



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y PATOGENICIDAD DE *MICROCYCLUS ULEI* EN LA AMAZONIA COLOMBIANA

Armando Sterling¹, Alexis Calderón²,
Olga Lucía Rodríguez³ y Lorena Quintero³

Plantas de caucho, Armando Sterling

Resumen

El Mal Suramericano de la Hoja (MSH), causado por el hongo ascomiceto *Microcyclus ulei* (P. Henn) v. Arx, es la enfermedad más severa en el *Hevea* spp. en América. El objetivo de este estudio fue describir la morfología y evaluar la patogenicidad de *M. ulei* en clones de *Hevea* spp., bajo condiciones controladas.

Los aislamientos se caracterizaron en medio PDA y se evaluó su patogenicidad teniendo en cuenta el tipo de reacción de cinco clones de caucho analizados según tres componentes de resistencia parcial. Se obtuvieron cuatro aislamientos de *M. ulei* *in vitro*: 17aVIF, 17bVIF, 17iVIF y 17qVIF, procedentes de plántulas de vivero.

Al cabo de 12 días, aparecieron pequeñas colonias dispersas y de coloración beige, 10 días después se tornaron grisáceas y estromáticas. Se observaron conidios que correspondieron al estado anamorfo *Fusicladium heveae* (K. Schub. & U. Braun). Los conidios fueron generalmente septados, curvados a sigmoides, lisos y hialinos.

Se encontró una diferencia significativa en los componentes de resistencia: intensidad de ataque e intensidad de esporulación ($p < 0,05$). Estas variables fueron las más correlacionadas ($r = 0,76$) ($p < 0,05$). La máxima patogenicidad se expresó en los clones MDF 180 y PB 260, y el aislamiento 17iVIF fue el más agresivo, pues expresó virulencia en el 100% de los clones evaluados.

Este primer reporte para la Amazonia colombiana determinó la pérdida de resistencia en varios de los clones evaluados, además de una reacción clonal específica según la procedencia del material vegetal y una compatibilidad específica con respecto al aislamiento.

Palabras clave

Microcyclus ulei, *Hevea* spp., patogenicidad, componentes de resistencia.

Abstract

South American Leaf Blight (SALB), caused by an ascomycete fungus *Microcyclus ulei* (P. Henn) v. Arx, is

¹ Investigador de Recursos Genéticos y Biotecnología – Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, Sede Florencia, Colombia. (Autor para correspondencia), asterling@sinchi.org.co

² Investigador del Grupo de Micología GINMUA, Universidad de la Amazonia, Florencia, Colombia, bioale125@hotmail.com

³ Investigadora de Recursos Genéticos y Biotecnología – Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, Sede Bogotá, Colombia, olrodriguez@sinchi.org.co; lquintero@sinchi.org.co

the most serious disease in *Hevea* spp in America. This study describes the morphology and evaluates the pathogenicity of *M. ulei* in clones of natural rubber in controlled conditions.

The isolates were characterized in PDA medium and the pathogenicity evaluated according to the type of reaction of five rubber clones, considering three partial resistance components. Were obtained four isolates of *M. ulei* in vitro: 17aVIF, 17bVIF, 17qVIF 17iVIF of sexual seed seedlings.

After 12 days, small scattered colonies appeared with beige coloration, 10 days later it turn gray and stromatas. Conidia were observed which corresponded to the anamorph state *Fusicladium heveae* K. Schub. & U. Braun.

Conidia were usually septate, curved to sigmoid, smooth and hyaline. There was significant difference in the resistance components: intensity of attack and intensity of sporulation ($p < 0.05$). These variables were most correlated ($r = 0.76$) ($p < 0.05$). The maximum pathogenicity was expressed in the rubber clones MDF 180 and PB 260, and isolate 17iVIF was the most aggressive expressing virulence in 100% of the rubber clones tested.

This first report to the Colombian Amazon allowed to determine the loss of resistance in several of the rubber clones tested, a reaction clonal specified according to the origin of plant material and specific compatibility in accord with the isolate evaluated.

Keywords

Microcyclus ulei, *Hevea* spp. Pathogenicity, Resistance Components.

Introducción

Se calcula que en Colombia existen cerca de 30.346 Ha cultivadas de caucho natural *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg., y Caquetá es el departamento más heveícola, con el 23,6% de área sembrada del total cultivado (Castellanos *et ál.*, 2009). Caquetá cuenta con 7.506 Ha de caucho natural, de las cuales

1.390 están en producción y generan al rededor de 1.212 toneladas de caucho seco por año (ASOHECA, 2009). Sin embargo, según STNC (2009), en el 2009 aproximadamente el 90% del caucho natural usado en el país fue importado; Indonesia, Malasia y Guatemala fueron los principales proveedores, con 26.682 toneladas.

Esta situación impone al sector heveícola colombiano el gran reto de incrementar las áreas de siembra, para suplir las miles de toneladas requeridas por la industria nacional. Sin embargo, existen limitaciones que ponen en riesgo el éxito de nuevas plantaciones, con respecto al desarrollo fitosanitario del cultivo, en razón a que se desconoce la susceptibilidad de clones al hongo *Microcyclus ulei* (P. Henn) v. Arx, y su variabilidad fisiológica.

En Centro y Suramérica, el principal limitante para el establecimiento de nuevos cultivos, es el hongo fitopatógeno *M. ulei*, que causa el Mal Suramericano de la Hoja (SALB, por sus siglas en inglés), una enfermedad endémica de la región amazónica identificada como una de las cinco afecciones más agresivas en plantas.

El SALB reviste importancia debido a que produce defoliaciones prematuras y reduce la actividad fotosintética de la planta, es posible que disminuya la producción de látex entre 20 y 75% y ésta es la causa más perjudicial para el productor.

La presencia de razas o variantes del hongo *M. ulei*, hace cada vez menos efectivo el control químico de la enfermedad, lo que ocasiona la destrucción de las plantaciones y genera un serio problema a escala mundial, que repercute en pérdidas anuales del 15 al 20% de la producción (Gómez y López, 2002; Compagnon, 1998).

En ese sentido se decidió evaluar la patogenicidad del hongo *M. ulei* en cinco clones de caucho (*Hevea* spp.), bajo condiciones controladas, reconociendo el grado de resistencia de los materiales vegetales en la Amazonia colombiana, lo cual contribuirá al fortalecimiento de nuevos cultivos de caucho de uso comercial, promisorio y potencial en esta zona del país, y generará alternativas de solución para los cultivadores.

Materiales y métodos

Obtención de aislamientos de *M. ulei*

Área de estudio y colecta de material foliar infectado con *M. ulei*

Las muestras foliares de caucho natural (*Hevea* spp.) con síntomas de *M. ulei* fueron recolectadas en la localidad de Itarka, en el Jardín Clonal del Instituto Sinchi, vivero y Jardín Clonal de ASOHECA (Gremio cauchero) y Parcela de Observación Clonal Unión Temporal IBUN-Sinchi, ubicados en el municipio La Montañita (Caquetá, Colombia) (figura 1).

Esta región es considerada zona de no escape al SALB, dado que las condiciones climáticas propias de la Amazonia colombiana favorecen el desarrollo del patógeno.

Se realizaron recorridos por las plantaciones y, a través de la observación macroscópica de los síntomas causados por *M. ulei* en el material foliar, se seleccionó la fuente de inóculo.

