; REZENDE, J.A. M., KRAUSE-SAKATE, R. Doenças da cucurbitáceas. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia** – Doenças das plantas cultivadas. Ouro Fino-MG, CERES, p.323-334, 2016.
- POSADA, D., BUCKLEY, T. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systematic biology*.53: 793-808, 2004.
- RAMBAUT A. FigTree 1.2.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> [Verified 08 junho 2020], 2009.
- RANNALA, B., YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311, 1996.
- REIS, A. Míldio das cucurbitáceas. Embrapa Hortaliças-Comunicado Técnico (**INFOTECA-E**), 2007.
- RESENDE, G. M, COSTA, N. D. Embrapa Semiárido. Sistema de produção de Melão. 2010. Disponível em <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spmelao/socioeconomia.html> Acesso em 24 de outubro de 2021.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J. MRBAYES 3: Bayesian Phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19. 1572-4, 2003.
- RSALIYEV, A. S. et al. *Pseudoperonospora cubensis* virulence and pathotype structure in Kazakhstan. **Plant Pathology**, v. 67, n. 9, p. 1924-1935, 2018.
- RUNGE, F.; NDAMBI, B.; THINES, M. Which morphological characteristics are most influenced by the host matrix in downy mildews? A case study in *Pseudoperonospora cubensis*. **PLoS One**, 7(11), e44863. 2012b.
- RUNGE, F., THINES, M. Host matrix has major impact on the morphology of *Pseudoperonospora cubensis*. **European journal of plant pathology**, v. 129, n. 2, p. 147-156, 2011.
- RUNGE, F., THINES, M. Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis*. *Plant disease*. 96-1:55-61, 2011.

- RUNGE, F.; CHOI, Y. J.; THINES, M. Phylogenetic investigations in the genus *Pseudoperonospora* reveal overlooked species and cryptic diversity in the *P. cubensis* species cluster. **European Journal of Plant Pathology**, v. 129, n. 2, p. 135-146, 2011.
- SALCEDO, A. et al. Diagnostic guide for cucurbit downy mildew. **Plant Health Progress**, v. 21, n. 3, p. 166-172, 2020.
- SANTOS, A. A., CRISÓSTOMO, J. R., CARDOSO, J. W. Avaliação de híbridos de melão quanto às principais doenças nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2004.
- SANTOS, A.A., CARDOSO, J.E., VIDAL, J.C., VIANA, F.M.P., ROSSETTI, A.G. Efeito do início de ocorrência do míldio na produção de frutos do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**. 28:548-551, 2003.
- SANTOS, G. R. LEÃO, E. U., GONÇALVES, C. G., CARDON, C. H. Manejo da adubação potássica e da irrigação no progresso de doenças fúngicas e produtividade da melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 36-44, 2013.
- SAVORY, E. A. et al. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 3, p. 217-226, 2011.
- SCHAEFER, H., RENNER, S. S. Cucurbitaceae. In: Kubitzki K (ed) The families and genera of vascular plants vol. 10, Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer, Berlin, pp 112–174, 2011.
- SHETTY, N. V., WEHNER, T. C., THOMAS, C. E., DORUCHOWSKI, R. W., & VASANTH SHETTY, K. Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. **Scientia Horticulturae**, 94(3-4), 231–239, 2002.
- SHOUKRY, M. R., AL GAZAR, T.; EL-SHESHTAWI, M. Ability of Some Antagonistic Fungi for Controlling Cucumber Downy Mildew Disease Caused by *Pseudoperonospora cubensis*. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 12, n. 1, p. 67-69, 2021.
- SPENCER, M. A., DICK, M. W. Aspects of gramminicolous downy mildew biology: Perspectives for tropical plant pathology and Peronosporomycetes phylogeny. In R. Watling, S. Isaac, & C. H. Robinson (Eds.), **Tropical mycology, vol 2, micromycetes** (pp. 63–81). London: CABI Publishing, 2002.
- THINES, M. et al. A revision of *Bremia graminicola*. **Mycological Research**, v. 110, n. 6, p. 646-656, 2006.
- THINES, M. et al. A revision of *Plasmopara penniseti*, with implications for the host range of the downy mildews with pyriform haustoria. **Mycological Research**, v. 111, n. 12, p. 1377-1385, 2007.
- THINES, M. KAMOUN, S. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr Opin Biol* 13:427–433, 2010.
- THINES, M., CHOI, Y. J. Evolution, diversity, and taxonomy of the Peronosporaceae, with focus on the genus *Peronospora*. **Phytopathology**, v. 106, n. 1, p. 6-18, 2016.
- THINES, M., VOGLMAYR, H., GÖKER, M. Taxonomy and phylogeny of the downy mildews (Peronosporaceae). *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions, and Research Tools*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 47-75, 2009.

- THOMAS, A., CARBONE, I., CHOE, K., QUESADA-OCAMPO, L. M., OJIAMBO, P. S. Resurgence of cucurbit downy mildew in the United States: insights from comparative genomic analysis of *Pseudoperonospora cubensis*. **Ecology and evolution** 7:6231–6246. 2017.
- THOMAS, A., CARBONE, I., LEBEDA, A., OJIAMBO, P.S. Virulence structure within populations of *Pseudoperonospora cubensis* in the United States. **Phytopathology**. 107-6: 777-785, 2017.
- THOMAS, C. E. et al. Physiological specialization in *Pseudoperonospora cubensis*. **Phytopathology**, v. 77, n. 12, p. 1621-1624, 1987.
- TOPOREK, S. M. et al. QTL mapping of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* clade 1, mating type A2, in Cucumis melo. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 1-10, 2021.
- VIANA, F. M. P. et al. Recomendações para o controle das principais doenças que afetam a cultura do melao na região Nordeste. **Embrapa Agroindústria Tropical-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.
- VOGLMAYR, H. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. In: *The Downy Mildews-Genetics, Molecular Biology and Control*. Springer, Dordrecht, 3-18, 2008.
- WALLACE, E. C.; D'ARCANGELO, K. N.; QUESADA-OCAMPO, L. M. Population analyses reveal two host-adapted clades of *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew, on commercial and wild cucurbits. **Phytopathology**, v. 110, n. 9, p. 1578-1587, 2020.