

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR DE CLONES DE
SERINGUEIRA (*Hevea spp.*) VISANDO RESISTÊNCIA AO
*Microcyclus ulei***

ROSANA SAMBUGARO

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

BOTUCATU-SP
Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA FOLIAR DE CLONES DE
SERINGUEIRA (*Hevea spp.*) VISANDO RESISTÊNCIA AO
*Microcyclus ulei***

ROSANA SAMBUGARO

Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

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

BOTUCATU-SP
Fevereiro - 2003

A DEUS

Pela presença em todos
os momentos da minha vida.

Aos meus pais

ELZA e CLAUDINÊ SAMBUGARO, pelo incentivo, apoio e
dedicação total na minha formação profissional e pessoal.

A minha irmã CRISTIANE por todo apoio
e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Edson Luiz Furtado**, pela amizade, orientação e ensinamentos transmitidos durante todo trabalho.

Ao Prof. Dr. **Roberto Antonio Rodella**, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu, pela amizade, paciência e orientação, desde do início à finalização, deste trabalho.

Ao amigo Engenheiro Agrônomo MSc **Carlos Raimundo Reis Mattos**, das Plantações Michelin da Bahia, pela amizade, incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Às **Plantações Michelin da Bahia Ltda.**, por ter cedido os clones, os isolados e o espaço físico para a realização das inoculações do fungo. Aos técnicos da empresa, em especial **Saulo Emílio**, pela amizade e apoio irrestrito na execução das inoculações.

Ao **Departamento** e ao **Programa de Pós-Graduação de Botânica** da Unesp-Botucatu, pela concessão de equipamentos e materiais. Ao técnico **Kleber** pela paciência e auxílio no laboratório de anatomia.

À amiga **Vanessa de Fátima Jerba** pelo companheirismo, disposição e ensinamentos das técnicas anatômicas, que foram fundamentais na condução deste trabalho.

Aos **Professores e Funcionários** do Departamento de Produção Vegetal, pelos ensinamentos e colaboração.

Ao **Ronaldo Sambugaro** pelo auxílio na diagramação das figuras.

Aos amigos **Ana Paula Lombardi, Márcia Michelle Queiroz, Márcia Cezar, César Bueno, Viviane Biazon, Alniuza** e **Christiane Aparecido**, pelo companheirismo.

Aos **amigos pós-graduandos** do curso de Botânica. À amiga **Letícia**, do curso de graduação em biologia, por compartilhar os bons momentos no laboratório de anatomia.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

O MEU MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas.....	V
Lista de Figuras.....	VII
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	2
3 INTRODUÇÃO.....	3
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4.1 O Hospedeiro.....	5
4.2 A Doença.....	6
4.3 O Patógeno.....	7
4.4 Ciclo da Doença.....	8
4.5 Fatores ligados à Resistência.....	9
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
5.1 Inoculação do patógeno.....	14
5.2 Análise anatômica dos folíolos sadios e infectados.....	16
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
6.1 Análise anatômica dos folíolos sadios.....	18
6.2 Análise anatômica dos folíolos infectados.....	46
6.3 Considerações finais.....	52
7 CONCLUSÕES.....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Parentais dos quatro clones de seringueira (<i>Hevea</i> spp.): PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784.....	16
2. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, para a diferenciação entre três estágios foliares (B ₂ , C, D) dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180, Fx 2784) de seringueira.....	28
3. Correlação entre os nove caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), dos três estágios foliares, dos quatro clones de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂).....	29
4. Intervalos de limite inferior (Li) e superior (Ls) dos caracteres anatômicos quantitativos com maior poder discriminatório para Y ₁ e Y ₂ de cada estágio foliar (B ₂ , C e D), independentemente do clone.....	33
5. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar B ₂ , dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.....	36
6. Correlação entre os oito caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar B ₂ , dos quatro clones de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂).....	37
7. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar C, dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.....	39

	Página
8. Correlação entre os oito caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar C, dos quatro clones de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂).....	40
9. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar D, dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.....	43
10. Correlação entre os nove caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar D, dos quatro clones de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂).....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Câmara úmida com diversos boxes separados, onde são controladas a umidade, temperatura e luminosidade.....	15
2. Detalhe de um Box da câmara úmida, com uma planta de seringueira inoculada.....	15
4 a 7. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio B ₂ , de quatro clones de seringueira. 4. Clone PB 235; 5. Clone PB 314; 6. Clone MDF 180; 7. Clone Fx 2784.....	19
8 a 11. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio C, de quatro clones de seringueira. 8. Clone PB 235; 9. Clone PB 314; 10. Clone MDF 180; 11. Clone Fx 2784.....	23
12 a 15. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio D, de quatro clones de seringueira. 12. Clone PB 235; 13. Clone PB 314; 14. Clone MDF 180; 15. Clone Fx 2784.....	24
16 a 19. Secções transversais da nervura central, no estágio B ₂ , de quatro clones de seringueira. 16. Clone PB 235; 17. Clone PB 314; 18. Clone MDF 180; 19. Clone Fx 2784.....	25
20 a 23. Secções transversais da nervura central, no estágio C, de quatro clones de seringueira. 20. Clone PB 235; 21. Clone PB 314; 22. Clone MDF 180; 23. Clone Fx 2784.....	26
24 a 27. Secções transversais da nervura central, no estágio D, de quatro clones de seringueira. 24. Clone PB 235; 25. Clone PB 314; 26. Clone MDF 180; 27. Clone Fx 2784.....	27
28. Dispersão gráfica dos três estágios foliares (B ₂ , C, D) dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784), utilizando os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂), para o conjunto dos nove caracteres anatômicos quantitativos da folha.....	30

	Página
29. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os três estágios foliares (B ₂ , C e D) dos quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180).....	31
30. Estágio foliar B ₂ , o qual representa a fase de infecção pelo patógeno.....	32
31. À esquerda: lesões de esporulação conidial na face abaxial e adaxial dos folíolos, no estágio C. À direita: detalhe das lesões na face abaxial do folíolo.....	32
32. Detalhe dos estromas na face adaxial do folíolo, no estágio D.....	32
33. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar B ₂ , utilizando os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂), para o conjunto dos oito caracteres anatômicos quantitativos da folha.....	38
34. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180), no estágio foliar B ₂	38
35. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar C, utilizando os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂), para o conjunto dos oito caracteres anatômicos quantitativos da folha.....	41
36: Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180), no estágio foliar C.....	41
37. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar D, utilizando os dois primeiros componentes principais (Y ₁ e Y ₂), para o conjunto dos nove caracteres anatômicos quantitativos da folha.....	45

	Página
38. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180), no estágio foliar D.....	45
39 a 42. Secções transversais da lesão foliar causada aos cinco dias após a inoculação do patógeno.....	48
43 a 46. Secções transversais da lesão foliar causada aos 10 dias após a inoculação do patógeno.....	49
47 a 50. Secções transversais da lesão foliar causada aos 45 dias após a inoculação do patógeno. 47. PB 314 com alteração no parênquima paliçádico na região do estroma; 48. PB 314; 49. MDF 180 com degeneração dos tecidos e presença de fenóis; 50. MDF 180.....	50
51 a 54. Secções transversais da lesão foliar causada aos 90 dias após a inoculação do patógeno. 51. PB 314 com alteração no parênquima paliçádico na região do estroma; 52. PB 314; 53. MDF 180 com formação de células estromáticas, degeneração dos tecidos e presença de fenóis; 54. MDF 180...	51

1 RESUMO

O mal das folhas é um dos mais sérios problemas patogênicos da seringueira no Brasil, sendo uma constante ameaça para as plantações do Oriente, principalmente Tailândia, Indonésia e Malásia, países responsáveis por 90 % da produção mundial de borracha natural. Esta doença causa desfolhamentos sucessivos às plantas em materiais suscetíveis, reduzindo a produção de látex e acarretando na mortalidade das plantas adultas. O objetivo do presente trabalho foi: caracterizar a anatomia foliar em três estágios fenológicos nos clones de seringueira PB 314, PB 235, MDF 180 e Fx 2784; aspectos anatômicos envolvidos com a patogênese do *Microcyclus ulei* em três clones (PB 314, PB 235 e Fx 2784) avaliados aos 5, 10, 45 e 90 dias após inoculação. Foi possível classificar três estágios (B, C e D) de acordo com os aspectos anatômicos. Verificou-se que PB 314 possibilitou o completo desenvolvimento do fungo nas fases assexual e sexual; MDF 180 apresentou alta concentração de compostos fenólicos no mesófilo, ausência da ascogênese e maior tempo da esporulação conidial que em PB 314; Fx 2784 apresentou maior espessura da epiderme da face abaxial, no estágio foliar B, que os outros clones, podendo ser considerada um fator de resistência anatômica à infecção e colonização pelo fungo.

ANATOMIC CHARACTERIZATION OF LEAVES IN RUBBER TREE CLONES AND RESISTANCE TO *Microcyclus ulei*. Botucatu, 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ROSANA SAMBUGARO

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2 SUMMARY

The South American leaf blight is the most serious disease of rubber tree: is currently a serious threat to many regions of rubber plantation of the world, particularly in Indonesia, Thailand and Malaysia, responsible for 90% of natural rubber; and was the most important single factor in the complete failure of attempts to cultivate rubber in the North region of Brazil. This disease caused successive defoliation in susceptible materials reducing the latex production and the plants death after third defoliation. The aim of this work was: a) To characterize the leaflets anatomy in three phenologic stage in four rubber tree clones: PB 314, PB 235, MDF 180 and Fx 2784; b) Anatomical aspects involved with pathogenesis of *Microcyclus ulei* in three clones (PB 314, MDF 180 and Fx 2784) evaluated on 5, 10, 45 and 90 days after inoculation. It was possible classified 3 leaves stages (B, C and D) according to anatomical aspects. In PB 314 it was possible the complete fungus development in asexual and sexual stage, MDF 180 showed phenolic compounds concentration in the mesophyll and the fungus ascogonise it was not possible, but the conidial sporulation was longer than PB 314; Fx 2784 has more larger thickness epidermic of abaxial surface in the B stage than the other clones, contributed with important anatomic factor of resistance to infection and colonization by fungus.

3 INTRODUÇÃO

O mal das folhas da seringueira, causado pelo fungo ascomiceto *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, é o principal problema dos seringais de cultivo da América Latina (Gasparotto et al., 1984), não só pela magnitude dos danos causados à produção como, principalmente, pela frequência com que estes danos ocorrem (Bergamin Filho & Amorim, 1996). No Brasil está presente em todos os Estados onde é cultivada, com danos significativos na Região Norte, no sudeste da Bahia e em alguns municípios dos estados de Mato Grosso (Gasparotto & Ferreira, 1989), São Paulo e Paraná (Silveira & Furtado, 1995) e Espírito Santo (Gasparotto et al., 1997).

Por ser um patógeno altamente ameaçador, devido a sua rápida disseminação, alta capacidade de causar danos, alta adaptação e difícil controle, a utilização de clones resistentes e produtivos é a medida mais eficiente de controle da doença. De acordo com Gonçalves et al. (2001), a abertura de novas fronteiras para a cultura da seringueira aumenta ainda mais as preocupações relativas ao limitado número de clones plantados sujeitos à vulnerabilidade, necessitando da ampliação do programa de melhoramento genético. Porém, existem poucos estudos visando a obtenção de resistência, como os realizados pelo Instituto Agrônomo de Campinas para a Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo (Gonçalves et al., 2000) e os realizados pelas Plantações Michelin em parceria com o CIRAD (Centro de Cooperação Internacional de Pesquisas Agrônomicas para o Desenvolvimento).

Em relação à fase estromática do fungo, a literatura revela que há escassez de estudos. Esta fase além de constituir fonte de inóculo primária e de proteção do fungo em estações desfavoráveis, ela também é produzida durante a fase epidêmica da doença, apresentando assim grande importância. Bergamin Filho (1982) afirma que a redução do inóculo inicial, ou seja, da fase estromática do fungo, é a única solução econômica disponível para os produtores no controle da doença.

Alguns estudos anatômicos (Blazquez & Owen, 1963; Sanier et al., 1992; Garcia, 1995; Garcia et al., 1995; Garcia et al., 1999) mostraram que clones resistentes e suscetíveis comportaram-se de maneira diferente após a penetração do fungo; os clones resistentes produzem rapidamente um material amarelo intracelular que parece impedir o progresso da infecção e, conseqüentemente, a formação da fase sexual, fato esse que não ocorre em clones suscetíveis.

Devido a esses diferentes comportamentos de clones em resposta à infecção pelo fungo e aos poucos trabalhos encontrados na literatura, há a necessidade de estudar mais detalhadamente os aspectos anatômicos ligados à resistência de clones de seringueira ao *Microcyclus ulei*, podendo-se ampliar os conhecimentos para serem incorporados aos futuros programas de melhoramento genético.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar comparativamente, em diferentes épocas de coleta, a anatomia dos folíolos sadios e infectados (desde a fase conidial até a estromática) dos clones de seringueira (*Hevea* spp.) PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784 ao mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*), visando identificar possíveis características anatômicas relacionadas com a resistência a esse patógeno.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O Hospedeiro

A seringueira tem como habitat natural a Região Amazônica, onde existem dez espécies no Brasil das onze conhecidas (Gasparotto et al., 1997). Botanicamente, a seringueira é uma dicotiledônea monóica do gênero *Hevea* pertencente à família Euphorbiaceae, sendo todas as espécies lenhosas e arbóreas. Possui flores unissexuais e suas folhas são longamente pecioladas e compostas trifolioladas.

As plantas adultas deste gênero apresentam um período de senescência e queda das folhas, geralmente, no início da estação seca. O conhecimento do hábito fenológico, como a maneira e o período de reenfolhamento dos seringais, é a fase mais importante para a fitopatologia, pois é nesse período que a seringueira apresenta folíolos com coloração antociânica intensa, nos quais ocorre a grande maioria dos ataques das doenças foliares (Gasparotto et al., 1997).

De acordo com Hallé et al. (1978), o ciclo da ontogenia foliar compreende quatro fases, relacionadas com o nível de atividade do meristema apical e com as fases de desenvolvimento foliar:

Estádio A – gema apical anteriormente em repouso, em atividade de divisão celular e morfogênese (formação de primórdios foliares e de gemas axiliares). Esse estágio dura, em média nove dias.

Estádio B – fase de alongamento. A atividade mitótica no meristema apical propriamente dita reduz a partir da fase inicial do alongamento. Esse estágio dura, em média, dez dias e apresenta dois subestádios:

B₁ – folíolos na posição vertical com o ápice voltado para cima, fortemente carregados com antocianina.

B₂ – ápices dos folíolos voltados para baixo, coloração antociânica menos intensa. Esta é a fase de maior velocidade de alongamento do eixo caulinar.

Estádio C – folíolos pendentes, flácidos e de cor verde. A duração é de cerca de oito dias.

Estádio D – fase de dormência da gema apical com folhas totalmente amadurecidas. Esta fase dura geralmente treze dias sob condições normais de crescimento ativo.

A descrição anatômica foliar da família Euphorbiaceae é caracterizada por Metcalfe & Chalk (1957), revelando a ocorrência de uma epiderme contendo células com paredes anticlinais retas ou sinuosas e, epiderme da face abaxial muitas vezes, com papilas em algumas espécies. Os estômatos, geralmente, ocorrem na face abaxial, raramente na adaxial. No mesofilo aparece uma camada de células paliçádicas debaixo da epiderme da face adaxial, e várias camadas constituindo o tecido parenquimático lacunoso. Os feixes vasculares são colaterais acompanhados por um anel descontínuo de fibras com intensa lignificação.

4.2 A Doença

O mal-das-folhas da seringueira (*Hevea* spp.), ou queima sul-americana das folhas ou ainda “South American Leaf Blight” (SALB) nos países de língua inglesa, é considerada uma das principais causas de fracassos de seringais de cultivo no Brasil (Gasparotto et al., 1984; Silveira & Furtado, 1995) e em outros países da América do Sul e Central (Gasparotto et al., 1997). Causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, essa doença se manifesta em folhas novas, sob a forma de pequenas manchas necróticas, circulares, com pontuações pretas no centro, constituídas pelos órgãos de frutificação do fungo (Bergamin & Cardoso, 1980). Especialmente nas superfícies abaxiais, essas lesões apresentam tonalidades e aspecto verde-oliva-feltroso, ou cinza-esverdeado-feltroso, ou escuro-feltroso resultantes da esporulação conidial da primeira fase assexuada ou anamórfica do *M. ulei* (Gasparotto et al., 1997), causando a queda prematura dos folíolos (Santos, 1992).