En cada colecta, se muestrearon de forma aleatoria 30 plantas de vivero y 7 plantas de cada uno de los clones experimentales FX2261, MDF180, FX4098, PA31 y PB260, con folíolos que presentaran lesiones foliares abaxiales de tipo conidial (apariencia afelpada

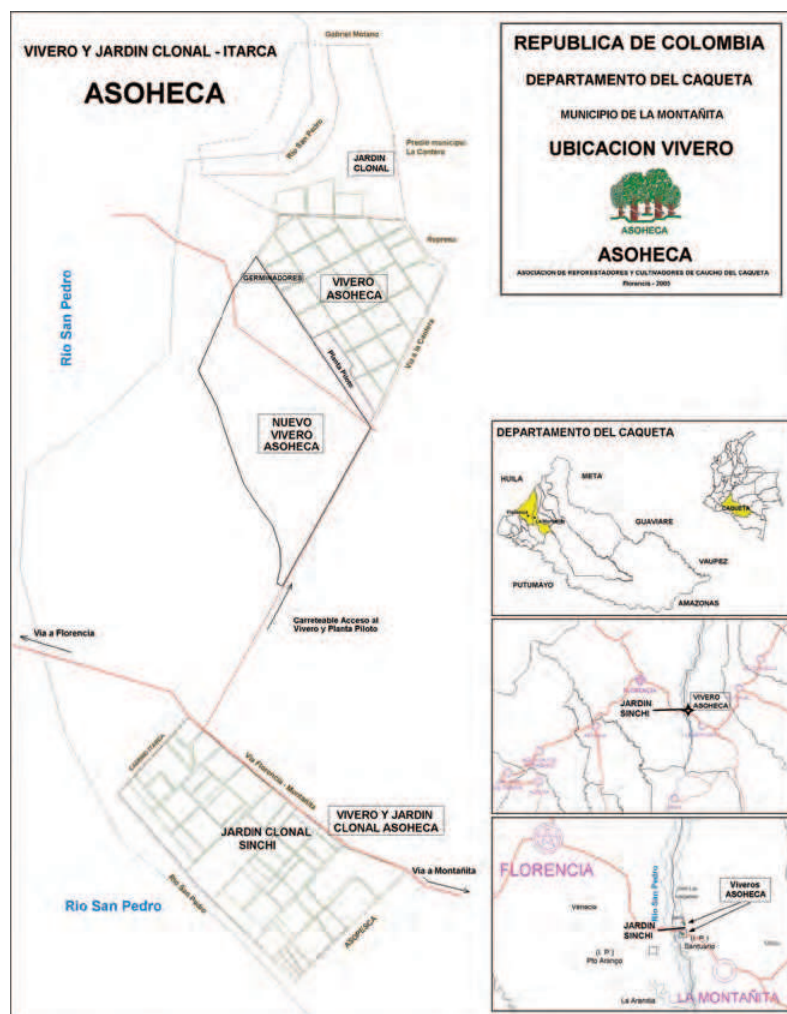


FIGURA 1. AREA DE ESTUDIO

y acuosa de un color verde cenizo), ocasionadas por *Fusicladium heveae*, estado anamorfo de *M. ulei*.

Una vez seleccionada la planta infectada, se eligió el último lanzamiento foliar y se escogieron los foliolos en estadio B, que presentaron la mayor intensidad de esporulación en un rango comprendido entre 4 y 5, según la escala de Mattos *et al.*, (2003).

Aislamiento *in vitro* de *M. ulei*

Los foliolos infectados con *M. ulei* se almacenaron en cajas de Petri, que contenían discos de papel filtro húmedo. Posteriormente, fueron incubadas en el laboratorio a temperatura ambiente, bajo luz cercana a los 2.000 lux, durante 12 horas (Junqueira *et al.*, 1984). Esto favoreció la producción de conidios.

Después de este período de incubación, la observación bajo estereoscopio permitió comprobar la presencia de conidios en la superficie de las lesiones. Para el aislamiento y crecimiento de *M. ulei* se adaptaron las metodologías de Junqueira *et al.*, (1984) y Cardoso y Mattos (2007). Para la esporulación se ajustaron las metodologías propuestas por Gasparotto *et al.*, (1997), Mattos *et al.*, (1999) y Cardoso y Mattos (2007). Del muestreo exploratorio realizado en vivero y en las diferentes colecciones clonales.

Identificación del hongo

La identificación del hongo se llevó a cabo a teniendo en cuenta las características macromorfológicas y microscópicas de la fase conidial asexual de *M. ulei* (*F. heveae*), en colonias de 20 a 30 días de crecimiento, de acuerdo con las claves y monografías pictóricas propuestas por Cannon *et al.*, (1995) y Schubert *et al.*, (2003).

Pruebas de infección y niveles de patogenicidad de *M. ulei*

Material foliar seleccionado para las pruebas de patogenicidad

Se seleccionaron 5 clones de caucho (*Hevea* spp.): FX2261, MDF180, FX4098, PA31 (clones diferenciales) y PB260 (control positivo), teniendo en cuenta los clones diferenciales empleados por Miller (1966), Darmono y Chee (1985), Chee *et al.*, (1986) Junqueira *et al.*, (1986) y Mattos *et al.*, (2003) (tabla 1).

Para las pruebas de infección con *M. ulei*, se emplearon 5 plántulas/clon con segundo piso foliar en crecimiento y un rango de edad post-injertación de 3 a 4 meses. Con el fin de confirmar el cuarto postulado de Koch, sobre el aislamiento de *M. ulei*, se utilizó el clon susceptible PB 260, así como para la estandarización de los métodos de infección, y en la producción de inóculo *in vivo* (revirulentación de *M. ulei*).

Producción de inóculo *in vivo* de *M. ulei* para las pruebas de infección

Una vez aparecieron las colonias de *M. ulei* esporuladas, se efectuaron las inoculaciones en los clones de *Hevea* spp., altamente susceptibles (PB 260), con el objetivo de revirulentar los aislamientos del hongo *M. ulei*, para que recobraran la capacidad de infección perdida por los subcultivos realizados, y generar en el clon la producción masiva de inóculo para la evaluación de la capacidad de virulencia de los aislamientos a una serie de clones de clones diferenciales, lo cual permitió determinar la susceptibilidad de los clones.

TABLA 1. CLONES DE CAUCHO NATURAL (*HEVEA* spp.) UTILIZADOS EN LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE *MICROCYCLUS ULEI*.

Clon	Progenitores	Especie de Hevea	Origen
FX 2261	F 1619 x AVROS 183	H. brasiliensis x H. brasiliensis	Brasil
FX 4098	PB 86 x B 110	H. brasiliensis x H. brasiliensis	Brasil
MDF 180	Clon primario	H. brasiliensis	Perú
PA 31	Clon primario	H. pauciflora	Brasil
PB 260	PB 5/51 x PB 4/9	H. brasiliensis x H. brasiliensis	Malasia

Tomado de: Miller (1966); Darmono & Chee (1985); Chee *et al.*, (1986); Junqueira *et al.*, (1986); Mattos *et al.*, (2003).

TABLA 2. ESCALA DE INTERACCIÓN: RESISTENCIA DE HEVEA VS. VIRULENCIA DE *M. ULEI*

Clon	Aislamiento	IE	y/o	DE
Completamente resistente (CR)	Avirulento	<3	y	0
Parcialmente resistente (PR)	Poco virulento	≤5	y	≤2
Altamente susceptible (AS)	Altamente virulento	>5	o	>2

IE: Intensidad de esporulación (1 – 6).

DE: Densidad estromática (0- 4).

Inoculación de *M. ulei* para la evaluación de los niveles de patogenicidad

La inoculación del hongo (*M. ulei*) se realizó en el laboratorio, empleando un aerógrafo (PAASCHE 27513) y un compresor eléctrico calibrado a 4,5 Pa de presión. Se roció una suspensión de inóculo de 2×10^5 conidios/mL, con Tween 80 al 0,05%, sobre la cara abaxial de folíolos jóvenes, correspondientes al estadio B₂, descrito por Hallé *et al.*, (1978), a 23°C y una humedad relativa entre 85 y 95% (García *et al.*, 1999).

Después de las inoculaciones, las plantas fueron llevadas a cuartos climatizados donde permanecieron 24 horas en la oscuridad, y posteriormente se mantuvieron con un fotoperíodo de 12 horas de luz, empleando cuatro lámparas fluorescentes de 40W, durante 12 días.

Tras este período, las plantas fueron transferidas a un vivero con polisombra al 50%, con el fin de observar el desarrollo de la fase estromática (Sambugaro, 2003).

Las hojas infectadas por el patógeno fueron revisadas y analizadas 5, 10, 45 y 90 días después de la inoculación, con el fin de describir las lesiones que se presentaron durante el ciclo de la enfermedad, para ello se emplearon los componentes de resistencia que se describen a continuación:

Componentes de resistencia de *M. ulei*

Las variables sintomáticas empleadas fueron:

- **Intensidad de esporulación:** se recurrió a la escala propuesta por Mattos *et al.*, (2003). La cual

clasifica las lesiones según su intensidad de esporulación de 1 a 6.

- **Intensidad de ataque:** se definieron 5 clases, basadas en el porcentaje de superficie foliar con síntomas así: 1) 0-0.8% (ataque nulo o resistente); 2) 1-5% (ataque leve); 3) 6-15% (ataque moderado); 4) 18-30% (ataque severo) y 5) 40-100% (ataque muy severo) (Chee, 1976).
- **Densidad estromática:** se evaluó el número de estromas presentes en folíolos maduros (estadio D), a través de la escala propuesta por Mattos *et al.*, (2003).

Escala de resistencia de *Hevea* vs. virulencia de *M. ulei*

La intensidad de esporulación y la densidad estromática son los componentes de resistencia más importantes al momento de clasificar la resistencia del género *Hevea* a *M. ulei*, y el nivel de virulencia (severidad del ataque en relación con la producción de esporas) de *M. ulei* (Mattos *et al.*, 2003). A partir de esta afirmación, se definieron 3 tipos de interacciones *Hevea* x *M. ulei* (tabla 2). Para su presentación, se adaptó la nomenclatura de Junqueira *et al.*, (1986) y se modificó la escala de resistencia Le Guen *et al.*, (2002).

Evaluación de la patogenicidad de *M. ulei* en clones de *Hevea* sp

Se consideró como principal criterio de evaluación la agresividad de los aislamientos, expresada por Bos y Parlevliet (1995) como la habilidad del patógeno para atacar y desarrollarse en un hospedante.

Este criterio de clasificación se evaluó con base en la máxima de intensidad de esporulación. En este sentido, se asumió como clon resistente (R) aquel que no exhibió signos de esporulación del patógeno (intensidad de esporulación 1 y 2), y se clasificó como clon susceptible (S), el que expresó una clara esporulación del patógeno (intensidad de esporulación de 3 a 6). Además, se reportó para cada aislamiento el número de clones susceptibles.

Análisis estadísticos

El diseño experimental fue completamente aleatorizado, con un arreglo factorial 5x4 (5 clones y 4 aislamientos), con 5 repeticiones (5 plantas/clon). Los tratamientos fueron constituidos por la combinación de los factores (Factor A: clon y Factor B: aislamiento). En total, se llevaron a cabo 20 tratamientos.

Se aplicó un análisis de varianza de dos vías (Anova), Modelo I al 5% de significancia para las variables intensidad de ataque e intensidad de esporulación. También se probó la normalidad y la homocedasticidad (test de Bartlett) al 5% de significancia, para las variables intensidad de ataque e intensidad de esporulación.

Dada la naturaleza de los datos de la variable densidad estromática, se practicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para cada factor. Después se efectuó la prueba de comparación paramétrica de Tukey HSD, para las variables intensidad de ataque e intensidad de

esporulación. Para los estromas, se corrió el test no paramétrico Student Newman Keuls SNK, ambos al 5% de significancia.

Para conocer el grado de asociación múltiple de las tres variables, se utilizó el test de Spearman, al 5% de significancia. La comprobación de los supuestos se obtuvo con los test de Anova, el test de Tukey se corrió con el programa SAS Versión 9.0. El test de Kruskal-Wallis, el de Tukey para grupos homogéneos, el SNK y el coeficiente de correlación múltiple de Spearman se corrieron con el programa Statgraphics Plus 4.0.

Resultados y discusión

Obtención de aislamientos de *M. ulei*

Colecta del material foliar infectado con *M. ulei*: los folíolos en estadio B1 de *H. brasiliensis*, infectados con *M. ulei* y colectados tanto en vivero como en jardín clonal, expresaron lesiones abaxiales irregulares, con apariencia afelpada y acuosa de color verdacenizo, con un rango de intensidad de ataque de 3 a 4 en la escala de Chee (1976).

De acuerdo con la escala de esporulación de Mattos *et al.*, (2003), los folíolos colectados en vivero presentaron lesiones con mayor rango de intensidad de esporulación (de 3 a 6) que el rango de esporulación (de 3 a 5), encontrado en folíolos provenientes de jardín clonal (figura 2A y 2B).



A



B

FIGURA 2. LESIONES DE *M. ULEI* EN FOLIÓLOS C DE *H. BRASILIENSIS*. **A.** FOLIÓLO COLECTADO EN VIVERO CON INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN (IE) IGUAL A 5. **B.** FOLIÓLO COLECTADO EN JARDÍN CLONAL CON IE = 4.

La diferencia en la esporulación entre los materiales vegetales del vivero y los materiales clonales puede estar asociada con la selección agronómica, que durante muchos años que permitió a los fitomejoradores desarrollar variedades con resistencia a *M. ulei*, y en cuyo caso las distintas expresiones de resistencia se conservaron en colecciones clonales, jardines clonales y plantaciones comerciales, mediante propagación asexual (Gonçalves, 1986).

Aislamiento in vitro de *M. ulei*: la totalidad de los aislamientos fueron obtenidos a partir de folíolos colectados en el vivero de ASOHECA (plántulas origen sexual, pie franco). Estos presentaban lesiones conidiadas (la fase asexual o conidial de *M. ulei*), con una notación de 4 en la escala de Mattos *et ál.*, (2003).

Se obtuvieron *in vitro* 4 aislamientos de *M. ulei*, a los cuales se les asignó la notación VIF: 17aVIF, 17bVIF, 17iVIF y 17qVIF. El bajo número de aislamientos puede estar relacionado con la dificultad para aislar el patógeno, mantener las colonias viables y la inducción de esporulación en condiciones *in vitro* en el laboratorio; sin embargo, Junqueira *et ál.*, (1984) argumenta que la tasa de éxito de un aislamiento realizado el mismo día de la colecta de las hojas es de 70 a 80%, mientras que después de 15 días, la efectividad descende hasta un 10%. Por tal razón, la siembra del patógeno en este estudio fue realizada 12 horas después de la colecta, de modo que los conidios recién retirados de las lesiones recién esporuladas presentan mayor variabilidad y menor cantidad de contaminantes.