Em condições favoráveis à ocorrência do mal-das-folhas, como a umidade do ar superior a 95% por 10 h consecutivas, durante um período de, pelo menos, 12 noites por mês, e regiões sujeitas a períodos prolongados de orvalho, neblina ou chuvas leves, como áreas de baixadas (Camargo et al., 1967), as lesões crescem e a planta pode perder totalmente a folhagem. Nessas condições e em clones altamente suscetíveis, infecções e reinfecções do patógeno em folíolos jovens podem causar desfolhamentos sucessivos, ocasionando o secamento de terminais de hastes e de galhos e, conseqüentemente, morte descendente de plantas (Gasparotto et al., 1997).

Nos viveiros e jardins clonais, a elevada incidência da doença causa atraso no crescimento, redução do número de plantas em condições de serem enxertadas e diminuição de aproveitamento de borbulhas para enxertia em épocas apropriadas (Gasparotto et al., 1990).

No Brasil, o mal-das-folhas ocorre em todos os Estados onde a seringueira é cultivada, com danos significativos na Região Norte, no sudeste da Bahia e em alguns municípios do Estado do Mato Grosso (Gasparotto & Ferreira, 1989), Espírito Santo (Gasparotto et al., 1997), e no Estado de São Paulo, no município de Jacupiranga, com coordenadas de 24 ° 48' S (Trindade & Furtado, 1997).

4.3 O Patógeno

O fungo *Microcyclus ulei* pertence ao filo Ascomycota e à família Dothideaceae. Apresenta ciclo biológico completo na seringueira (Brignani Neto et al., 1991) e produz dois tipos de esporos infectivos durante a fase epidêmica da doença, conforme a reprodução: conidiósporos (reprodução assexuada ou fase anamórfica) e ascósporos (reprodução sexuada ou fase telimórfica), de acordo com Silveira & Furtado (1995) e Bergamin Filho & Amorim (1996). Os conidiósporos, por serem numerosos, são os principais disseminadores do patógeno e responsáveis pela severidade da doença (Bergamin Filho & Cardoso, 1980). Os ascósporos, responsáveis pelo inóculo primário e pela via anti-horária de infecção, considerada de grande importância nas epidemias (Bergamin Filho & Amorim, 1996), são produzidos em quantidades menores e descarregados progressivamente (Bergamin Filho & Cardoso, 1980; Silveira & Furtado, 1995), permanecendo viáveis no interior de

estruturas nas folhas retidas na copa por muitos dias (*Furtado). De acordo com Chee (1980), os dois tipos de esporos têm grande importância, mas desempenham diferentes papéis na epidemiologia da doença.

Segundo Gasparotto & Ferreira (1989) e Gasparotto et al. (1997), a fase anamórfica ou assexuada é representada pela formação de conidióforos simples, eretos ou geniculados, medindo até 140 x 47 μm . Os conídios variam de retos a sinuosos ou em forma de saca-rolha ou de vagem de amendoim e podem ser uni (15-43 x 5-9 μm) ou bicelulares (23-63 x 5-10 μm). A fase telimórfica ou sexuada é produzida em ascostromas na superfície dos folíolos. Segundo Furtado (1996), os ascos são bitunicados, clavados com oito ascósporos, os quais são hialinos, irregularmente elipsoidais a fusóides, bicelulares, com suave constrição nos septos que divide os ascósporos em duas células desiguais, medindo 12-20 x 2-5 μm .

4.4 Ciclo da Doença

Para Bergamin Filho & Amorim (1996), o fitopatossistema tropical, diferentemente do temperado, apresenta duas vias de infecção do patógeno, horária e anti-horária. A primeira é responsável pelo aumento de novas lesões, comum a todos os fitopatossistemas, e a segunda pelo crescimento das lesões existentes, ou seja, sítios doentes podem gerar novos sítios doentes através da infecção dos sítios adjacentes àqueles previamente doentes. Os autores, ainda descrevem que *Microcyclus ulei* parece apresentar, além da via anti-horária de infecção, dois tipos de via-horária (sexual e assexual). Isso permite uma maior flexibilidade de comportamento, ignorando muitas restrições climáticas e possibilitando severas epidemias.

O fungo desenvolve sua fase conidiana, a partir do ascósporo ou conídio, nos folíolos novos, num período que varia de 5 a 16 dias (Junqueira et al., 1988). Essa infecção conidial é considerada a fase explosiva da epidemia pela quantidade de conídios e, conseqüentemente, pela facilidade de disseminação dos mesmos através do vento ou chuva, infectando outros folíolos novos da mesma planta ou de plantas diferentes (Gasparotto et al., 1997).

* FURTADO, E.L. (Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Campus de Botucatu). Comunicação pessoal, 2003.

A fase ascógena (sexuada), mais demorada, desenvolve-se nos folíolos maduros ou velhos que permanecem na planta, num período de um a quatro ou cinco meses (Chee, 1976; Medeiros, 1976) e tem papel importante na sobrevivência do patógeno de um ano para outro. Portanto, os ascósporos são importantes no início, como fonte de inóculo primário, e no prolongamento do ataque (Brignani Neto et al., 1991). Esses folíolos maduros, com estromas negros que abrigam os ascósporos, caem no chão e quando molhados por chuva ou orvalho aumenta a tensão interna dos ascostromas que contêm os ascos, resultando na ejeção de ascósporos, os quais são disseminados pelo vento (Gasparotto et al., 1997), infectando novamente os folíolos novos.

Chee (1976b) revelou que os ascósporos apresentam-se abundantes durante a madrugada em dias secos e durante todo o dia em períodos chuvosos, enquanto que os conídios apresentam picos de concentrações em torno de meio-dia nos dois períodos (seco e chuvoso); a alta insolação diária também influencia na concentração de ascósporos, diminuindo-a. Rocha & Vasconcellos Filho (1978) confirmam que a maior quantidade de ascósporos liberados no ar ocorre durante a noite e no período da manhã.

De acordo com Gasparotto et al. (1997), pode-se estimar o ciclo de vida do patógeno em quatro a cinco meses; começa com as infecções dos folíolos novos, aparecendo os sintomas cerca de quatro a dez dias depois das infecções e mais dois meses para a total formação de estromas.

4.5 Fatores ligados à Resistência

As plantas apresentam vários tipos de resistências, podendo ter natureza estrutural e/ou bioquímica, presentes antes ou depois da infecção, sendo respectivamente, pré-formadas ou pós-formadas (Agrios, 1997).

Chee (1976a) demonstrou que a resistência de clones de seringueira é mais bem quantificada pelo tamanho da lesão do que pela esporulação do patógeno em si. De acordo com Bergamin Filho & Amorim (1996), o crescimento da lesão parece ser o ponto principal no controle das doenças foliares importantes nos trópicos e subtropicais, porque o patógeno tem a capacidade de conquistar as áreas ao redor da lesão inicial, exigindo menos das condições climáticas, não ficando na dependência de novas infecções para continuar a

produzir esporos. Portanto, os patógenos do fitopatossistema tropical têm sua estratégia na via anti-horária (para *M. ulei* é a ascogênese) e essa é considerada sempre uma auto-infecção, tornando a resistência vertical de pouca importância. Uma redução dessa via tem um efeito muito maior que uma redução na quantidade de esporos produzidos (via horária de infecção). Outro fator de grande importância relatado pelos autores em climas tropicais e subtropicais é a continuidade do inóculo entre as estações de cultivo, nessa fase o potencial de inóculo mantém-se alto.

As pesquisas sobre substâncias produzidas pela seringueira, que desempenham função na resistência da planta ao *M. ulei*, começaram em meados dos anos 60 (Gasparotto et al., 1997).

Blasquez & Owen (1963) foram os primeiros a demonstrar a presença de taninos próximos a lesões não desenvolvidas em folhas de clones resistentes.

Outro composto fenólico considerado no mecanismo de defesa é a lignina. Friend et al., Moerschbacher et al. e Reimers & Leach, citados por Garcia et al. (1995b), constataram que a lignina pode estar associada com a reação de hipersensibilidade; ela pode agir como uma barreira mecânica entre hospedeiro e patógeno, protegendo as paredes das plantas da hidrólise fúngica e limitando a troca de água e nutrientes. Observações histológicas realizadas pelo autor mostraram que esporulação do fungo foi envolvida por barreiras de ligninas e que estruturas estromáticas contendo os ascósporos foram produzidas ao redor de tecidos necróticos, sobre os tecidos cloróticos, ou seja, ao redor das necroses.

Garcia et al. (1999) sugerem que os clones possuem capacidades diferentes de lignificar suas lesões, apresentando grau de resistência. Clones com resistência parcial apresentam maior acúmulo de lignina ao redor das lesões grandes que os clones totalmente resistentes. A lignina, provavelmente, mostra um menor papel em reação de defesa em clones totalmente resistentes porque estes apresentam uma produção dominante de fitoalexina na reação de hipersensibilidade. Ao contrário, a lignificação intensiva pode ser responsável pela presença do fungo dentro da zona necrótica em clones parcialmente resistentes. Neste caso, conclui-se que o ciclo do fungo, com o estabelecimento da forma sexual ao redor dessa zona 15 dias depois da infecção nos clones mais suscetíveis, é retardada ou parada em clones que apresentam forte lignificação (Garcia et al., 1995b). Ainda, a ausência do acúmulo de lignina e escopoletina está, frequentemente, associada com os

sintomas mais severos da doença, sugerindo uma participação destes compostos na resistência (Garcia et al., 1999).

Segundo Gasparotto et al. (1997), estudos realizados sugerem que os fenóis e particularmente os flavonóides kaempferol e/ou quercetina podem estar envolvidos em mecanismos de resistência ao *M. ulei*. Estes, ou inibem a germinação dos patógenos ou modificam a atividade do ácido indol acético oxidase (AIA oxidase), atuando, assim, sobre a regulação das auxinas. Os fenóis agem sobre a germinação dos esporos e crescimento das hifas.

A produção de fenóis após infecção por um patógeno é bem documentada em plantas herbáceas (Uritani; Tal & Robeson e Rouxel, citados por Garcia et al., 1995b), mas menos em plantas lenhosas (Gottstein & Gross, citados por Garcia et al., 1995). Os efeitos fungitóxicos dos fenóis e o grande número em clones resistentes indicam um papel ativo no mecanismo de defesa das plantas (Garcia et al., 1995).

Para Blasquez & Owen (1963) e Hashim et al. (1978), a cutícula não representa uma barreira na penetração de *M. ulei*, mesmo em folhas velhas como em folhas jovens de clones resistentes. Sanier et al. (1992) concluíram que a resistência parece não ser uma barreira anatômica, mas sim, devido a fatores bioquímicos. Segundo os mesmos autores, os fenóis contribuem para resistência de fungos fitopatogênicos em diversos caminhos, como: inibidor na germinação conidial, quando os fenóis estão presentes antes da infecção; participando da reação de hipersensibilidade, quando os fenóis oxidados, de coloração marrom, aparecem durante a reação; precursores de lignina, contribuindo para a resistência das paredes das células. Conforme Sanier et al. (1992), muitas fitoalexinas são fenólicas, e quando os compostos fenólicos não apresentam papel ativo na resistência, eles possivelmente são usados como marcadores de resistência ou de suscetibilidade.

Há um número interessante de indicações surgidas a respeito de muitos compostos fenólicos e diferentes proporções dos vários grupos de fenóis presentes nas folhas, mas, na verdade, determinado composto fenólico é frequentemente mais abundante em clones suscetíveis e outros, mais abundante em clones resistentes (Sanier et al., 1992), ou seja, o importante são as diferenças quantitativas dos compostos fenólicos e não a natureza dos compostos fenólicos constituintes dos vários clones ou espécies de *Hevea*.

O primeiro relato de uma reação de defesa ativa em seringueira foi descrito por Tan & Low, citados por GARCIA et al. (1995a), os quais estabeleceram uma fitoalexina azul fluorescente, em luz ultravioleta (UV), na reação de resistência para *Colletotrichum gloeosporioides*. Essa fitoalexina, derivada da cumarina, foi, mais tarde, identificada como escopoletina (Giesemann et al., 1986). Trabalhos relatados por Garcia et al. (1995a) mostram que a presença da escopoletina tem sido frequentemente detectada em plantas como resposta ao ataque por vírus (Andreae & Andreae), bactérias (Sequeira) e fungos (Minamikawa et al., Tan & Low, Tal & Robeson e El Modafar et al.). Esta fitoalexina está relacionada com o mecanismo de reação de hipersensibilidade incompatível, descrito por Lieberei et al. (1989). A reação é representada por pequenas lesões necróticas que, quando observadas com luz UV apresenta um halo fluorescente azul ao redor das lesões (Gasparotto et al., 1997).

Duas fases de acúmulo de escopoletina foram observadas por Garcia et al. (1995) durante o processo de infecção por *M. ulei*.

A primeira (de 0 a 24 h), foi característica para os clones mais resistentes (por exemplo, Fx 2261 e Fx 4098) e corresponde ao desenvolvimento inicial do fungo (germinação e diferenciação do apressório), levando, após 24 h da inoculação, à penetração dos tecidos da epiderme. Reações da célula durante este período foi caracterizada pelo colapso da camada epidérmica em clones com resistência total e de camadas subepidérmicas em clones com resistência parcial.

A segunda fase (24 - 72 h) caracterizou-se pelo período de crescimento micelial em tecidos foliares de clones parcialmente resistentes e em clones totalmente resistentes, sendo a acumulação de escopoletina grande e rápida neste período. Isso não ocorre em lesões de *M. ulei* de clones suscetíveis de *Hevea*, porque a produção de escopoletina por folhas infectadas é severamente inibida pela liberação do ácido cianídrico (HCN) em grande quantidade durante o processo de patogênese. Um dos fatores responsáveis por isso é a alta atividade da enzima linamarase (β -glicosidase) que atua como co-fator na síntese de HCN, desfavorecendo a reação de hipersensibilidade (Lieberei, 1981). Em clones resistentes, o HCN é liberado lentamente, em pequenas quantidades, sem inibir as reações de defesa da planta contra *M. ulei* (Gasparotto et al., 1997). Para Lieberei (1986), a pequena liberação de HCN

pode ser devido ao curto período de tempo de fixação de HCN em tecidos pela formação de hidroxinitrilos ou aminonitrilos e devido a maior eficiência de clones resistentes nas reações enzimáticas de desintoxicação do HCN.

Muitas plantas liberam HCN após dano mecânico ou químico em suas células ou ao longo de uma infecção fúngica (Myers & Fry, citados por Gasparotto et al., 1997), como mecanismo de defesa. Em *Hevea*, HCN é um fator que impede o mecanismo de defesa da planta (Gasparotto et al., 1997), além disso, *M. ulei* é tolerante ao HCN, inclusive, cresce melhor em atmosfera que contém HCN (Lieberei et al., 1983).

Apesar dos aspectos positivos relatados sobre os compostos fenólicos, os resultados apresentados por Sanier et al. (1992) parecem mostrar que compostos fenólicos não desempenham papel principal na resistência de folhas jovens de *Hevea*, mas devem estar envolvidos na indução do mecanismo de resistência. Hashim (1986) observou que a resistência fica localizada na “zona induzida” e pode, por isso, ser causada pelo colapso da célula do hospedeiro ou pela produção de fitoalexina.

Rivano et al., citado por Berger (1992), afirmam que os numerosos fracassos na seleção genética de clones de seringueira resistentes a *M. ulei* são devidos à seleção de indivíduos com resistência vertical, sendo, por isso, indispensável identificar o máximo possível de componentes ligados à resistência, o que poderia conferir à planta um nível de resistência horizontal satisfatório.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em laboratório, câmara úmida e casa de vegetação da Plantações Michelin da Bahia Ltda. e do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, UNESP. O estudo anatômico foi realizado no Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

O isolado utilizado nas inoculações, PMB 26, pertence à coleção da Plantações Michelin da Bahia, Ituberá-BA, o qual foi cultivado em meio de crescimento específico (Junqueira et al., 1984) e em meio MC 4 para esporulação (Mattos, 1999). A região da Bahia escolhida para obtenção do isolado é uma das que mais sofre no Brasil com o problema designado por mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*), o qual causa grandes prejuízos econômicos para esta cultura.