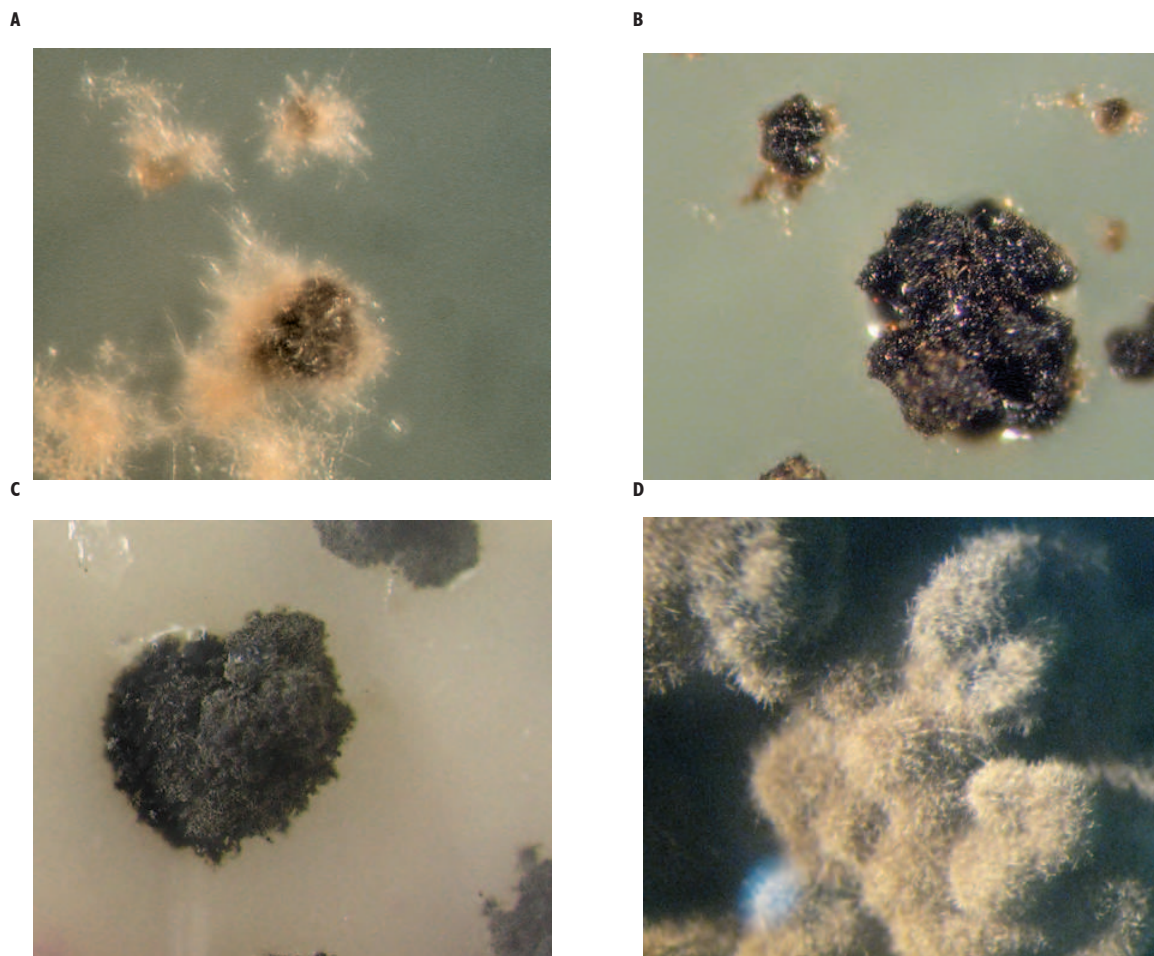


FIGURA 3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE *M. ULEI* BAJO VISTA ESTEREOSCÓPICA. **A.** COLONIAS FILAMENTOSAS DE 12 DÍAS. **B.** CRECIMIENTO ESTROMÁTICO A LOS 22 DÍAS. **C.** MASA ESTROMÁTICA DE 35 DÍAS, OBJETIVO 5X. **D.** COLONIA ALTAMENTE CONIDIADA AL CABO DE 15 DÍAS EN MEDIO PARA ESPORULACIÓN.

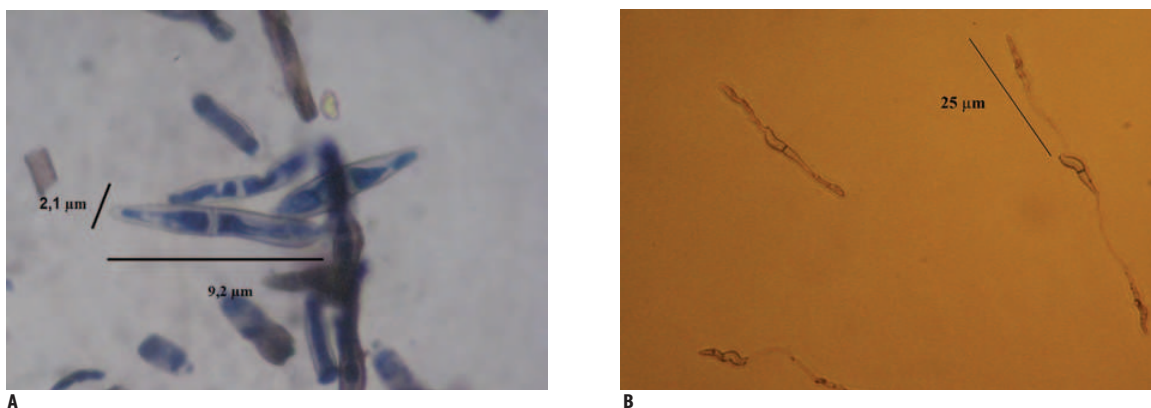


FIGURA 4. CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS DE *F. MACROSPORUM*, ANAMORFO DE *M. ULEI*, BAJO VISTA MICROSCÓPICA. **A.** CONIDIOS VERDE-OLIVÁCEOS UNISEPTADOS CON BASE TRUNCADA, OBJETIVO 40X. **B.** CONIDIOS CON TUBOS GERMINATIVOS AL CABO DE 24 H, OBJETIVO 10X.

Junqueira *et al.*, (1984) afirman que la obtención en laboratorio del inóculo primario de la fase anamórfica de *M. ulei* (*F. heveae*) es uno de los factores que han limitado las investigaciones del Mal Suramericano de la Hoja de caucho, dado que los aislamientos sufren una rápida pérdida de viabilidad de los conidios y son muy susceptibles a la contaminación por diversos agentes microbianos saprofitos.

Después de ajustar el proceso de aislamiento, al cabo de 12 días, se observó la aparición de pequeñas colonias dispersas y de coloración *beige* (figura 3A), 10 días después se tornaron grisáceas y estromáticas (figura 3B). Estos resultados coinciden con los de Gasparotto *et al.*, (1997), quienes afirman que tras 12 días de incubación se puede observar la germinación de la fase asexual de *M. ulei*.

Después de 4 semanas de crecimiento, se encontraron masas estromáticas densas oscuras y compactas, con crecimiento muy lento sobre el medio de cultivo (figura 3C). En medio de crecimiento, los aislamientos con edad de 30 a 45 días fueron transferidos a medio de cultivo para esporulación, entre 15 y 20 días después desarrollaron una apariencia ligeramente aterciopelada con una coloración marrón brillante (figura 3D), característica de las colonias altamente conidiadas.

Autores como Holliday (1970) reportaron que para aumentar la producción de conidios de *M. ulei*, las co-

lonias de 14 días pueden ser expuestas a la luz por 30 ó 40 minutos diarios, a una longitud de onda próxima a la luz al ultravioleta (300-365nm); por otro lado, Chee (1978) sugirió una hora de luz al día para aumentar la producción de conidios; mientras que Schrader (1980) sostiene que los cultivos de *M. ulei* con 14 a 16 días de edad aumentan significativamente la producción de conidios cuando son iluminadas por 1 ó 2 días con ciclos de 0,5 horas de luz de una lámpara fluorescente de 40W, a intervalos de 1,5 horas de oscuridad; Lieberei *et al.*, (1983) afirman que los aislamientos de *M. ulei* expuestos a 90 minutos de luz a diario, durante 1 ó 2 días, aumenta entre 13 y 24 veces la producción de conidios.

En esta investigación se evaluaron las diferentes recomendaciones. lo que permitió la formación de colonias esporuladas fue exponer las cajas de Petri a la luz, a diario, durante 90 minutos. Así se corroboró la propuesta de Lieberei *et al.*, (1983).

Identificación del hongo *M. ulei*: Para la identificación del hongo se realizaron aislamientos a partir de conidios en medio de cultivo para esporulación, en los cuales los talos formados constituyen masas estromáticas compactas y de crecimiento muy lento. Inicialmente presentan un color negro que después de 8 a 9 días se torna *beige*, cuando el nivel de esporulación es alto.

Para la observación microscópica se realizaron montajes a partir de colonias desarrolladas en medio de



A



B

FIGURA 5. INÓCULO *IN VIVO* DE *M. ulei* PRODUCIDO EN CUARTO CLIMATIZADO EMPLEANDO EL CLON PB 260. **A.** LESIÓN CONIDIAL CON UNA INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN IGUAL A 5, EN VISTA ESTEREOSCÓPICA 20X. **B.** ARRUGAMIENTO LIMBO-MARGINAL OCASIONADO POR AISLAMIENTOS DE *M. ulei* INOCULADOS EN FOLIOLOS B2.

cultivo para esporulación, que luego fueron teñidas con azul de lactofenol, para identificar las estructuras reproductivas del hongo.

M. ulei, en su ciclo de vida, presenta tres tipos de esporas: conidios, picnidioforos y ascosporas (Cannon *et al.*, 1995). En las observaciones se diferenciaron los conidios (figura 4A), que pertenecen al estado anamorfo del hongo, correspondiente a *F. heveae*, según Shubert *et al.*, (2003).

Los conidios se formaron de manera individual, por lo general son septados y, en algunas ocasiones, sin éste. Casi todos se presentaron curvados a sigmoides, lisos y hialinos. Posteriormente, tomaron una coloración grisácea o verde olivo, y un tamaño aproximado de $9,2 \times 2,1 \mu\text{m}$ (Shubert *et al.*, 2003). 24 horas después de su transferencia a medio de cultivo para aislamiento, los conidios desarrollaron tubos germinativos hialinos de 21 a $30 \mu\text{m}$ de longitud (figura 4B), que corresponden a la germinación *in vitro* del hongo. También se observaron los conidios en estado anamorfo del hongo, que corresponde a *Fusicladium heveae*.

Pruebas de infección y niveles de patogenicidad de *M. ulei* en clones de caucho natural (*Hevea spp.*)

Producción de inóculo *in vivo* de *M. ulei* para las pruebas de infección

En plántulas susceptibles del clon PB 260 se desarrolló la etapa de revirulentación y producción de inóculo de *M. ulei*. Entre los 6 y los 12 días posteriores a la inoculación, se observaron lesiones con signos característicos de la enfermedad. Éstas presentaron un rango de intensidad de ataque de 3 a 5 en la escala de Chee (1976) y un rango de esporulación de 3 a 5 en la escala de Mattos *et al.*, (2003) (figura 5A).

Las lesiones esporulantes se relacionan con síntomas cloróticos iniciales y el arrugamiento posterior del limbo, en especial sobre la zona marginal y apical de los folíolos (figura 5B). Este comportamiento es característico por mecanismo de resistencia, atribuido al colapso y muerte de las células alrededor del sitio de la infección. El colapso de las células del hospedante también es conocida como reacción de hipersensibilidad (Hashim y Pereira, 1989).

El inóculo *in vivo* de *M. ulei* exhibió *in vitro* un porcentaje de germinación superior al 50%, 12 horas después de la transferencia de los conidios a medio de cultivo agar-agua al 10%. Esta capacidad germinativa fue suficiente para asegurar una infección exitosa durante las pruebas de patogenicidad. Del mismo modo, se obtuvieron *in vitro* reaislamientos de *M. ulei* a partir de conidios revirulentados, provenientes de las lesiones obtenidas en cuarto climatizado. Así se corroboró el cuarto postulado de Koch.

TABLA 3. TEST DE TUKEY HSD PARA LA INTENSIDAD DE ATAQUE CON DOS FACTORES.

Factor 1: Clon		Factor 2: Aislamiento	
Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
PA31	*2,4a	17a VIF	*2,45714a
FX 2261	2,6ab		
FX4098	2,85ab	17b VIF	3,0b
MDF180	3,25b		
PB260	4,15c	17q VIF	3,17143b
		17i VIF	3,51429b

*Las medias seguidas de la misma letra en las columnas no difieren significativamente entre sí, según el test Tukey HSD al 5% de significancia.

Evaluación de los componentes de resistencia de *M. ulei*

Intensidad de ataque

En la intensidad de ataque se tomaron los valores máximos registrados en cada clon. Éstos mostraron una respuesta diferencial a los cuatro aislamientos evaluados: con el 17aVIF, los clones FX 2261 y PA 31 tuvieron una intensidad de ataque de “2”; en los clones FX4098 y MDF 180 de “3”, y en el clon PB 260 de “5”. El clon PB260 fue el más susceptible al ataque de *M. ulei* con este aislamiento. Para el 17b VIF la intensidad de ataque fue de “4” en los clones FX4098 y el MDF 180, mientras que los demás clones presentaron mejor resistencia a este aislamiento con una valoración de “3”; de nuevo, en el clon PB260 se obtuvieron valores máximos de “5”. Para el aislamiento 17i VIF los clones FX 4098 y PB260 fueron susceptibles, pues presentaron valores de “5” y los demás clones presentaron valores de “4”. Finalmente, con el aislamiento 17qVIF, se destacaron los clones FX4098 y el PA31 con valores de “3”, por lo que se consideran resistentes, mientras que el más susceptible fue el clon PB260, con una intensidad de ataque de “5”.

El clon PB260 fue el más susceptible a los 4 aislamientos, presentó una máxima de “5”, lo cual repre-

senta un ataque muy severo (Chee 1976). Se destaca el clon FX4098, que presentó una intensidad de ataque de “5” sólo para el aislamiento 17iVIF. El clon MDF180 fue susceptible a los aislamientos 17bVIF, 17iVIF y 17qVIF con nota máxima “4”, en contraste con el aislamiento 17iVIF, que exhibió la mayor severidad; es decir, una mayor intensidad de ataque entre los cuatro aislamientos probados. El que presentó el nivel menor fue el aislamiento 17a VIF.

En general, los clones FX2261 y FX 4098 presentaron una menor intensidad de ataque a *M. ulei*, en al menos 2 de los 4 aislamientos evaluados. Gasparotto *et ál.*, (1997) y Leal (1999) afirman que los clones FX2261 y el FX4098 presentan resistencia a *M. ulei*, resultado que coincide con esta investigación, ya que estos clones presentaron una menor intensidad de ataque, en comparación con los otros clones evaluados.

Los resultados para intensidad de ataque de *M. ulei* cumplieron con los supuestos de normalidad ($p > 0,05$) y homocedásticos. De acuerdo al test de Anova, existe una diferencia significativa en las medias de las notas máximas de intensidad de ataque entre clon y entre aislamiento ($p < 0,05$). La interacción de estos dos factores también implica una diferencia significativa en las notas máximas de intensidad de ataque, expresadas por los distintos clones para cada aislamiento ($p < 0,05$).

Los resultados del test, tras comparaciones múltiples Tukey HSD, evidencian la existencia de tres grupos homogéneos. En general, la mayor resistencia en los siete clones se presentó con el inóculo del aislamiento 17aVIF, dado que con éste hubo una menor intensidad de ataque, los demás aislamientos presentaron un ataque muy similar.

El clon PB260 fue el más susceptible, ya que exhibió el mayor promedio de nota máxima de ataque (IA= 4,1) (tabla 3). Su susceptibilidad difirió significativamente de los demás clones ($p < 0,05$), lo que contrastó con el clon PA31, el más resistente dado que cuenta con el menor promedio de nota máxima de intensidad de ataque.

También se evidenció que el aislamiento con una mayor intensidad de ataque promedio (3,5) fue el 17iVIF, y el que presentó una menor virulencia fue el aislamiento 17aVIF.

Estos resultados contrastan con lo afirmado por García *et al.*, (1999) quienes utilizaron la intensidad de ataque como un indicador para la patogenicidad de un aislamiento, dentro de los componentes para la resistencia a *M. ulei*.

Las variaciones en los niveles de intensidad de ataque con relación a un mismo aislamiento pueden deberse a las diferencias en la edad de los folíolos inoculados, de acuerdo con lo expresado por Hashim *et al.*, (1978): las hojas con mayor edad son más resistentes a la infección por *M. ulei*.

Intensidad de esporulación

Las notas máximas obtenidas para la intensidad de esporulación, provocadas por los cuatro aislamientos de *M. ulei*, se presentaron entre “1”, para los clones FX2261 y PA31, con el aislamiento 17aVIF, y “4” en el clon PB260.

El clon PB260 presentó la mayor intensidad de esporulación en este aislamiento. Para el 17bVIF, los clones susceptibles (intensidad de esporulación mayor) fueron el MDF180 y PB260 con valores de “4” y “5”, respectivamente; los demás presentaron mayor resistencia con valores entre “2” y “3”.

Los clones MDF180 y PA31 presentaron una intensidad de esporulación de “3”, con el aislamiento 17iVIF, y la esporulación más fuerte “5” se evidenció en el clon PB260. Con el aislamiento 17qVIF, los clones FX4098 y PA31 presentaron una intensidad de esporulación baja, mientras que los clones FX 2161 y MDF180 obtuvieron valores de “4”. Una vez más se destaca el clon PB260 por ser el más susceptible, dado que presentó una intensidad de esporulación de “5”.

Según Gasparotto *et al.*, (1990) y Gasparotto y Lima (1991), la intensidad de esporulación varía de acuerdo con el estado de maduración de los tejidos foliares y la sensibilidad del clon. Esto coincide con los resultados de esta investigación, con los que se encontraron variaciones en la intensidad de esporulación de un mismo clon, y con los demás.

Cuando el fitopatógeno se localiza en los folíolos de las hojas con una edad de 10 a 12 días, las lesiones fueron de apariencia afelpada de color verde oliva, que tornan negras con el tiempo. Esto no corresponde con lo afirmado por Gasparotto y Lima (1991), dado que ellos exponían que las lesiones son circulares, con una apariencia afelpada, que se localizan con más frecuencia en la cara abaxial de la lámina foliar y a los 20 días se va tornando de verde oliva a negra, resultado de la esporulación del microorganismo durante su fase conidial.