5.1 Inoculação do patógeno

A inoculação do fungo (*Microcyclus ulei*) foi realizada em câmara úmida (Figura 1 e 2) com a ajuda de um atomizador. A suspensão de inóculo foi pulverizada na face inferior dos folíolos jovens, correspondentes ao estágio B₂ descrito por Hallé et al. (1978), com temperatura variando de 23 a 26 °C e umidade superior a 95%. Após as inoculações as plantas permaneceram 24 horas no escuro, e a partir daí, até 12 dias, sob regime de 12 horas de escuro e 12 horas de luz a 2000-3000 lux. Após esse período, as plantas

foram transferidas para um viveiro com sombrite a 50% (Figura 3), onde ocorre o desenvolvimento da fase estromática.



Figuras 1 e 2. Câmara úmida com diversos boxes separados, onde são controladas a umidade, temperatura e luminosidade. Em 2, detalhe de um Box da câmara úmida, com uma planta de seringueira inoculada.



Figura 3. Viveiro com sombrite a 50 %, onde se desenvolve a fase estromática do fungo.

Foi utilizada uma suspensão de 2×10^5 conídios / mL, proveniente de lesões recém esporuladas, obtidas de clones sensíveis inoculados com isolado esporulado em meio de cultura MC 4, segundo Mattos (1999), acrescida de Tween 80 a 0,05 %.

Os materiais foliares utilizados foram provenientes dos clones de seringueira (*Hevea* spp.): PB 314, MDF 180 e Fx 2784, das Plantações Michelin da Bahia e o clone PB 235 de Botucatu. Os parentais dos clones utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Parentais dos quatro clones de seringueira (*Hevea* spp.): PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784

Clones	Parentais ¹	Origem
PB 235	PB 5/51 x PB 69	Malásia
PB 314	RRIM 600 x PB 235	Malásia
MDF 180	Clone primário	Peru
Fx 2784	F 4542 x AVROS 363	Brasil

¹ PB: Prang Besar; RRIM: Rubber Research Institute of Malaysia; F: Ford; AVROS: Algemene Vereniging Rubber Planters Oostkust Sumatra.

5.2 Análise anatômica

Para a análise anatômica foram coletados, dos clones PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784, os folíolos centrais de folhas sadias caracterizadas pelos estádios B₂, C e D, de acordo com a classificação proposta por Hallé et al. (1978). Foram tomadas amostras do terço médio da lâmina foliar e fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50 %), durante 48 horas, sendo posteriormente conservadas em álcool 70 % (Johansen, 1940).

As amostras foliares da região internervural e da nervura central foram infiltradas em resina glicol-metacrilato, seguindo-se a técnica de Gerrits (1991), sendo, em seguida, cortadas transversalmente em micrótomo rotatório automático, com 8 µm de

espessura, coradas com azul de toluidina pH 4,7 e montadas em resina sintética (O'Brien et al., 1964).

As folhas infectadas pelo patógeno foram analisadas aos 5, 10, 45, e 90 dias após a inoculação pelo fungo (*Microcyclus ulei*), sendo as amostras das regiões lesionadas coletadas do folíolo central, para observar o acompanhamento da ascogênese do fungo, procurando-se identificar as diferenças de resistência para esta fase do seu ciclo de desenvolvimento, etapa ainda não descrita na literatura consultada. Essas amostras foliares também foram fixadas em FAA 50, durante 48 horas, sendo, em seguida, conservadas em álcool 70 % (Johansen, 1940). Os demais procedimentos foram idênticos aos realizados com as folhas sadias.

Os cortes mais representativos foram fotomicrografados e as características da estrutura anatômica dos folíolos sadios e infectados foram observadas e descritas, com base no trabalho realizado por Metcalfe (1957).

Foram realizadas mensurações, com auxílio de mesa digitalizadora acoplada a programa computacional específico, dos diversos tecidos (epidérmico, parenquimático e vascular) presentes na estrutura foliar da região internervural e da nervura central de plantas sadias, determinando-se a espessura e a área abrangida por estes tecidos, uma vez que a quantificação da estrutura foliar possibilita a obtenção de resultados mais evidentes, para a comparação dos diferentes estágios foliares nos clones de seringueira estudados. A anatomia quantitativa foi efetuada com três repetições para cada clone de seringueira avaliado. A análise estatística multivariada também foi realizada separadamente para cada estágio foliar nos quatro clones de seringueira testados, PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784.

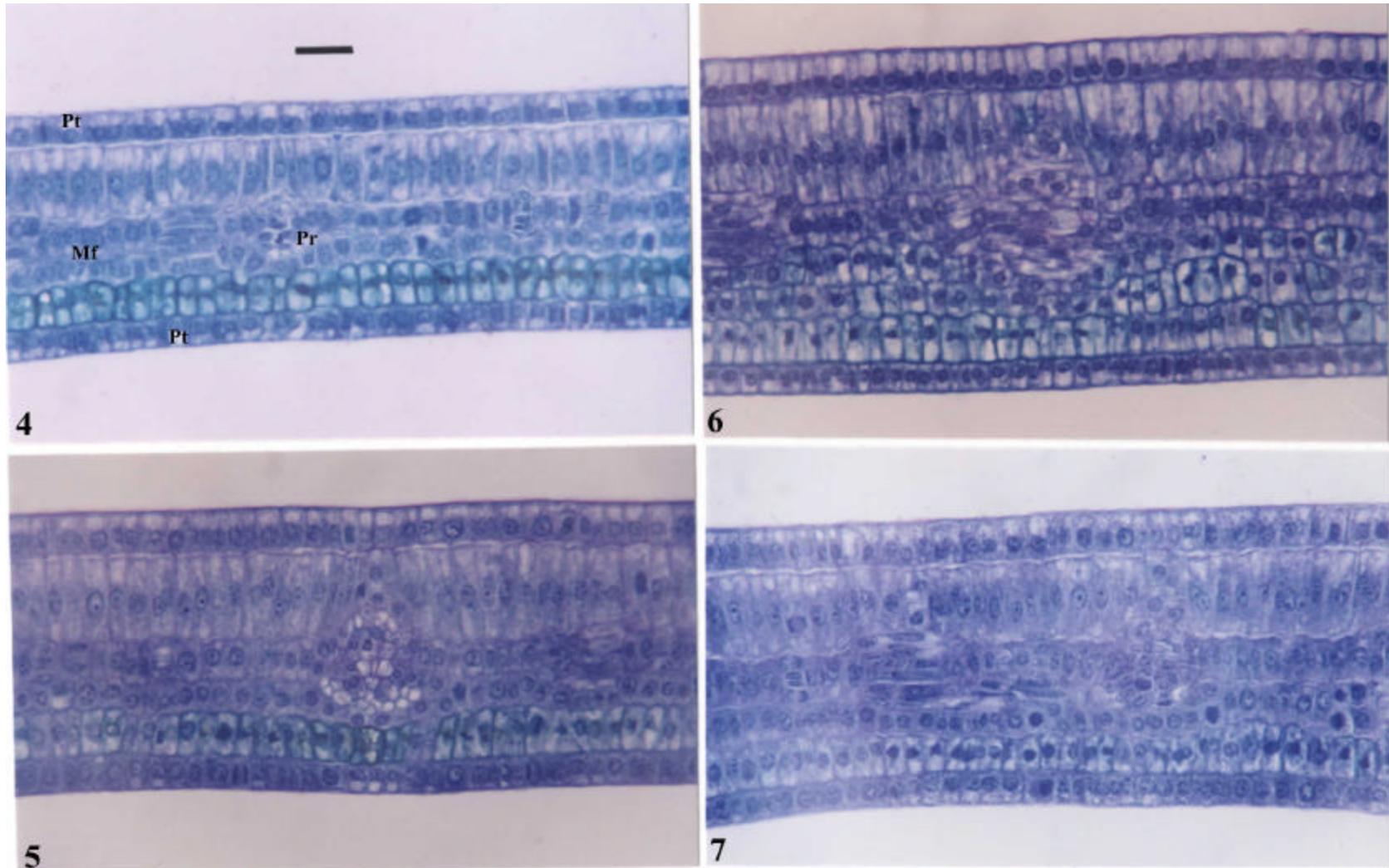
Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de Análise de Agrupamento e de Análise de Componentes Principais (Sneath & Sokal, 1973), procurando-se verificar a capacidade discriminatória das variáveis anatômicas quantitativas, obtidas pelas mensurações dos diferentes tecidos foliares.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise Anatômica dos folíolos sadios

Os três estágios foliares (B₂, C e D) de seringueira (*Hevea* spp.), propostos por Hallé et al. (1978), nos quatro clones estudados, apresentam diferenças anatômicas. As estruturas e diferenças anatômicas estão ilustradas nas Figuras 4 a 27.

As Figuras 4 a 7 representam o estágio B₂, em secções transversais da região internervural, dos clones PB 235, PB 314, MDF 180, Fx 2784. Observa-se nesse estágio, tecidos meristemáticos primários, caracterizados pela presença de células compactadas, sem espaços intercelulares, com núcleo de grande tamanho e citoplasma denso. Portanto, verifica-se a presença de protoderme, a qual originará a epiderme das faces adaxial e abaxial; meristema fundamental, dando origem ao parênquima paliçádico, lacunoso e esclerênquima; procâmbio, originando o feixe vascular primário. Esse estágio, ainda, está representado, em secções transversais da nervura central, nas Figuras 16 a 19, as quais mostram o feixe vascular, correspondendo aos elementos xilemáticos e floemáticos em início de diferenciação, com as paredes celulares dos elementos xilemáticos não lignificadas ou em início de lignificação e ausência da bainha esclerênquimática ao redor do feixe vascular.



Figuras 4 a 7. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio B₂, de quatro clones de seringueira. 4. Clone PB 235; 5. Clone PB 314; 6. Clone MDF 180; 7. Clone Fx 2784. Pt: protoderme. Mf: Meristema fundamental. Pr: Procâmbio. Barra = 22,5 µm.

Nas Figuras 8 a 11 está representado o estágio C, também em secções transversais da região internervural. Nesse estágio, os quatro clones apresentam tecidos adultos: epiderme das faces adaxial e abaxial com uma camada de células (uniestratificada), parênquima paliçádico uniestratificado, parênquima lacunoso com três a cinco camadas de células com diferentes sentidos de orientação, sendo a camada próxima da epiderme da face abaxial orientada no sentido vertical e as camadas subjacentes com disposição horizontal; feixe vascular, com elementos xilemáticos e floemáticos, ainda não totalmente diferenciado, com as paredes dos elementos xilemáticos em início de lignificação; e bainha do feixe vascular não lignificada ou em início de lignificação. O estágio C, em secções transversais da região da nervura central, está representado nas Figuras 20 a 23, mostrando, com maior detalhe, o feixe vascular, elementos xilemáticos e floemáticos, ainda em diferenciação, com as paredes celulares lignificadas nos elementos xilemáticos e a bainha em início de lignificação ao redor do feixe vascular.

O estágio D representado, em secções transversais da região internervural, nas Figuras 12 a 15, distinguiu-se do estágio anterior por apresentar o feixe vascular, elementos xilemáticos e floemáticos, mais diferenciado e a bainha descontínua totalmente lignificada. Os demais caracteres anatômicos como a epiderme das faces adaxial e abaxial, os parênquimas paliçádico e lacunoso são semelhantes ao estágio C. As Figuras 24 a 27 representam esse estágio, em secções transversais da nervura central, mostrando em detalhes o feixe vascular, elementos xilemáticos e floemáticos, totalmente diferenciado com as paredes celulares dos elementos xilemáticos completamente lignificadas e a bainha ao redor do feixe vascular com lignificação total.

A Tabela 2 apresenta os valores médios dos nove caracteres quantitativos que foram utilizados na diferenciação dos três estágios foliares de quatro clones de seringueira e empregados para a realização da análise estatística multivariada.

Na Tabela 3 estão mostrados os coeficientes de correlação entre os nove caracteres quantitativos e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), sendo indicada a intensidade da contribuição desses caracteres para a discriminação dos estágios, a qual está relacionada com a ocorrência de maiores valores absolutos em Y_1 e Y_2 . Em conjunto, estes componentes foram responsáveis por 83,79 % da informação acumulada pelos caracteres estudados ressaltando que eles são eficientes indicadores de dissimilaridade.

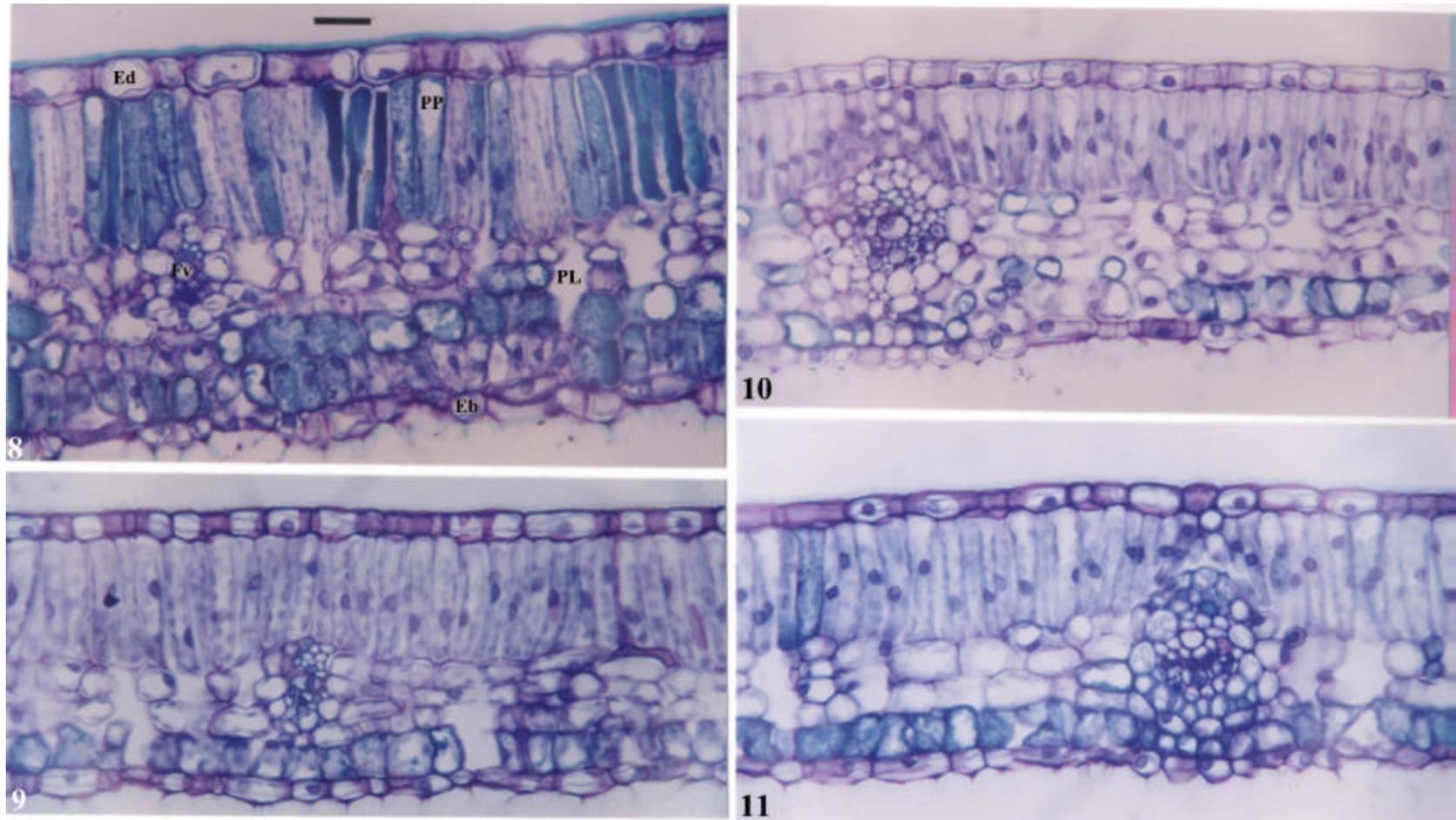
Verifica-se na Tabela 3 que, para o primeiro componente principal (Y_1), as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos estágios foliares foram: área de esclerênquima da nervura central e espessura da epiderme das faces abaxial e adaxial da região internervural. A informação retida no conjunto dos nove caracteres quantitativos, referente a este primeiro componente, foi de 67,60 %. Para o segundo componente principal (Y_2), as variáveis que mais contribuíram foram: área de xilema e área total da nervura central. A informação retida para este segundo componente foi de 16,19 %.