Las lesiones tienen un contorno irregular y alcanzan hasta 2 centímetros de diámetro, producen arrugamiento, deformación, rompimiento de tejidos afectados y, luego, defoliación o muerte, de acuerdo con lo obtenido en esta investigación.

Peralta *et al.*, (1990) plantean que la resistencia al Mal Suramericano de la Hoja se asocia con el tamaño de las lesiones y la esporulación. Cuando se evaluaron los clones de *Hevea* a los aislamientos de *M. ulei* en esta investigación, el tamaño de la lesión no mostró significancia, mientras que la intensidad de esporulación si fue representativa. Esto confirma lo expuesto por Junqueira (1985), quien consideró la esporulación como un test sensible para la identificación de la susceptibilidad de los clones.

TABLA 4. TEST DE TUKEY PARA LA INTENSIDAD DE ESPORULACIÓN CON DOS FACTORES

Factor 1: clon		Factor 2: aislamiento	
Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
PA31	1,7a	17a VIF	1,91429a
FX 4098	2,2ab		
FX 2261	2,3ab	17q VIF	2,68571b
MDF180	3,0b		
PB260	4,4c	17b VIF	2,77143b
		17i VIF	3,28571b

*Las medias seguidas de la misma letra en las columnas no difieren significativamente entre sí, según el test Tukey HSD al 5% de significancia.

Hashim y Pereira (1989) y Langford (1945) sugieren que la intensidad de esporulación se debe tener en cuenta para evaluar la resistencia al en clones de *Hevea* y su utilidad en la selección. Junqueira *et al.*, (1989) afirman que el tipo de reacción (intensidad de esporulación) y el diámetro de la lesión constituyen los principales parámetros para evaluar virulencia de *M. ulei*.

Los resultados para la variable intensidad de esporulación de *M. ulei* presentan distribución normal ($p > 0,05$), son homocedásticos. Los resultados del test de Anova muestran que la nota máxima de intensidad de esporulación difiere significativamente entre clon ($p < 0,05$), y según el aislamiento evaluado ($p < 0,05$).

La interacción de estos factores también implica una diferencia significativa entre las notas máximas de intensidad de ataque, expresadas por los distintos clones para cada aislamiento ($p < 0,05$). A través de los resultados posteriores del test de comparaciones múltiples Tukey se identificaron tres grupos homogéneos, en los cuales se observaron variaciones en la intensidad de esporulación en los clones, con respecto a los aislamientos.

En contraste con lo afirmado por Junqueira *et al.*, (1986) quienes inocularon 33 clones de *Hevea* con 16 aislamientos, se destacó la gran variabilidad fisiológica en los aislamientos evaluados. El clon PB260 fue el más susceptible, dado que presentó el mayor promedio de nota máxima de esporulación

(4,4) (tabla 4), y su susceptibilidad difirió significativamente de los demás clones ($p < 0,05$), lo que contrastó con el clon PA31, el más resistente a la intensidad de esporulación con un menor promedio de nota máxima (1,7). también se evidenció que el aislamiento más virulento fue el 17iVIF, dado que es el que causa mayor esporulación, en comparación con los demás, y el de menor esporulación fue el aislamiento 17aVIF (tabla 4).

Los resultados estadísticos de la intensidad de esporulación reflejan que ésta depende de la virulencia del aislamiento y la resistencia del clon. García *et al.*, (1999) mencionan que la ausencia de acumulación de escopoletina, así como la de lignina en las hojas afectadas por el hongo, se relacionan con la severidad de los síntomas de la enfermedad, en este caso, con la esporulación.

En muchos casos, el clon resistente permite la penetración rápida del patógeno, a través de la epidermis para activar en el menor tiempo posible el mecanismo de resistencia. (Hashim *et al.*, 1978, Rivano, 1992). Peralta *et al.*, (1990) afirman que la resistencia a *M. ulei* está asociada al tamaño de las lesiones y la esporulación, Mattos (2007) reportó 6 nuevas razas de *M. ulei*, lo que suma un total de 42 razas obtenidas a partir de clones que antes eran resistentes pero que, a través de los años, se volvieron susceptibles a las nuevas variantes del hongo, por lo que pone de manifiesto la alta variabilidad fisiológica de *M. ulei* y una pérdida paulatina de la resistencia de diversos clones de caucho.

En particular, la variabilidad de los aislamientos probados en este estudio confirma los resultados obtenidos por Junqueira *et ál.*, (1986), Rivano (1997) y Mattos *et ál.*, (2003), quienes atribuyen dicha variabilidad a la reproducción sexual. Según Shaner *et ál.*, (1992). Esta característica es la responsable de la alta variabilidad patogénica en los hongos de reproducción sexual. Junqueira *et ál.*, (1988) afirma que el hongo desarrolla su fase conidial en de un período que varía entre 5 y 16 días, este período es considerado por Gasparotto *et ál.*, (1997) como una fase explosiva por la facilidad en la diseminación de los conidios.

Densidad estromática

La densidad estromática, en los clones FX4098, MDF180 y PA31 fue de “0” para los cuatro aislamientos evaluados. El clon FX2161 presentó una densidad estromática de “1” para los aislamientos 17iVF y el 17qVF; los datos registrados de densidad estromática en el clon PB260 variaron entre “1” para el aislamiento 17aVF y “3” para los aislamientos 17iVF y el 17qVF. Estos datos concuerdan con los reportados por García *et ál.*, (1999), lo que confirma la severidad manifiesta en la virulencia de *M. ulei* sobre este clon oriental.

De acuerdo con los resultados, se evidenció que un incremento en la intensidad de ataque implicó un au-

mento en la intensidad de esporulación de los aislamientos ensayados, y el aumento de la esporulación favoreció en mayor grado la formación de estromas.

La resistencia completa, exhibida por varios de los clones evaluados en distintos aislamientos, inhibió la formación de estructuras estromáticas, como ocurrió con los clones FX 4098, MDF 180 y PA 31. Estos materiales vegetales son muy importantes en la búsqueda de resistencia horizontal (Rivano *et ál.*, 1989; Simmonds, 1990), dado que las progenies generadas a partir de estos parentales constituyen una barrera genética clave en la interacción hospedero-patógeno, porque conlleva al bloqueo del desarrollo sexual del hongo, condición en la que ocurre la mayor variabilidad fisiológica de este patógeno (Junqueira *et ál.*, 1987; Gasparotto *et ál.*, 1989; Peralta *et ál.*, 1990).

Los resultados del test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la variable densidad de estromas mostraron que no existe diferencia significativa en la densidad estromática entre los cuatro aislamientos de *M. ulei* evaluados ($p > 0,05$), es decir que la densidad estromática no varió cuando se modificó el aislamiento patogénico.

La densidad estromática difiere significativamente entre los diferentes clones de *Hevea* spp. ($p < 0,05$). Esto permite concluir, que la densidad estromática no

TABLA 5: TEST DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE SNK PARA LA FORMACIÓN DE ESTROMAS POR DOS FACTORES

Estroma por clon		Estroma por aislamiento	
Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
FX 4098	*0,0a	17a VIF	*0,0857143a
PA31	0,0a		
MDF180	0,0a	17b VIF	0,257143a
FX 2261	0,2ab		
PB260	1,7c	17q VIF	0,485714a
		17i VIF	0,514286a

*Las medias seguidas de la misma letra en las columnas no difieren significativamente entre sí, según el test SNK al 5% de significancia

TABLA 6. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN PARA DISTINTOS COMPONENTES DE RESISTENCIA A *M. ULEI*

Componentes	Componentes		
	1	2	3
1- Intensidad de ataque			
2- Intensidad de esporulación	0.7617		
3- Densidad estromática	0.4732	0.5965	

varía según el tipo de aislamiento evaluado, pero si lo hace dependiendo del clon de *Hevea* inoculado.

Los resultados obtenidos con el test de comparaciones múltiples SNK, permitieron apreciar que los clones FX4098, PA31 y MDF180 fueron los más resistentes a la formación de estromas, y que el más susceptible con respecto a la densidad estromática fue el clon PB260 (tabla 5). En cuanto a los aislamientos, se observó que todos pertenecen a un grupo homogéneo (Tabla 5), es decir que no existe diferencia en los clones cuando se inocula un aislamiento, la formación de estomas es indiferente del aislamiento.

La formación de estromas no fue tan relevante en este estudio, lo que refleja una mínima expresión de la fase sexual de los aislamientos probados, en los primeros 18 a 30 días postinoculación. El mayor período de generación estromática observado en esta investigación fue el del clon PB260, relacionado con su capacidad para formar estructuras estromáticas.

En el estudio de García *et al.*, (1999) el período estromático osciló entre los 8 y los 30 días, lo cual significa que los clones evaluados presentaron un menor período de aparición de las primeras lesiones esporuladas y, por ende, una mayor intensidad de esporulación. Es decir que los clones evaluados por estos autores fueron más susceptibles que los probados en este estudio.

Por otro lado, Chee *et al.*, (1985), observaron que los clones FX 3864 y FX 2261 presentaron una abundante producción de estromas. No obstante, en este estudio, el clon FX 2261 fue parcialmente resistente y no generó estromas por encima de “2” en una escala de “0 a 4”. Reboucas-Lins y Ataíde-Brito (1981) sostiene que el clon FX2261 presentó el peor comportamiento fitosanitario al ser evaluado en condiciones de plantío. Esto significa que los aislamientos evaluados en esta investigación fueron menos agresivos que los empleados por los autores mencionados.

TABLA 7. TIPO DE REACCIÓN DE CINCO CLONES DE CAUCHO NATURAL (HEVEA SPP.) A CUATRO AISLAMIENTOS DE *M. ULEI* PROCEDENTES DE VIVERO (VIF)

Aislamiento	Comportamiento* de <i>Hevea</i> spp.				
	FX 2261	FX 4098	MDF 180	PA 31	PB 260
17a VIF	R	R	S	R	S
17b VIF	S	R	S	R	S
17i VIF	S	S	S	S	S
17q VIF	S	R	S	R	S

S= Susceptible (con esporulación)

R= Resistente (Sin esporulación)

Correlación entre los componentes de resistencia parcial

De acuerdo con la tabla 6, las correlaciones más bajas se observaron entre la intensidad de ataque y la densidad estromática. La más alta se presentó entre la intensidad de ataque y la intensidad de esporulación, seguida por la correlación entre la intensidad de esporulación y la densidad estromática.

El componente que mejor se correlacionó con la formación de estromas fue la intensidad de esporulación, de ahí que en los estudios contemporáneos sobre mejoramiento genético con énfasis en la resistencia a *M. ullei*, la intensidad de esporulación y la densidad estromática sean los dos componentes de resistencia fundamentales para clasificar la reacción de resistencia en *Hevea* (Le Guen *et al.*, 2002; Mattos *et al.*, 2007).

Peralta *et al.*, (1990) plantea que la intensidad de esporulación está muy relacionada con el tamaño de las lesiones, afirmación que coincide con lo obtenido en esta investigación, dado que al haber una mayor intensidad de esporulación mayor será la densidad estromática.

Esta relación entre la intensidad de esporulación y la densidad estromática es muy importante, dado que permite entender que la resistencia de *Hevea* a *M. ullei* puede estar asociada con estos componentes, lo cual resulta primordial en la búsqueda de resistencia horizontal, de acuerdo con Simmonds (1990) y Rivano (1992), quienes afirman que las progenies de *Hevea*, generadas a partir de parentales con estas características, constituyan una barrera genética en la interacción hospedero-patógeno, ya que conlleva al bloqueo del desarrollo sexual del hongo, causa de la mayor



Plantación de caucho, Armando Sterling

variabilidad fisiológica de este patógeno (Junqueira *et al.*, 1987; Gasparotto *et al.*, 1989; Peralta *et al.*, 1990).

Clasificación del tipo de reacción clonal

Todos los clones evaluados en este estudio presentaron resistencia incompleta en al menos uno de los aislamientos probados (tabla 7), se destacan los clones FX 4098 y PA 31, por ser los más resistentes, pues sólo expresan susceptibilidad con el aislamiento 17i VIF, virulento en el 100% de los clones evaluados.

Los clones MDF 180 y PB 260 expresaron susceptibilidad en el 100% de los aislamientos probados. Parlevliet (1979) considera que el término resistencia completa es utilizado cuando la multiplicación del patógeno es totalmente inhibida, es decir, cuando no hay esporulación. La resistencia parcial o incompleta se refiere a todos los tipos de resistencia que permiten alguna esporulación del patógeno.

Darmono & Chee (1985) reportaron que el clon FX 4098 era altamente susceptible en laboratorio, pero es menos susceptible en campo. También destacaron la inmunidad del PA 31. Chee y Holliday (1986) reportaron como clon resistente al FX 2261. Junqueira *et al.*, (1987) afirmaron que el clon FX 4098 presenta niveles bajos de resistencia incompleta. Hashim y Pereira (1989) atribuyeron poca resistencia al clon FX 4098, el cual generó grandes lesiones. Rivano (1997) y Mattos *et al.*, (2003) confirmaron la resistencia del clon FX 4098

Conclusiones

La caracterización morfológica y la evaluación de la virulencia de 4 aislamientos de *M. ulei*, obtenidos de la región amazónica en diferentes clones de *Hevea* spp, en condiciones controladas, contribuye con la generación de bases científicas para desarrollar investigaciones orientadas a la determinación de clones de *Hevea* spp, resistentes al Mal Suramericano de la Hoja de Caucho, con alto potencial productivo para la Amazonia colombiana.

En general, la patogenicidad expresada por los aislamientos, de acuerdo al nivel de resistencia de los

clones evaluados, permiten describir tres aspectos importantes: 1) pérdida de resistencia en varios clones evaluados, 2) reacción clonal específica, según la localidad (ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad) y 3) compatibilidad específica con diferentes aislamientos polivirulentos.

Agradecimientos

Al proyecto “Caracterización morfológica y molecular del hongo *Microcyclus ulei* causante del Mal Suramericano de la Hoja en el cultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*)”. Convenio 035/04 IICA-MADR y el contrato 018/04 celebrado entre el IICA y la Unión temporal Manejo fitosanitario del cultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*) Sinchi-IBUN.