A dispersão gráfica referente à Análise de Componentes Principais (Figura 28) e o dendrograma resultante da Análise de Agrupamento (Figura 29) mostram que os caracteres quantitativos com maior poder discriminatório são os responsáveis pelos agrupamentos formados entre os estágios foliares dos quatro clones de seringueira, constituindo três grupos principais.

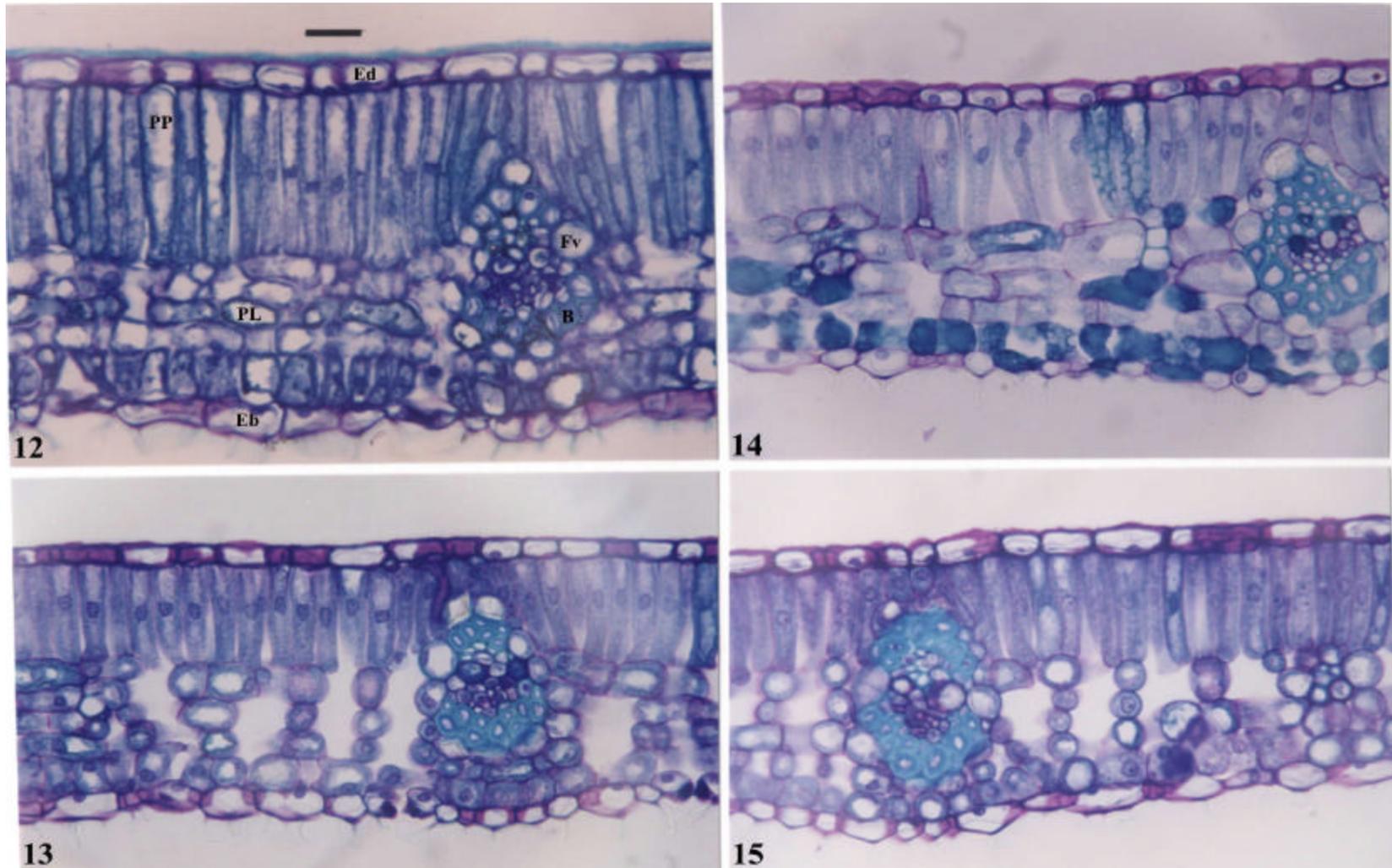
Pelo dendrograma formado na Análise de Agrupamento (Figura 29) verifica-se que os três grupos formados apresentam valor próximo de 0,20 da escala de distância entre os estágios foliares. O primeiro grupo é formado pelo estágio foliar B₂ e os quatro clones de seringueira estudados, sendo que esse estágio se separou dos demais por apresentar tecidos meristemáticos. O segundo grupo é formado pelo estágio foliar C, juntamente como os clones de seringueira testados; nesse estágio os tecidos são adultos, com ausência ou início de lignificação nas paredes do xilema e bainha lignificada. O terceiro grupo formado pelo estágio foliar D e os clones de seringueira analisados; esse estágio se diferenciou do anterior por apresentar total lignificação do xilema e bainha do feixe lignificada. Assim sendo, os estágios foliares B₂, C e D de seringueira, propostos por Hallé et al. (1978), independentemente do clone, podem ser diferenciados com base nos caracteres anatômicos quantitativos, principalmente, por aqueles que estão relacionados com área de esclerênquima da nervura central, espessura da epiderme das faces abaxial e adaxial da região internervural, área de xilema e tamanho da nervura central. A Tabela 4 mostra os intervalos de valores para esses caracteres anatômicos em cada estágio, para o conjunto dos quatro clones de seringueira.

A diferenciação dos estágios foliares de seringueira através da anatomia complementa a classificação proposta por Hallé et al. (1978), no qual os autores classificam o desenvolvimento foliar em quatro estágios baseados em caracteres relacionados à ontogenia foliar, sendo apresentados na forma de diagrama, o qual pode deixar dúvidas na

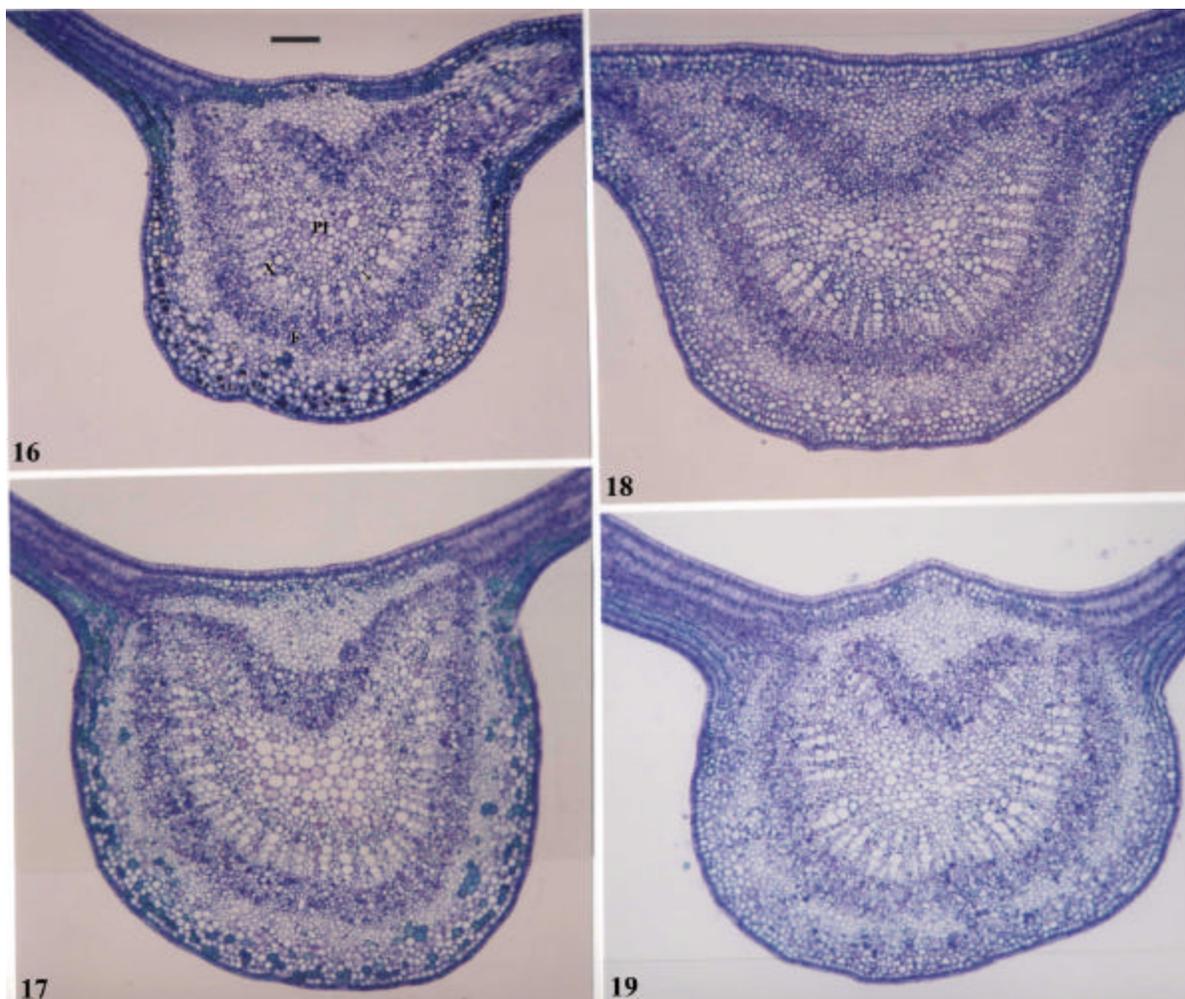
hora da classificação. Os estágios foliares são importantes para o ciclo das relações patógeno-hospedeiro, pois estes correspondem às fases de desenvolvimento do patógeno, suscetibilidade e resistência dos folíolos à infecção. No caso de *Microcyclus ulei*, agente causal do mal das folhas, observa-se que o estágio B₂, para os clones suscetíveis, representa a fase de infecção pelo patógeno (Figura 30), ou seja, é o estágio foliar de maior suscetibilidade. O estágio C representa a fase de maior esporulação conidial (Figura 31), e o estágio D representa a ocorrência da fase estromática (fase sexuada) do patógeno (Figura 32), considerada principal fonte de inóculo primária. O conhecimento desses estágios e o comportamento do fungo sobre eles, nos diferentes clones, são de fundamental importância, tanto para a realização de pesquisas em condições controladas de infecção como para o controle da doença no campo em condições naturais de epidemia.



Figuras 8 a 11. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio C, de quatro clones de seringueira. 8. Clone PB 235; 9. Clone PB 314; 10. Clone MDF 180; 11. Clone Fx 2784. Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima Lacunoso. Fv: Feixe vascular. Eb: Epiderme abaxial. Barra = 22,5 μm .



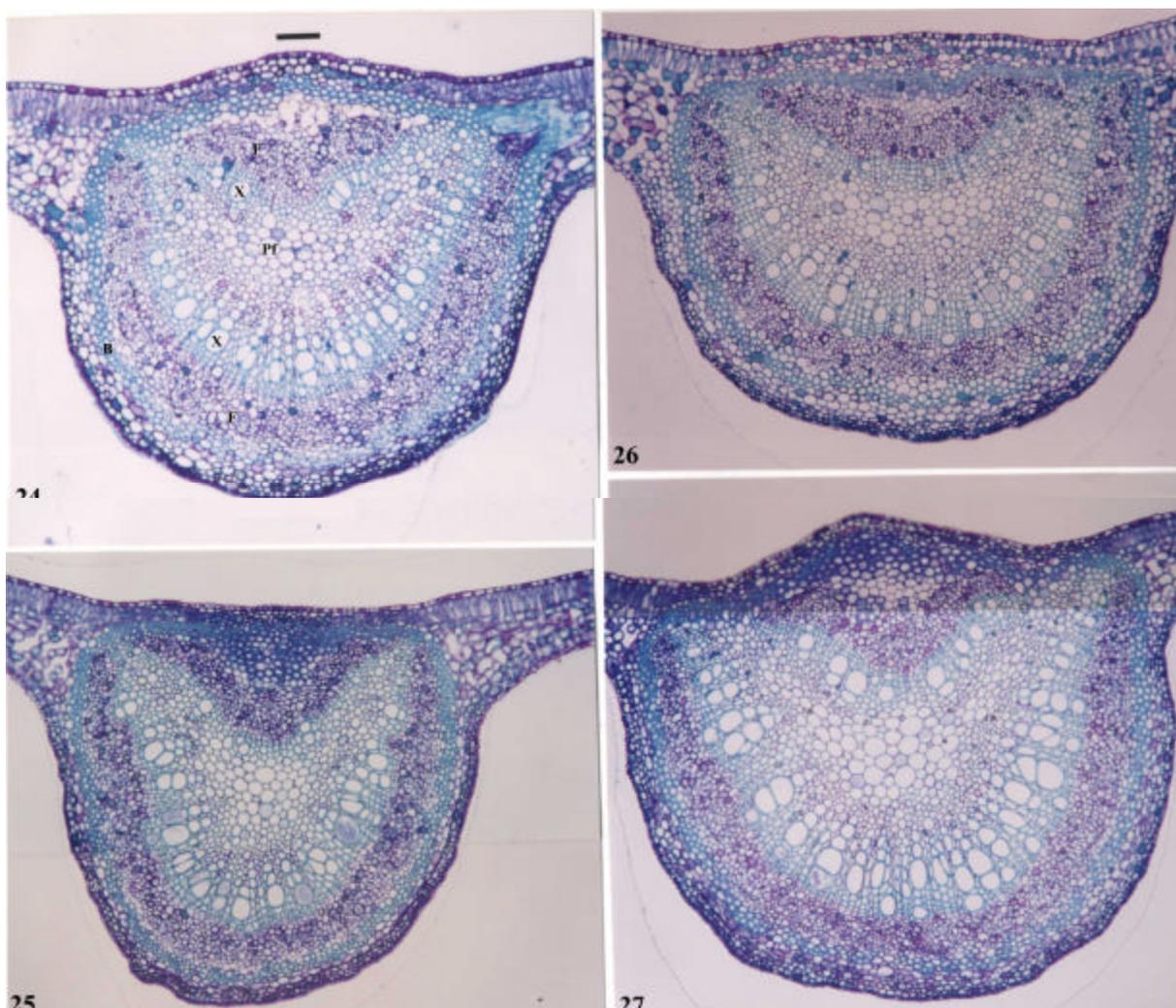
Figuras 12 a 15. Secções transversais da lâmina foliar, no estágio D, de quatro clones de seringueira. 12. Clone PB 235; 13. Clone PB 314; 14. Clone MDF 180; 15. Clone Fx 2784. Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima lacunoso. Fv: Feixe vascular. B: Bainha lignificada do feixe. Eb: Epiderme abaxial. Barra = 22,5 μ m.



Figuras 16 a 19. Secções transversais da nervura central, no estágio B₂, de quatro clones de seringueira. 16. Clone PB 235; 17. Clone PB 314; 18. Clone MDF 180; 19. Clone Fx 2784. Pf: Parênquima fundamental. F: Floema. X: Xilema. →: paredes celulares do xilema não lignificadas. Barra = 90 µm.



Figuras 20 a 23. Secções transversais da nervura central, no estágio C, de quatro clones de seringueira. 20. Clone PB 235; 21. Clone PB 314; 22. Clone MDF 180; 23. Clone Fx 2784. Pf: Parênquima fundamental. F: Floema. X: Xilema. →: Paredes celulares do xilema lignificadas. Barra = 90 μ m.



Figuras 24 a 27. Secções transversais da nervura central, no estágio D, de quatro clones de seringueira. 24. Clone PB 235; 25. Clone PB 314; 26. Clone MDF 180; 27. Clone Fx 2784. Pf: Parênquima fundamental. F: Floema. X: Xilema, com paredes lignificadas. B: Bainha do feixe lignificada. Barra = 90 μ m.

TABELA 2. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, para a diferenciação entre três estágios foliares (B₂, C, D) dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180, Fx 2784) de seringueira.