Árbol de caucho. Armando Sterling

Referencias

- ASOHECA, Asociación de Reforestadores y Cultivadores de Caucho del Caquetá. (2009). *Información estadística de caucho en el departamento del Caquetá 2009*. Documento técnico de agronegocios. p. 9.
- BOS, L.; & PARLEVLIET, J.E. (1995). Concepts and Terminology on Plant/Pest Relationships: Toward Consensus in Plant Pathology and Crop Protection. *Annu Rev of Phytopathol*, Vol. 33, pp. 269-102.
- CANNON, P. F.; Carmarán, C.C.; & Romero, A. I. (1995). Studies on Biotrophic Fungi from Argentina: *Microcyclus porlieriae*, with a Key to South American Species of *Microcyclus*. *Mycol. Res.* Vol. 99, No. 3, pp. 353-356.
- CARDOSO, S.; y MATTOS, C. R. R. (2007). *Modo operatório para preparação do meio de cultura para Microcyclus ulei. Programa de melhoramento genético de clones de seringueira com resistencia ao fungo Microcyclus ulei. Projeto CMB (Cirad-Michelin-Brasil)*. Documento Técnico D3.
- CASTELLANOS, D. O., Fonseca, R. S., Barón, N. M. 2009. Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de Caucho Natural y su Industria en Colombia. Proyecto Transición de la Agricultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. 209 p
- CHEE, K. H. (1976). South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: Spore Dispersal of *Microcyclus ulei*. *Annals of Applied Biology*, Vol. 84 No. 2, pp. 147-152. (1978). South American Leaf Blight of *Hevea brasiliensis*: Culture of *Microcyclus Ulei*. *Transactions of British Mycological Society*, Vol. 70, No. 3, p. 341.
- CHEE, K.H.; y HOLLIDAY, P. (1986). *P. Enfermedad suramericana de la hoja del hule (caucho) Hevea*. Instituto para la Investigación y Desarrollo del Hule de Malasia, MRRDB. Monografía Núm. 13. Presentado en la serie técnica Núm. 37: *Avances de la investigación en caucho natural*. CONIF.
- COMPAGNON, P. (1998). *El caucho natural: biología, cultivo y producción*. México: CIRAD-C.P.
- DARMONO, T. W.; CHEE, K. H. (1985). Reaction of *Hevea* Clones to Races of *Microcyclus ulei* in Brazil, *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Vol. 33, pp. 1-8.
- GARCÍA, D.; TROISPOUX, V.; GRANCE, N.; RIVANO, F.; & AUZAC, D. (1999). Evaluation of the Resistance of 36 *Hevea* Clones to *Microcyclus ulei* and Relation to Their Capacity to Accumulate Scopoletin and Lignins. *European Journal of Forestal Pathology*, Vol. 29, pp. 323-338.
- GASPAROTTO, L.; LIMA, M. I. P. M.; PEREIRA, J. C.R.; y DOS SANTOS, A. F. (1990). *Enfermidades da seringueira no Brasil*. Manaus: Embrapa. Circular técnica Núm. 3, p. 169.
- GASPAROTTO, L.; & LIMA, M. I. P. M. (1991). Research on South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of Rubber in Brazil. Review Article. *Indian J. Nat. Rubb.* Vol. 4, No. 2, pp. 83-90.
- GASPAROTTO, L. F.; DOS SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. (1997). *Doenças da seringueira no Brasil*. Brasília: Embrapa-SPI.
- GASPAROTTO, L.; ZAMBOLIM, L.; MAFFIA, L. A.; RIBEIRO, F. X.; JUNQUEIRA, N. T. V. (1989). Efeito da temperatura e umidade sobre a infecção de seringueira (*Hevea spp.*) por *Microcyclus ulei*, *Fitopatología Brasileira*, Vol. 14, No. 1.
- GÓMEZ, D.; y LÓPEZ, B. (2002). *Respuesta del caucho (Hevea brasiliensis) a la aplicación del bioinsumo orgánico Biofun estrella en el control del mal suramericano de la hoja (Microcyclus ulei)*. Tesis. Universidad de la Amazonia. Florencia, Caquetá, Colombia. 16-39 p.
- GONÇALVES, P. S. (1986). Melhoramento genético da seringueira (*Hevea sp.*). En: Simpósio sobre a cultura da seringueira no Estado de São Paulo. Piracicaba-SP Anais. Campinas: Fundação Cargilí. 95-123p.
- HASHIM, I.; CHEE, K. H.; & DUNCAN, E. J. (1978). Reaction of *Hevea* Leaves to Infection with *Microcyclus ulei*. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Vol. 26, No. 2, pp. 67-75.
- HASHIM, I.; DE ALMEDIA, L. C. C. (1987). Identification of Races and in Vitro Sporulation of *Microcyclus ulei*, *Journal of Natural Rubber Research*, Vol. 2 No. 2, pp.111-117.
- HASHIM, I.; & PEREIRA, J. C. (1989). Lesion Size, Latent Period and Sporulation on Leaf Discs as Indicators of Resistance of *Hevea* to *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research*, Vol. 4, No. 11, pp. 56-65.
- HALLÉ, F.; OLDEMAN, R. A. A.; TOMLINSON, P. B. (1978). *Tropical Trees and Forest*. Berlin: Springer-Verlag.
- HOLLIDAY, P. (1970). South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis*. *Phytopathological Papers*, Vol. 12, pp. 1-31.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L.; ROMEIRO, R. DA, S.; & GASPAROTTO, L. (1984). Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres*, Vol. 31, pp. 322-331.
- JUNQUEIRA, N. T. V. (1985). *Variabilidade fisiologica do Microcyclus ulei (P. Henn.) v. Arx. Viçosa, U. F. V.* Tese D. Sc. Imprensa Universitaria.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; Zambolin, G. M.; & Gasparoto, L. (1986). Esporulação "Invitro", viabilidade dos conídios e patogenicidade de *Microcyclus ulei*. *Fitopatología Brasileira*, Vol. 11, No. 2, p. 667.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; Filho, A. N.; y Trindade, D. R. (1987). Factores relacionados com a resistencia da seringueira ao mal das folhas. Vol. 54, pp. 1-6.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; Laércio, Z.; Geraldo, M. C.; Alcelio, C.; y Gasparoto, L. (1988). Reacao de clones de seringueira a

- vários isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Vol. 23, No. 8, pp. 877-893.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; Gasparotto, L.; Lieberei, R.; Normando, M. C. S.; y Lima, M. I. (1989). Especialização fisiológica de *Microcyclus ulei* em diferentes espécies de seringueira: identificação de grupos de patótipos. *Fitopatologia Brasileira*, Vol. 14, Núm. 2, p.147.
- LANGFORD, M. H. (1945). South American Leaf Blight of *Hevea* Rubber Tree. *Tech. Bull.* Vol. 882. Washington: Dept. Agric., pp. 31.
- LE GUEN, V.; García, D.; Mattos, C.; & Clement, A. (2002). Evaluation of Field Resistance to *Microcyclus ulei* of a Collection of Amazonian Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*.
- LEAL, F. (1999). *Impactos actuales y potenciales de las enfermedades de los cultivos perennes de la Amazonia y posibilidades de control para el desarrollo sostenible de la región*. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaría Pro Tempore. Caracas, Venezuela.
- LIEBEREI, R.; Schrader, A.; Biehl, B.; & Chee, K. H. (1983). Effect of Cyanide on *Microcyclus ulei* Cultures. *Journal of the Rubber Research*, Institute of Malaysia. Vol. 31, No. 3, pp. 227-235.
- LIEBEREI, R. (2007). South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication Using Physiological Features and Molecular Markers. Invited Review. *Annal of Botany*, pp. 1-18.
- MATTOS, C. R. R. (1999). Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. (Resumo). *Fitopatologia Brasileira*, Vol. 24, pp. 470.
- MATTOS, C. R.; GARCÍA, D.; PINARD, F.; LE GUEN, V. (2003). Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste de Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, Vol. 28, Núm. 5, pp. 502-507.
- MATTOS, C. R. R. (2007). Programa de melhoramento genético de clones de seringueira com resistência ao fungo *Microcyclus ulei*. En: *Memórias I Congresso Brasileiro de Heveicultura. Borracha Natural*. INCAPER. Guarapari-Es, Brasil.
- MILLER, J. W. (1966). Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei*. *Plant Disease Reporter*, Vol. 50, pp.187-190.
- PARLEVLIET, J. E. (1979). Components of Resistance that Reduce the Rate of Epidemic Development. *Annual Rev. Phytopathol*, Vol. 17, pp. 203-222.
- PERALTA, A. M.; FURTADO, E. L.; MENTEN, J. O. M.; y FILHO, A. B. (1990). Melhoramento para resistência ao mal das folhas da seringueira. Revisao. *Summa Phytopathologica*. Vol. 26. 11 p.
- REBOUÇAS-LINS, A. C. L.; ATAIDE-BRITO, P. F. (1981). Avaliação de sete clones de seringueira quanto a resistência ao mal das folhas (*Microcyclus ulei* (P. Henn) V. Arx.). *Fitopatologia Brasileira*, Vol. 6, pp. 509-513.
- RIVANO, F. (1992). *La maladie Sud-Américaine des feuilles de l'Hevea. Etudes en conditions naturelles et contrôlées des composants de la résistance partielle à Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. Thèse, Doct., University of Paris-Sud.
- _____. (1997). *La maladie Sud-Américaine des feuilles de l'Hevea. I. Variabilité du pouvoir pathogène de Microcyclus ulei. Plantations, recherche, développement*, Vol. 4, pp. 104-110.
- SAMBUGARO, R. (2003). *Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (Hevea spp.) visando resistência ao Microcyclus ulei*. Tese (Mestre). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Botucatu sp. 61p.
- SCHRADER, A. (1980). Cyanideinfluss auf sporenkeimung und mycelentwicklung bei *Microcyclus ulei*, dem Erreger der sudamerikanischen Blatt-Krankheit auf *Hevea*. *Braunschweig, Botan. Inst. Tu.* 54p.
- SCHUBERT, K.; RITSCHER, A.; BRAUN, U. A. (2003). Monograph of *Fusicladium* lat. (Hyphomycetes). *Schlechtendalia*. Vol. 9, pp. 353-356.
- STNC, SECRETARÍA TÉCNICA CADENA DEL CAUCHO. (2009). *Comportamiento del caucho natural en Colombia y el mundo*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas.
- SIMMONDS, N. W. (1990). Breeding Horizontal Resistance to South American Leaf Blight of Rubber. *J. nat. Rubb. Res.*, Vol. 5, No. 2, pp. 102-113.