CARACTERES	PB 235			PB 314			MDF 180			Fx 2784		
	B ₂	C	D									
Espessura epiderme face adaxial da RIN (µm)	16,66	11,40	12,77	18,00	10,51	10,00	19,70	10,77	11,88	19,61	11,42	9,28
Espessura parênquima paliçádico da RIN (µm)	30,70	52,38	67,92	36,33	48,59	42,61	46,38	47,78	50,89	30,43	46,60	45,90
Espessura parênquima lacunoso da RIN (µm)	52,11	62,11	87,36	50,58	52,39	54,54	72,05	63,32	74,39	64,76	65,38	63,17
Espessura epiderme face abaxial da RIN (µm)	12,08	10,44	8,99	13,12	7,95	8,06	13,42	8,43	8,46	13,77	7,18	7,22
Área total da NC (mm ²)	0,59	0,69	0,93	0,72	0,78	0,73	0,87	0,74	0,83	0,76	0,94	0,82
Área de floema da NC (mm ²)	0,13	0,15	0,20	0,14	0,14	0,14	0,17	0,14	0,16	0,15	0,17	0,15
Área de xilema da NC (mm ²)	0,10	0,15	0,22	0,11	0,18	0,17	0,18	0,19	0,20	0,13	0,25	0,22
Área de parênquima fundamental da NC (mm ²)	0,36	0,40	0,41	0,47	0,45	0,31	0,53	0,42	0,39	0,49	0,52	0,33
Área esclerênquima da NC (mm ²)	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,11

TABELA 3. Correlação entre os nove caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), dos três estágios foliares, dos quatro clones de seringueira (*Hevea* spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2).

CARACTERES	Y_1	Y_2
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	-0,6563 (3)	0,4427 (7)
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	0,5878 (6)	-0,5394 (4)
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	0,4491 (7)	-0,2955 (8)
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	-0,6910 (2)	0,5465 (3)
Área total da NC (mm^2)	0,3974 (9)	-0,6078 (2)
Área de floema da NC (mm^2)	0,4087 (8)	-0,4482 (6)
Área de xilema da NC (mm^2)	0,6170 (5)	-0,7222 (1)
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	-0,6249 (4)	-0,4539 (5)
Área de esclerênquima da NC (mm^2)	0,9701 (1)	0,2292 (9)
Informação Retida (%)	67,60	16,19
Informação Acumulada (%)	67,60	83,79

Números entre parênteses: ordenação dos caracteres quanto ao seu poder discriminatório, com base na porcentagem da informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 .

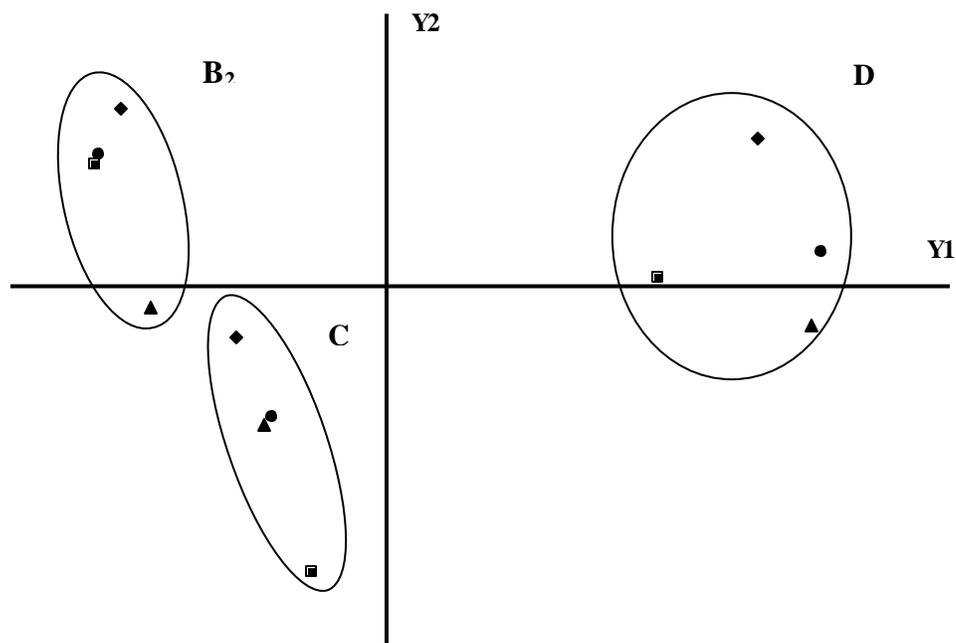


Figura 28. Dispersão gráfica dos três estágios foliares (B₂, C, D) dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784), utilizando os dois primeiros componentes principais (Y₁ e Y₂), para o conjunto dos nove caracteres anatômicos quantitativos da folha. † = Fx 2784; ● = PB 314; ◆ = PB 235; ? = MDF 180.

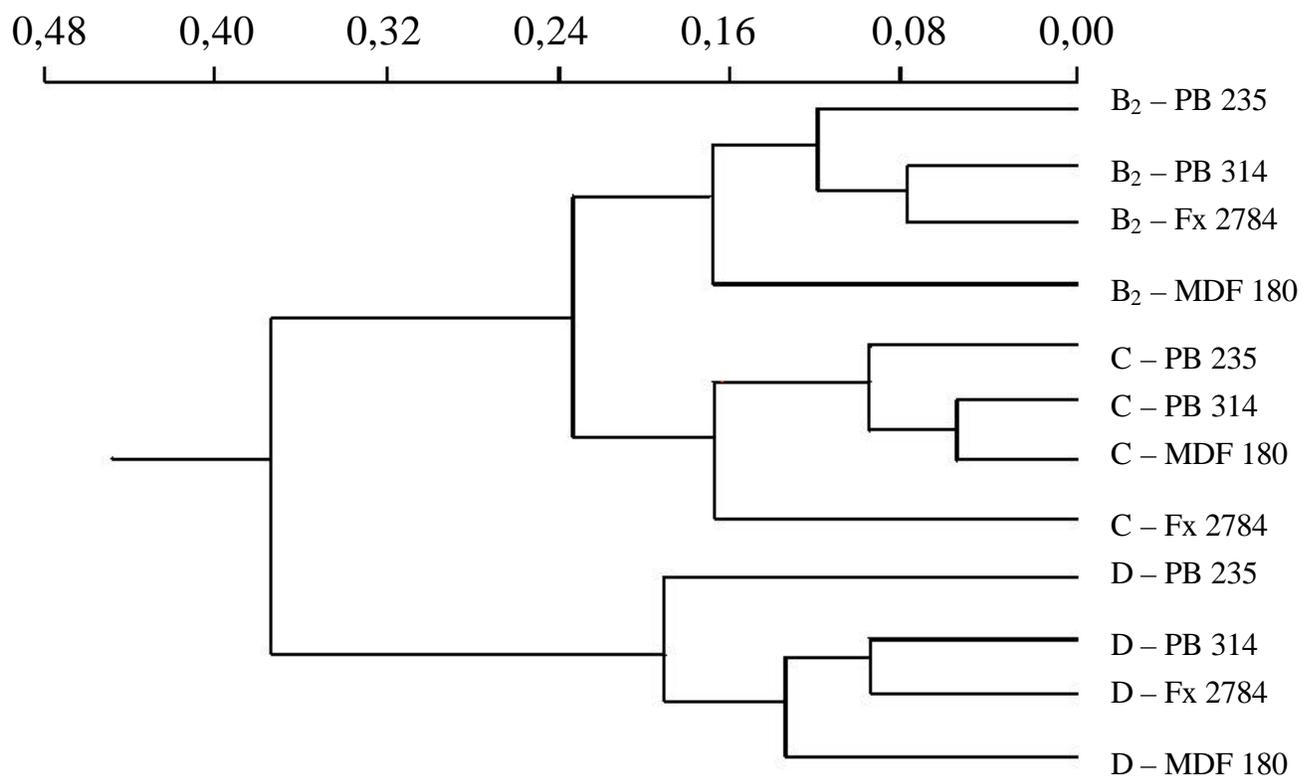


Figura 29. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os três estágios foliares (B₂, C e D) dos quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180).



Figura 30. Estágio foliar B₂, o qual representa a fase de infecção pelo patógeno.



Figura 31. À esquerda: lesões de esporulação conidial na face abaxial e adaxial dos folíolos, no estágio C. À direita: detalhe das lesões na face abaxial do folíolo.



Figura 32: Detalhe dos estromas na face adaxial do folíolo, no estágio D.

Tabela 4: Intervalos de limite inferior (Li) e superior (Ls) dos caracteres anatômicos quantitativos com maior poder discriminatório para Y_1 e Y_2 , de cada estágio foliar (B_2 , C e D), independentemente do clone.

Caracteres	B_2	C	D
	Li – Ls	Li – Ls	Li – Ls
Área esclerênquima da NC (mm^2) – Y_1	0,00 – 0,00	0,00 – 0,00	0,07 – 0,15
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm) – Y_1	10,80 – 15,10	6,62 – 11,23	6,36 – 10,78
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm) – Y_1	12,85 – 21,59	9,28 – 13,28	8,23 – 16,38
Área de xilema da NC (mm^2) – Y_2	0,07 – 0,20	0,13 – 0,28	0,14 – 0,33
Área total da NC (mm^2) – Y_2	0,41 – 0,99	0,62 – 1,10	0,66 – 1,10

NC: Nervura Central; RIN: Região Internervural.

Para uma maior distinção entre os estágios sugere-se, ainda, a caracterização morfológica dos folíolos em cada estágio, o que viria complementar esse estudo anatômico e as descrições de Hallé et al. (1978).

A Análise estatística multivariada também foi realizada separadamente para cada estágio foliar nos quatro clones de seringueira testados, PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784, visando à diferenciação dos caracteres anatômicos dentro de um mesmo estágio nos diferentes clones, salientando aqueles com importância ou implicação na resistência ao *M. ulmi*. As Tabelas 5, 7 e 9 apresentam os valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos dos estágios foliares B_2 , C e D, respectivamente.

Nas Tabelas 6, 8 e 10 estão representados os coeficientes de correlação entre os caracteres quantitativos e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2) dos estágios foliares B_2 , C e D respectivamente, sendo indicada a intensidade da contribuição desses caracteres para a discriminação dos clones, a qual está relacionada com a ocorrência de maiores valores absolutos em Y_1 e Y_2 . No estágio B_2 , estes componentes, em conjunto, foram

responsáveis por 93,83 % (Tabela 6) da informação acumulada pelos caracteres anatômicos; no estágio C, os componentes foram responsáveis por 94,91 % (Tabela 8); e no D por 92,95 % (Tabela 10).

Verifica-se na Tabela 6 que, para o primeiro componente principal (Y_1), as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos clones, dentro do estágio B_2 , foram: áreas de floema, xilema e total da nervura central. A informação retida no conjunto dos oito caracteres, referente a este primeiro componente, foi de 85,18 %. Para o segundo componente principal (Y_2), as variáveis que mais contribuíram foram: espessuras da epiderme da face abaxial e do parênquima paliçádico da região internervural. A informação retida para este segundo componente foi de 8,66 %.

A dispersão gráfica da Análise de Componentes Principais (Figura 33) e o dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 34), dos quatro clones estudados para o estágio foliar B_2 , formam dois grupos principais.

O dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 34) revela que os dois grupos formados apresentam valor próximo de 0,14 da escala de distância entre os clones de seringueira. O primeiro grupo é constituído pelo clone PB 235, juntamente com o subgrupo dos clones PB 314 e Fx 2784 e o segundo grupo formado é formado pelo clone MDF 180.

Apesar da separação do clone MDF 180 dos demais pelo componente Y_1 (Figura 33), nesse estágio (B_2) é comum ocorrer à infecção dos clones pelo patógeno, com exceção do Fx 2784, o qual parece apresentar algum tipo de resistência nesse estágio. Este clone apresentou uma maior espessura da epiderme abaxial da região internervural, o que o separou dos demais pelo segundo componente principal Y_2 (Figura 33). Assim, pode-se sugerir que esse caracter pode ser um fator relacionado à resistência ao mal das folhas, uma vez que, o agente causal inicia sua penetração diretamente pela epiderme da face abaxial. Contrariamente, Sanier et al. (1992), afirma que a resistência parece não estar associada a uma barreira anatômica, e sim a fatores bioquímicos. No entanto, os mesmos autores admitem que compostos fenólicos não desempenham papel principal na resistência de folhas jovens.

Verifica-se na Tabela 8 que, para o primeiro componente principal (Y_1), as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos clones, dentro do estágio C, foram: áreas de xilema, total e de parênquima fundamental da nervura central. A informação retida no conjunto dos oito caracteres, referente a este primeiro componente, foi de 80,91 %.

Para o segundo componente principal (Y_2), as variáveis que mais contribuíram foram: espessuras da epiderme da face adaxial e do parênquima lacunoso da região internervural. A informação retida para este segundo componente foi de 14,00 %.

A dispersão gráfica da Análise de Componentes Principais (Figura 35) e o dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 36), dos quatro clones estudados para o estágio foliar C, também formaram dois grupos principais.

O dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 36) mostra que os dois grupos formaram-se próximo do valor 0,11 da escala de distância entre os clones de seringueira. O primeiro grupo é formado pelo clone PB 235, juntamente com o subgrupo dos clones MDF 180 e PB 314 e o segundo grupo formado pelo clone Fx 2784. Pelo primeiro componente principal (Y_1), o clone Fx 2784 se separou dos demais (Figura 35) por apresentar menor espessura de parênquima paliçádico e de epiderme da face abaxial da região internervural. No estágio foliar C, esses fatores não têm grande importância para a resistência dos clones, pois nesta fase prevalece a esporulação conidial do fungo nos clones estudados, com restrição do Fx 2784 que já bloqueou o fungo durante o processo inicial de infecção. Além disso, nesse estágio foliar (Tabela 7), todos os clones apresentaram espessura da epiderme abaxial da região internervural menor em relação ao estágio B₂ (Tabela 5), sendo que o clone Fx 2784 se destacou por apresentar esse carácter, nesse estágio, ainda, menor que os demais clones, enquanto que no estágio B₂ ocorreu o inverso. Portanto, não foi possível evidenciar algum fator de resistência anatômico da folha nesse estágio.

TABELA 5. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar B₂, dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.

CARACTERES	PB 235	PB 314	MDF 180	Fx 2784
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	16,66	18,00	19,70	19,61
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	30,70	36,33	46,38	30,43
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	52,11	50,58	72,05	64,76
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	12,08	13,12	13,42	13,77
Área total da NC (mm^2)	0,59	0,72	0,87	0,76
Área de floema da NC (mm^2)	0,13	0,14	0,17	0,15
Área de xilema da NC (mm^2)	0,10	0,11	0,18	0,13
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	0,36	0,47	0,53	0,49

TABELA 6. Correlação entre os oito caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar B₂, dos quatro clones de seringueira (*Hevea* spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y₁ e Y₂).

CARACTERES	Y ₁	Y ₂
Espessura epiderme face adaxial da RIN (µm)	0,8735 (6)	0,4780 (3)
Espessura parênquima paliçádico da RIN (µm)	0,8378 (7)	-0,5322 (2)
Espessura parênquima lacunoso da RIN (µm)	0,9070 (4)	0,2289 (4)
Espessura epiderme face abaxial da RIN (µm)	0,7079 (8)	0,6168 (1)
Área total da NC (mm ²)	0,9741 (3)	0,1202 (6)
Área de floema da NC (mm ²)	0,9971 (1)	-0,0209 (8)
Área de xilema da NC (mm ²)	0,9808 (2)	-0,0515 (7)
Área de parênquima fundamental da NC (mm ²)	0,8883 (5)	0,2175 (5)
Informação Retida (%)	85,18	8,66
Informação Acumulada (%)	85,18	93,83

Números entre parênteses: ordenação dos caracteres quanto ao seu poder discriminatório, com base na porcentagem da informação retida e acumulada em Y₁ e Y₂.

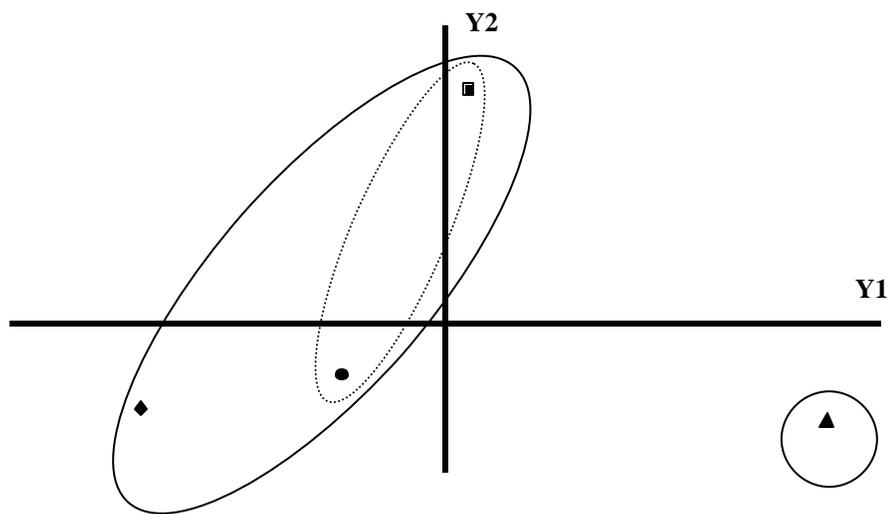


Figura 33. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar B₂, utilizando os dois primeiros componentes principais (Y₁ e Y₂), para o conjunto dos oito caracteres anatômicos quantitativos da folha. □ = Fx 2784; ● = PB 314; ◆ = PB 235; ▲ = MDF 180.

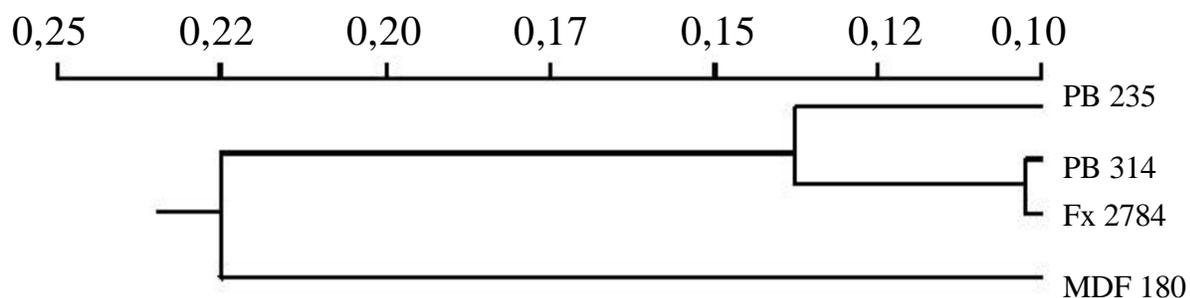


Figura 34. Dendrograma resultante da Análise de Agrupamento dos caracteres anatômicos quantitativos da folha, utilizando-se a Distância Euclidiana Média entre os quatro clones de seringueira estudados (PB 235, PB 314, Fx 2784 e MDF 180), no estágio foliar B₂.

TABELA 7. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar C, dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.

CARACTERES	PB 235	PB 314	MDF 180	Fx 2784
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	11,40	10,51	10,77	11,42
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	52,38	48,59	47,78	46,60
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	62,11	52,39	63,32	65,38
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	10,44	7,95	8,43	7,18
Área total da NC (mm^2)	0,69	0,78	0,74	0,94
Área de floema da NC (mm^2)	0,15	0,14	0,14	0,17
Área de xilema da NC (mm^2)	0,15	0,18	0,19	0,25
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	0,40	0,45	0,42	0,52

TABELA 8. Correlação entre os oito caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar C, dos quatro clones de seringueira (*Hevea* spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2).

CARACTERES	Y_1	Y_2
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	-0,2044 (8)	0,9466 (1)
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	0,8579 (5)	0,3439 (5)
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	-0,3142 (7)	0,8456 (2)
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	0,8896 (4)	0,4397 (4)
Área total da NC (mm^2)	-0,9889 (2)	0,0603 (8)
Área de floema da NC (mm^2)	-0,7835 (6)	0,4700 (3)
Área de xilema da NC (mm^2)	-0,9921 (1)	0,0754 (6)
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	-0,9664 (3)	-0,0713 (7)
Informação Retida (%)	80,91	14,00
Informação Acumulada (%)	80,91	94,91

Números entre parênteses: ordenação dos caracteres quanto ao seu poder discriminatório, com base na porcentagem da informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 .

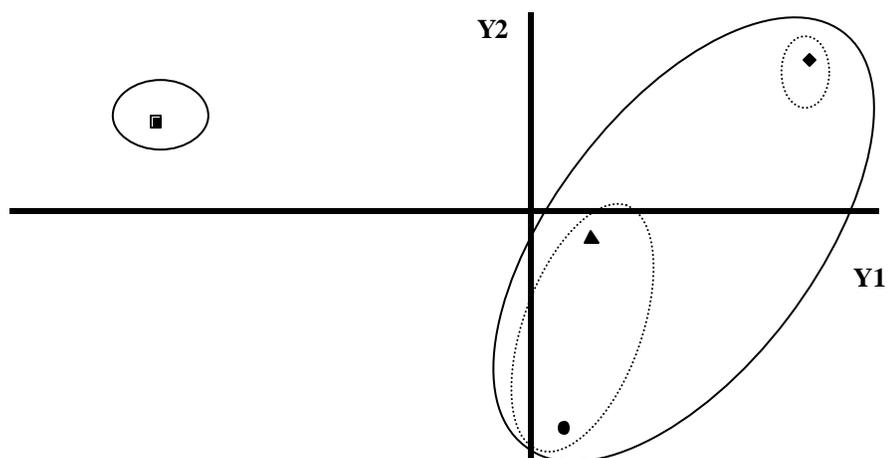
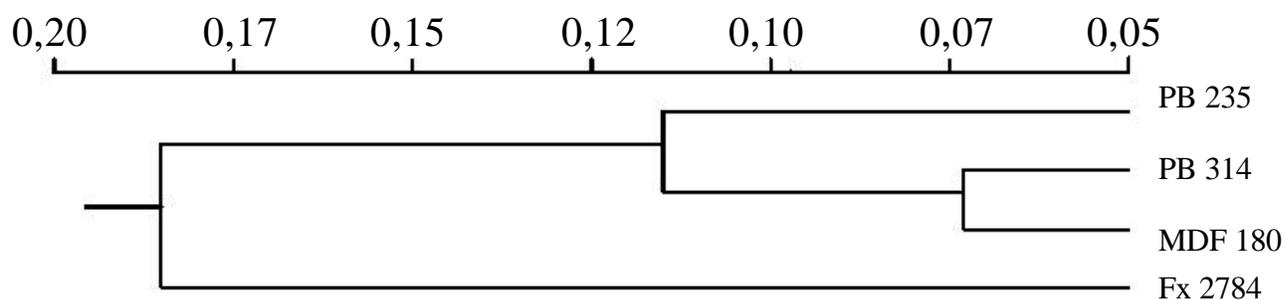


Figura 35. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar C, utilizando os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto dos oito caracteres anatômicos quantitativos da folha. ◻ = Fx 2784; ● = PB 314; ◆ = PB 235; ◀ = MDF 180.



Na Tabela 10, verifica-se que, para o primeiro componente principal (Y_1), as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos clones, dentro do estágio D, foram: espessuras dos parênquimas lacunoso e paliçádico da região internervural, áreas de parênquima fundamental, floema e total da nervura central. A informação retida no conjunto dos nove caracteres, referente a este primeiro componente, foi de 77,45 %. Para o segundo componente principal (Y_2), a variável que mais contribuiu foi a área de esclerênquima da nervura central. A informação retida para este segundo componente foi de 15,50 %.

A dispersão gráfica da Análise de Componentes Principais (Figura 37) e o dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 38), dos clones estudados para o estágio foliar D, formam três grupos principais.

O dendrograma da Análise de Agrupamento (Figura 38) mostra que os três grupos foram constituídos próximos do valor 0,14 da escala de distância entre os clones de seringueira estudados. O primeiro grupo é formado pelo clone PB 235; o segundo grupo é formado pelos clones Fx 2784 e PB 314; e o terceiro grupo formado pelo clone MDF 180. Nesse estágio (D) ocorre a fase sexuada do patógeno nos clones considerados suscetíveis e apesar da separação de três grupos pela análise (Figura 37 e 38), não foi possível evidenciar o envolvimento de nenhum dos caracteres anatômicos estudados com resistência nessa fase. O estágio foliar D apresenta-se como resistente à penetração do fungo (Gasparotto et al., 1997) em todos os clones, até mesmo nos suscetíveis. Uma explicação para tal fato pode ser a presença de tecidos ainda meristemáticos no estágio infectivo, chamado B₂, enquanto em D, há a presença de tecidos foliares adultos, com paredes celulares lignificadas por exemplo.

TABELA 9. Valores médios dos caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do folíolo mediano, no estágio foliar D, dos clones (PB 235, PB 314, MDF 180 e Fx 2784) de seringueira.

CARACTERES	PB 235	PB 314	MDF 180	Fx 2784
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	12,77	10,00	11,88	9,28
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	67,92	42,61	50,89	45,90
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	87,36	54,54	74,39	63,17
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	8,99	8,06	8,46	7,22
Área total da NC (mm^2)	0,93	0,73	0,83	0,82
Área de floema da NC (mm^2)	0,20	0,14	0,16	0,15
Área de xilema da NC (mm^2)	0,22	0,17	0,20	0,22
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	0,41	0,31	0,39	0,33
Área esclerênquima da NC (mm^2)	0,11	0,11	0,08	0,11

TABELA 10. Correlação entre os nove caracteres anatômicos quantitativos da região internervural (RIN) e da nervura central (NC), do estágio foliar D, dos quatro clones de seringueira (*Hevea* spp.) e os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2).

CARACTERES	Y_1	Y_2
Espessura epiderme face adaxial da RIN (μm)	0,9110 (6)	-0,3687 (4)
Espessura parênquima paliçádico da RIN (μm)	0,9761 (2)	0,1534 (8)
Espessura parênquima lacunoso da RIN (μm)	0,9954 (1)	-0,0149 (9)
Espessura epiderme face abaxial da RIN (μm)	0,7864 (7)	-0,4067 (3)
Área total da NC (mm^2)	0,9480 (5)	0,2605 (6)
Área de floema da NC (mm^2)	0,9519 (4)	0,2937 (5)
Área de xilema da NC (mm^2)	0,5102 (8)	0,5947 (2)
Área de parênquima fundamental da NC (mm^2)	0,9638 (3)	-0,2036 (7)
Área esclerênquima da NC (mm^2)	-0,1896 (9)	0,9020 (1)
Informação Retida (%)	77,45	15,50
Informação Acumulada (%)	77,45	92,95

Números entre parênteses: ordenação dos caracteres quanto ao seu poder discriminatório, com base na porcentagem da informação retida e acumulada em Y_1 e Y_2 .

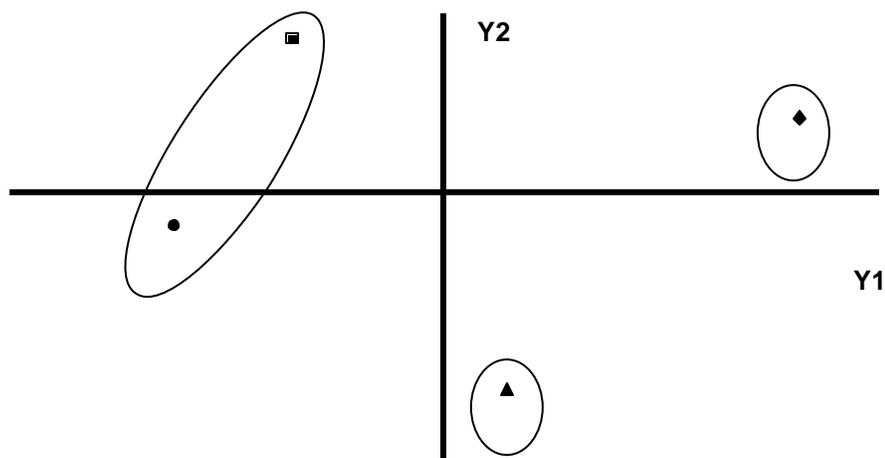
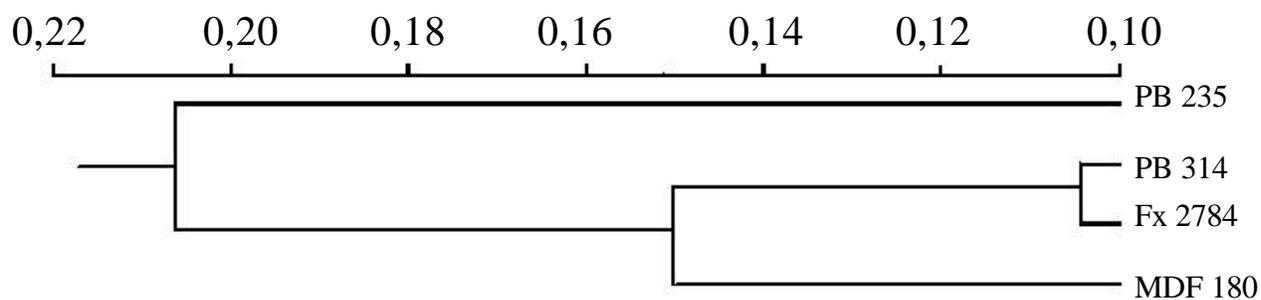


Figura 37. Dispersão gráfica dos quatro clones de seringueira (PB 314, PB 235, MDF 180, Fx 2784) no estágio foliar D, utilizando os dois primeiros componentes principais (Y_1 e Y_2), para o conjunto dos nove caracteres anatômicos quantitativos da folha. □ = Fx 2784; ● = PB 314; ◆ = PB 235; ▲ = MDF 180.



6.2 Análise Anatômica dos folíolos infectados

As folhas infectadas pelo patógeno e analisadas anatomicamente aos 5, 10, 45, e 90 dias após a infecção pelo fungo (*Microcyclus ulei*) estão representadas nas Figuras 39 a 54.

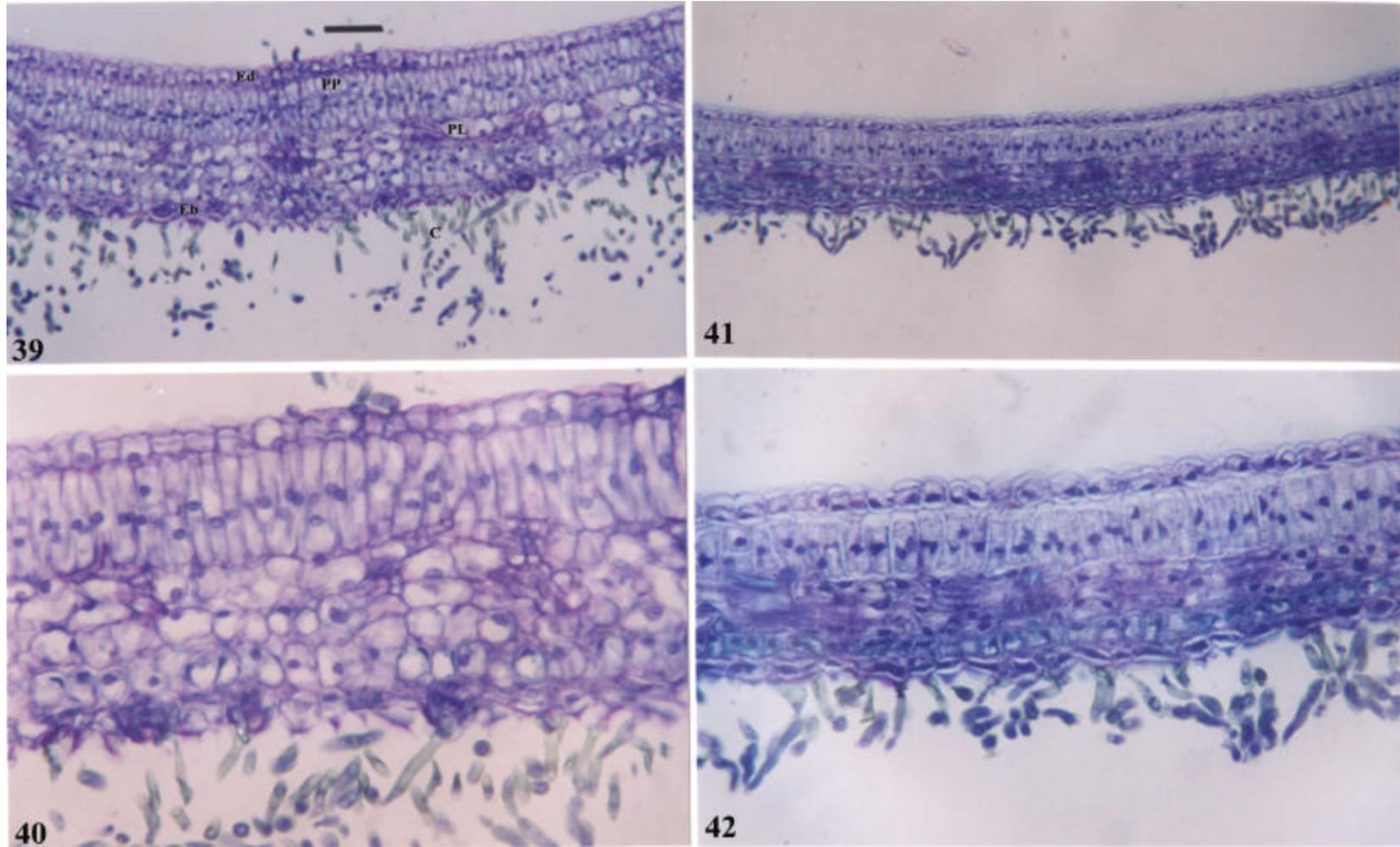
As Figuras 39 a 42 representam uma lesão foliar da região internervural causada aos cinco dias após a inoculação pelo patógeno, em secções transversais, dos clones PB 314 e MDF 180. O clone Fx 2784 não está representado em decorrência da não infecção pelo patógeno. O clone PB 314 está representado nas Figuras 39 e 40 e o clone MDF 180, nas Figuras 41 e 42. Pode-se verificar nessa fase uma produção de conídios na face abaxial do folíolo, com maior intensidade no PB 314, mas em ambos os clones o tecido do mesofilo continua íntegro. Verifica-se, nos dois clones, que o folíolo encontra-se no estágio denominado C, por apresentar a ocorrência de tecidos adultos na região internervural, com o feixe vascular não diferenciado e a bainha do feixe não lignificada.

Nas Figuras 43 a 46 está representada a lesão foliar aos 10 dias após inoculação, em secções transversais da região internervural, nos dois clones que apresentaram o avanço da infecção. Nessa fase ainda observa-se a presença de conídios na face abaxial e pouca esporulação na face adaxial da folha, conforme também observou Junqueira (1985). O clone PB 314 (Figuras 43 e 44) apresentou necrose foliar em decorrência da degeneração dos tecidos do mesofilo, enquanto o MDF 180 (Figuras 45 e 46) permaneceu com seus tecidos íntegros, com esporulação conidial bastante reduzida na face abaxial, mostrando uma maior tolerância dos tecidos à colonização pelo patógeno. Neste período, os clones ainda encontram-se no estágio foliar C.

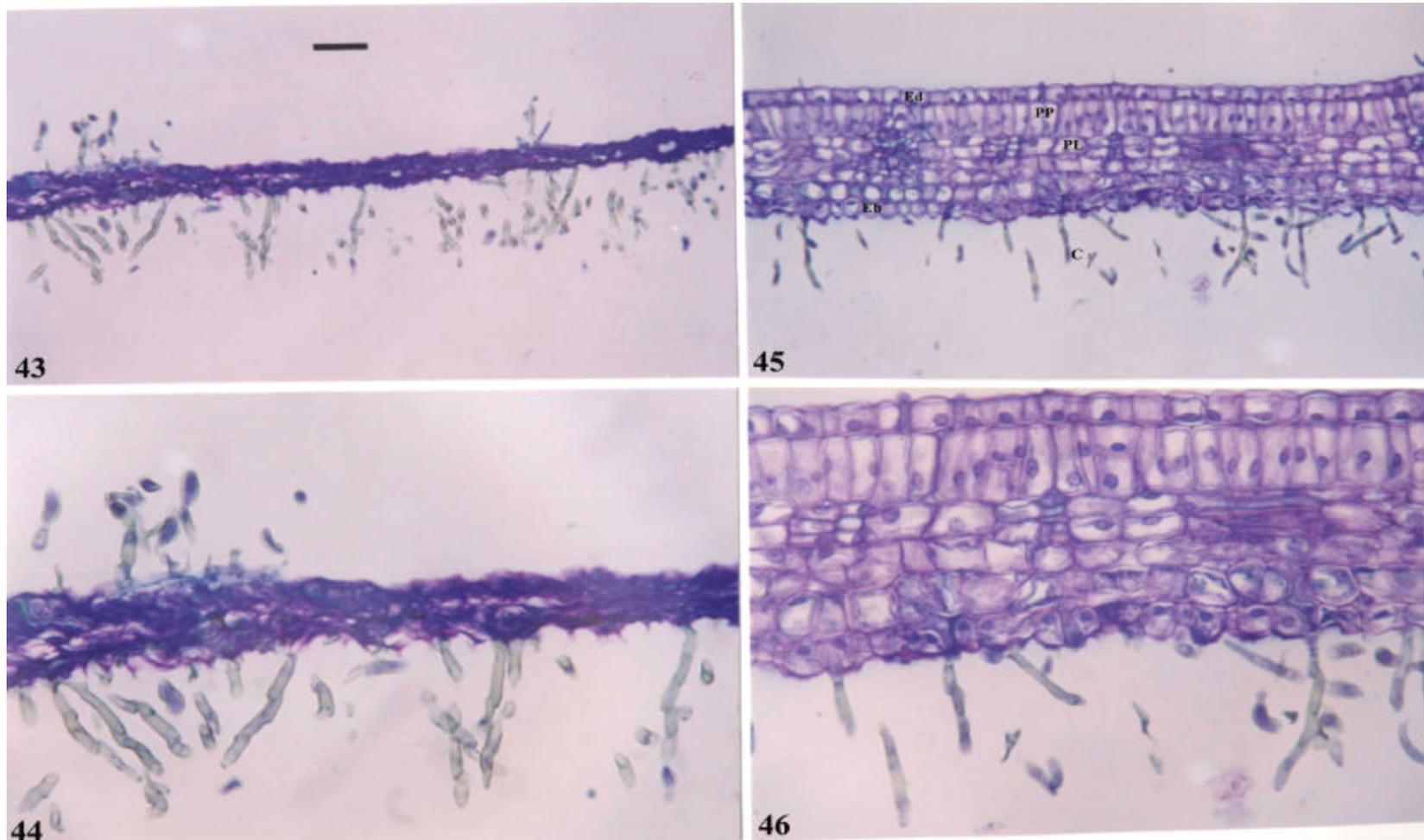
Aos 45 dias após inoculação pelo fungo (Figuras 47 a 50) na região internervural do clone PB 314 (Figuras 47 e 48) verifica-se ausência de esporulação conidial e início da formação do tecido estromático com alteração do parênquima paliádico nessa região, enquanto que no clone MDF 180 (Figura 49 e 50), ainda ocorre a presença de conídios na face abaxial e, até mesmo na face adaxial, inicia-se a degeneração do mesofilo e ocorre grande produção de fenóis, os quais são observados nos tecidos do mesofilo pela coloração esverdeada devido à reação do corante azul de toluidina pH 4,7. Neste período os clones encontram-se no estágio foliar D. Segundo Sanier et al. (1992), os fenóis contribuem para

resistência de fungos fitopatogênicos em diversos caminhos como: inibidor na germinação conidial; participando da reação de hipersensibilidade; e precursores de lignina. De acordo com Garcia et al. (1995) os fenóis indicam um papel ativo no mecanismo de defesa das plantas devido aos seus efeitos fungitóxicos e ao grande quantidade presente em clones resistentes. No caso do MDF 180 esses compostos podem auxiliar na inibição da formação dos estromas.

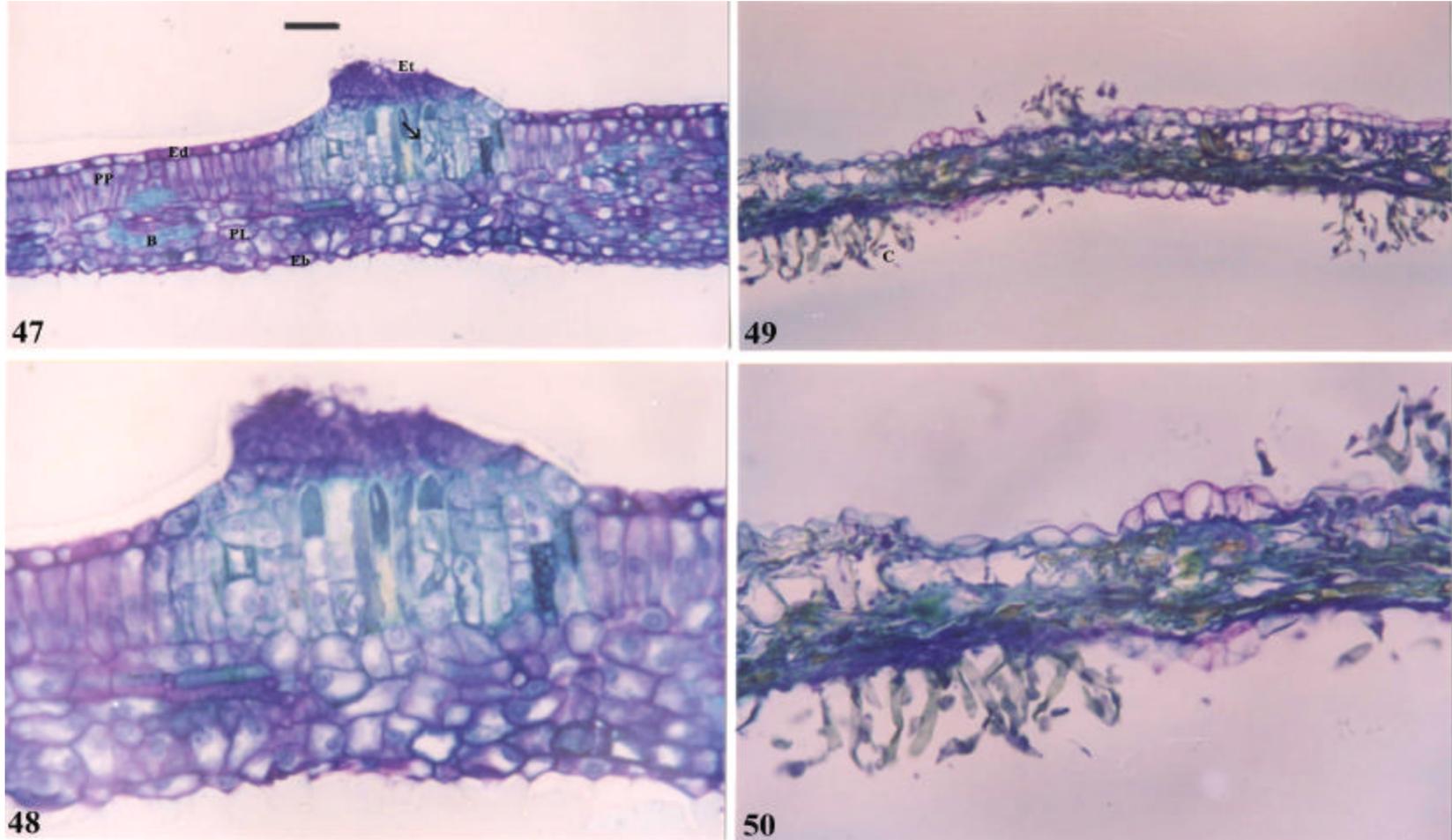
Nas Figuras 51 a 54 está representada a lesão foliar aos 90 dias após inoculação pelo patógeno, em secções transversais da região internervural. Nessa fase, verifica-se a presença dos estromas ainda imaturos conforme Brignani Neto et al. (1991) na face adaxial do folíolo, no clone PB 314, sobre tecidos não degenerados (Figuras 51 e 52); de acordo com Garcia et al. (1995b), estruturas estromáticas são produzidas ao redor de tecidos necróticos, sobre os tecidos cloróticos. As células do tecido estromático apresentam-se bem definidas, com formato arredondado, semelhante àquelas do parênquima fundamental da nervura central. No clone MDF 180 (Figura 53 e 54), apesar de não ocorrer a presença de estromas, observa-se células estromáticas mal formadas distribuídas pela superfície da face adaxial, além disso ocorre presença acentuada de fenóis nos tecidos do mesófilo e, ao mesmo tempo, esses tecidos permanecem em degeneração. Neste período os clones encontram-se no estágio foliar D.



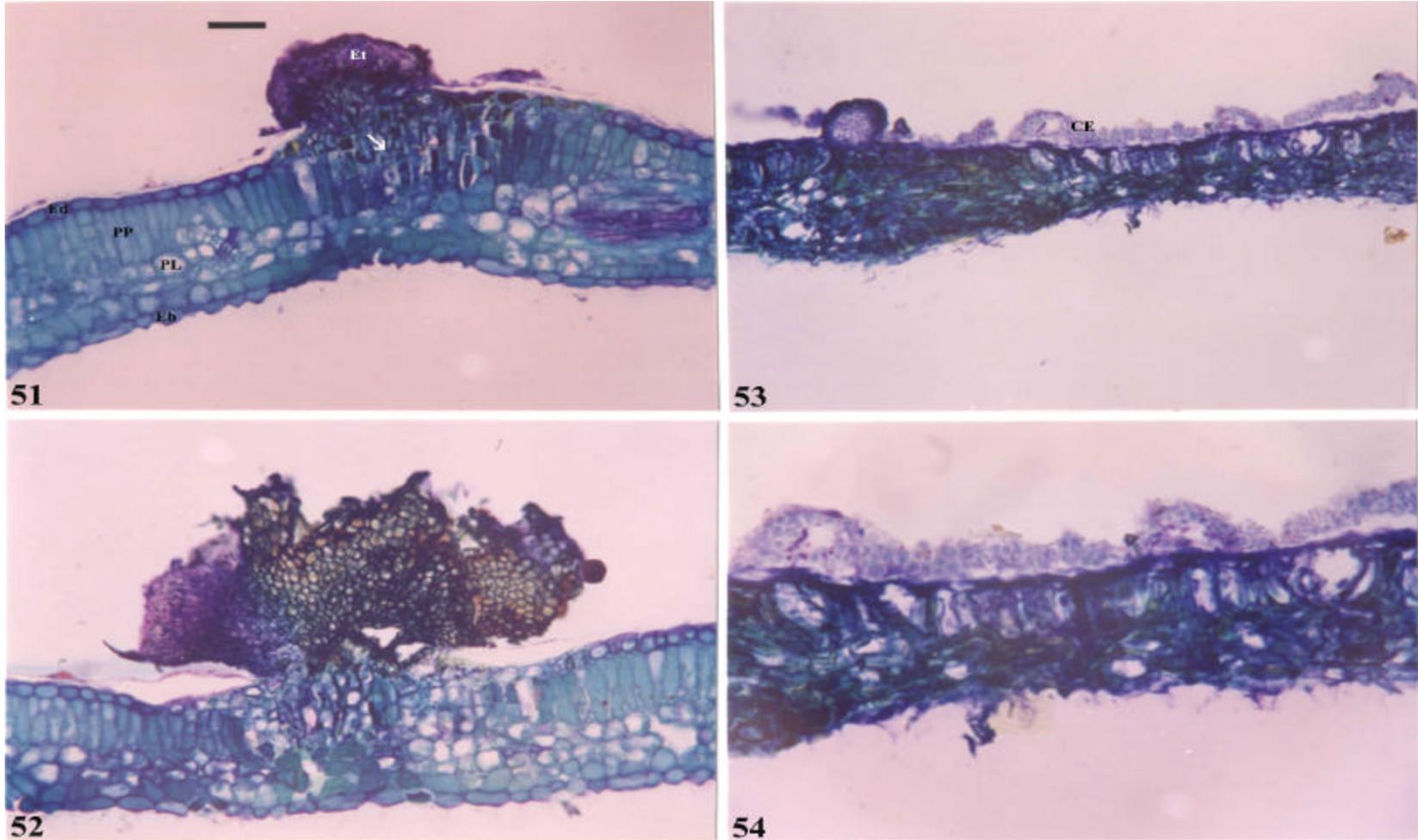
Figuras 39 a 42. Secções transversais da lesão foliar causada aos cinco dias após a inoculação do patógeno. 39. PB 314 (Barra = 45 μm); 40. PB 314 (Barra = 22,5 μm); 41. MDF 180 (Barra = 45 μm); 42. MDF 180 (Barra = 22,5 μm). Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima Lacunoso. Eb: Epiderme abaxial. C: Conidióforos e conídios.



Figuras 43 a 46. Secções transversais da lesão foliar causada aos 10 dias após a inoculação do patógeno. 43. PB 314 com degeneração dos tecidos (Barra = 45 μm); 44. PB 314 (Barra = 22,5 μm); 45. MDF 180 (Barra = 45 μm); 46. MDF 180 (Barra = 22,5 μm). Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima Lacunoso. Eb: Epiderme abaxial. C: Conidióforos e conídios.



Figuras 47 a 50. Secções transversais da lesão foliar causada aos 45 dias após a inoculação do patógeno. 47. PB 314 com alteração no parênquima paliçádico (?) na região da formação do estroma (Barra = 45 μm); 48. PB 314 (Barra = 22,5 μm); 49. MDF 180 com degeneração dos tecidos e presença de fenóis com coloração esverdeada (Barra = 45 μm); 50. MDF 180 (Barra = 22,5 μm). Et: Formação estroma. Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima Lacunoso. B: Bainha do feixe. Eb: Epiderme abaxial. C: Conidióforos e conídios.



Figuras 51 a 54. Secções transversais da lesão foliar causada aos 90 dias após a inoculação do patógeno. 51. PB 314 com alteração no parênquima paliçádico (?) na região do estroma (Barra = 45 μ m); 52. PB 314 (Barra = 22,5 μ m); 53. MDF 180 com formação de células estromáticas, degeneração dos tecidos e presença de fenóis com coloração esverdeada (Barra = 45 μ m) 20x; 54. MDF 180 (Barra = 22,5 μ m). Et: Estroma imaturo. Ed: Epiderme adaxial. PP: Parênquima Paliçádio. PL: Parênquima Lacunoso. Eb: Epiderme abaxial. CE: Células Estromáticas mal formadas.

6.3 Considerações finais

A presença de fenóis e a degradação do tecido foliar podem ser consideradas uma resposta de resistência do clone MDF 180 ao fungo, pois de acordo com Griffey & Leach (1965), as necroses são consideradas mecanismos de defesa pela criação de uma barreira ao fluxo de água e nutrientes para o patógeno.

As plantas apresentam mecanismos de resistência, sendo mais ou menos eficientes quando comparadas, conferindo resistência ou suscetibilidade às mesmas. Existem vários tipos de resistência, que podem ter natureza estrutural e/ou bioquímica, pré ou pós-formada à infecção (Agrios, 1997).

Os fatores de resistência pré-formados mais comuns são: a cutícula, apesar de Blasquez & Owen (1963) e Hashim et al. (1978), não considerá-la uma barreira na penetração de *M. ulei*, tanto em folhas velhas como em folhas jovens de clones resistentes; as paredes celulares espessas, que impedem a colonização; e a presença de tricomas, para alguns fungos também é importante para a resistência. Os fatores de resistência estruturais pós-formados mais encontrados na literatura são papilas, halos, agregação citoplasmática, camada de abscisão, tiloses e a lignificação, sendo esta última mais importante. Segundo Garcia et al. (1995b), a lignificação intensiva pode ser responsável pela presença do fungo dentro da zona necrótica em clones parcialmente resistentes, concluindo que o ciclo do fungo, com o estabelecimento da forma sexual ao redor dessa zona de infecção nos clones mais suscetíveis, é retardado ou parado em clones que apresentam forte lignificação. Em clones totalmente resistentes, a lignina mostra um papel menos importante na reação de defesa, porque estes apresentam uma produção dominante de fitoalexina na reação de hipersensibilidade. Isso pode explicar os resultados obtidos nesse trabalho com os clones MDF 180 e Fx 2784, respectivamente.

Paralelamente a estes fatores anatômicos de resistência existem os fatores bioquímicos pré e pós-formados, sendo os mais evidenciados os fenóis e as fitoalexinas. Os fenóis têm grande ênfase na resistência de clones de seringueira ao *Microcyclus ulei*. Segundo Gasparotto et al. (1997), os fenóis ou inibem a germinação dos patógenos ou modificam a atividade do ácido indol acético oxidase (AIA oxidase), atuando, assim, sobre a regulação das auxinas, agindo ainda sobre a germinação dos esporos e

crescimento das hifas. Para Sanier et al. (1992), quando compostos fenólicos não apresentam papel ativo na resistência, eles possivelmente são usados como marcadores de resistência ou de suscetibilidade.

Os clones estudados responderam de maneira diferente quando inoculados com o fungo.

O clone PB 314 apresentou todas as fases do ciclo do patógeno: houve a infecção, ainda no estágio foliar B₂ e a subsequente colonização dos tecidos, a esporulação conidial no estágio foliar C, representando a fase assexuada e, posteriormente, a formação de estromas imaturos na face adaxial da folha (estágio D), indicando que os ascos maduros devem ocorrer a partir do quinto mês. Segundo Brignani Neto et al. (1991), essa relação patógeno-hospedeiro pode variar entre clones. Portanto, o fungo completa seu ciclo no PB 314, representando a suscetibilidade desse clone nas fases assexuada ou conidial e sexuada ou ascógena. A fase de liberação de ascósporos não foi representada nesse trabalho devido a essa fase ocorrer ao redor de 135 dias após a inoculação. O PB 314, sendo assim, não parece apresentar nenhum fator eficiente de resistência, pré ou pós-formado, passivo ou ativo. Por ser um clone asiático, de origem malaia, é considerado suscetível, não sendo indicado para regiões onde ocorrem surtos epidêmicos da doença. Na Ásia, o melhoramento genético da seringueira visou somente produção de borracha e não resistência à doença, pois esta ainda não ocorre nessa região. A Ásia é considerada a maior produtora mundial de borracha, embora o Brasil seja o berço das espécies do gênero (Gonçalves et al., 2002).

O MDF 180, clone primário de origem peruana, apresentou um comportamento único, até agora desconhecido na literatura, o qual impede uma das fases do ciclo do fungo, a sexuada ou estromática. Esse estudo confirmou as observações de campo, a respeito desse clone, na Plantações Michelin da Bahia. A produção acentuada de fenóis a partir de 45 dias após inoculação do fungo parece estar totalmente relacionada com o impedimento da fase sexuada, pois se observa a presença de células estromáticas mal formadas que não evoluem para estromas. Esse clone pode ser considerado de grande importância para a heveicultura, pois impede a principal fonte de inóculo primária,

responsável pelo reinício de epidemias do mal das folhas após o reenfolhamento das plantas e o aumento da variabilidade do fungo, já que não ocorre a fase sexuada do mesmo. Esse último aspecto tem muito valor para a conservação da resistência do hospedeiro.

O Fx 2784 apresentou uma reação de resistência ainda maior, impedindo a infecção pelo fungo nas folhas jovens (estágio B₂). A maior espessura da epiderme abaxial nesse estágio pode ser considerada um componente de resistência. Assim como, pode estar associada a uma reação de hipersensibilidade.

O conhecimento dos fatores que impedem a formação da fase sexuada do fungo tem grande valia em futuros programas de melhoramento. Segundo Rivano et al., citado por Berger (1992), é indispensável identificar o máximo possível de componentes ligados à resistência, o que poderia conferir à planta um nível de resistência horizontal satisfatório. Esse tipo de resistência é interessante no caso de *Microcyclus ulei*, pois de acordo com Gasparotto & Ferreira (1989), esse fungo apresenta alta variabilidade e, segundo Furtado & Menten (1995), apresentam 23 raças diferentes. Mattos* relatou que essas raças têm capacidade distinta de esporulação entre os clones.

A utilização de cortes histológicos apresentou-se como técnica eficiente para a caracterização dos estágios foliares de seringueira. Hallé et al. (1978) definiram os estágios foliares da seringueira em A, B (B₁ e B₂), C e D, de acordo com a ontogenia foliar, representando-os na forma de diagrama e descrevendo-os através de características subjetivas. As mensurações dos fatores anatômicos, estudados nesse trabalho, permitem distinguir os estágios B₂, C e D, que podem ser denominados apenas de B, C e D, de uma maneira quantitativa, o que complementa as descrições de Hallé et al. (1978), facilitando a utilização dos mesmos sem deixar dúvidas. Essa técnica permitiu também caracterizar as diferentes fases do ciclo do fungo e suas possíveis alterações no hospedeiro.

* MATTOS, C.R.R. (Plantações Michelin da Bahia Ltda., Ituberá-BA). Comunicação pessoal, 2002.

7 CONCLUSÕES

Os caracteres anatômicos permitiram diferenciar três estágios foliares da seringueira denominados B, C e D.

A espessura da epiderme da face abaxial da folha pode ser considerada um fator de resistência à infecção e colonização do fungo no clone Fx 2784.

Quanto à resistência, o clone PB 314 apresentou uma reação de suscetibilidade, o MDF 180 reação moderadamente resistente e o Fx 2784 resistência completa.

O clone MDF 180 não formou tecidos estromáticos e, conseqüentemente, não apresentou esporulação ascógena do fungo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635/p.

ARDUIN, M.; KRAUS, J.E. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. p. 23-26.

BERGAMIN FILHO, A. Alternativas para o controle do mal das folhas da seringueira: uma revisão. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.8, n.3/4, p.65-74, 1982.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289/p.

BERGAMIN FILHO, A.; CARDOSO, C. O. N. Doenças da seringueira. In: GALLI, F. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v. 2, cap. 32, p. 459-471.

BERGER, P. **Lês composes phenoliques foliaires de l'hevea et leur implication dans la resistance a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Et *Microcyclus ulei* Henn.** 1992. 235 f. These (Doct.) - Universite Montpellier II, Montpellier, 1992.

BLASQUEZ, C. H.; OWEN, J. H. Histological studies of *Dothidella ulei* on susceptible and resistant *Hevea* clones. **Phytopathology**, St. Paul, v.53, n.1, p.58-65, 1963.

BRIGNANI NETO, F.; FURTADO, E. L.; CARDOSO, R. M. G.; OLIVEIRA, D. A.; ROLIM, P. R. R. Efeito de fungicidas sistêmicos no ciclo biológico de *Microcyclus ulei*, agente causal da queima da folha da seringueira (*Hevea* spp.). **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.17, n.3/4, p.238-246, 1991.

CAMARGO, A.P.; CARDOSO, R.M.G.; SCHMIDT, N.C. Comportamento do mal-das-folhas da seringueira nas condições do planalto. **Bragantia**, Campinas, v.26, p.1-8, 1967.

CHEE, K. H. Assessing susceptibility of *Hevea* clones to *Microcyclus ulei*. **Annals of Applied Biology**, v.84, p.135-145, 1976a.

CHEE, K. H. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. **Annals of Applied Biology**, v.84, p.147-152, 1976b.

CHEE, K. H. South American leaf blight of *Hevea brasiliensis*: spore dispersal of *Microcyclus ulei*. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.84, p.147-152, 1976.

CHEE, K. H. The suitability of environmental conditions in Asia for the spread of South American leaf blight of *Hevea* rubber. **Planter**, Kuala Lumpur, v.56, p.445-454, 1980.

DOP, P.; GAUTIÉ, A. 1928. **Manual de technique botanique**. 2. ed. J. Lamane, Paris. 594/p.

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

FURTADO, E.L.; MENTEN, J.O.M. Cultivares da seringueira para a identificação de raças de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. No Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, suplemento, p.345, 1995.

GARCIA, D. **Contribution à l'étude de la résistance totale et partielle dans l'interaction hôte x parasite *Hevea* spp. – *Microcyclus ulei***: aspects histologiques et biochimiques des réactions impliqués dans ces résistances. 1995. 216 f. ThPse (Doct.) - University of De Montpellier II, Montpellier, 1995.

GARCIA, D.; CAZAUX, E.; RIVANO, F.; D'AUZAC, J. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. **Eur. J. For. Path.**, Berlin, v.25, p.282-292, 1995b.

GARCIA, D.; SANIER, C.; MACHEIX, J.J.; D'AUZAC, J. Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P.Henn.) v. Arx and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, p.213-223, 1995a.

GARCIA, D.; TROISPOUX, V.; GRANCE, N.; RIVANO, F.; D'AUZAC, J. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. **Eur. J. For. Path.**, Berlin, v. 29, p.323-338, 1999.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F. A. Mal das folhas da seringueira. In: FERREIRA, F. A. **Patologia florestal** – principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. p.289-313.

GASPAROTTO, L.; FERREIRA, F. A.; LIMA, M. I. P. M.; PEREIRA, J. C. R.; SANTOS, A. F. **Enfermidades da Seringueira no Brasil**. Manaus: CPAA-EMBRAPA, 1990. 169/p. (Circular Técnica, 3).

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A. F.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, F. A. **Doenças da Seringueira no Brasil**. Brasília: SPI-EMBRAPA, 1997. 168/p.

GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D. R.; SILVIA, H. M. **Doenças da Seringueira**. Manaus: CNPSD-EMBRAPA, 1984. p.1-71. (Circular Técnica, 4).

GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology**: some fundamental principles. Germany: Leica GmbH, 1991. 80/p.

GIESEMANN, A.; BIEHL, B.; LIEBEREI, R. Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Journal of Phytopathology**, v.117, p.373-376, 1986.

GONÇALVES, P.S., SAES, L.A.; FURTADO, E.L.; SAMBUGARO, R.; SAKAI, M. Clones promissores de seringueira para a região do Vale do Ribeira, São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2343-2353, 2000.

GONÇALVES, P.S.; BORTOLETTO, N.; FURTADO, E.L.; SAMBUGARO, R.; BATAGLIA, O.C. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 selecionados para a região noroeste do Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.4, p.589-599, 2001.

GONÇALVES, P.S.; MARTINS, A.S.M.; FURTADO, E.L., SAMBUGARO, R.; OTTATI, E.L.; ORTOLANI, A.A.; GODOY JÚNIOR, G. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p.131-138, 2002.

GRIFFEY, R.T.; LEACH, J.G. The influence of age tissue on the development of bean anthracnose lesion. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, n.8, p.915-918, 1965.

HALLÉ, F.; OLDEMAN, R.A.; TOMLINSON, P.B. **Tropical trees and forest**. Berling: Springer-Verlag, 1978. 441/p.

HASHIM, I. Induced resistance of Hevea to South American Leaf Blight by incompatible races of *Microcyclus ulei*. **Journal Natural of Rubber Research**, v.1, n.3, 195p., 1986.

HASHIM, I.; WILSON, L. A.; CHEE, K. H. Regulation of indole acetic acid oxidase activities in *Hevea* by naturally occurring phenolics. **Journal Rubber Research Institute of Malaysia**, v.26, n.3, p.105-111, 1978.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523/p.

JUNQUEIRA, N.T.V. **Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx**. 1985. 134 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G. M.; ZAMBOLIM, L.; ALFENAS, A. C.; GASPAROTTO, L. Reação de clones de seringueira a vários isolados de *Microcyclus ulei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.23, p.887-893, 1988.

JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L.; ROMEIRO, R.S.; GASPAROTTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. **Revista Ceres**, v.31, n.177, p.322-331, 1984.

LIEBEREI, R. Cyanogenesis of *Hevea brasiliensis* during infection with *Microcyclus ulei*. **Journal of Phytopathology**, v.115, p.134-146, 1986.

LIEBEREI, R. **Studies on morphological and physiological factors of *Hevea* species, responsible for resistance to infection with *Microcyclus ulei*, the causal agent of SALB.** Manaus: CNPSD-EMBRAPA, 1981.

LIEBEREI, R.; BIEHL, B.; GIESEMANN, A.; JUNQUEIRA, N.T.V. Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants. **Plant Physiology**, v.90, p.33-36, 1989.

LIEBEREI, R.; SCHRADER, A.; BIEHL, B.; CHEE, K.H. Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, v.31, n.3, p.227-235, 1983.

MACHADO, S.R.; GREGÓRIO, E.A.; YANAGIZAWA, Y.; CARMELLO, S.M. Ultrastructural aspects of the peltate glandular trichomes of the gynoecium in *Zeyheria digitalis* (uell.) Hoehne (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.18, p.197-205, 1995.

MATTOS, C.R.R. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.470, 1999.

MEDEIROS, A. G. **Novos conceitos técnicos sobre controle químico do mal das folhas da seringueira.** Itabuna: CEPLAC-CEPEC, 1976. 20/p. (Boletim Técnico, 35).

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** Oxford: Clarendon Press, 1957. v. 2, p. 1207-1235.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. **Protoplasma**, v.59, p.367-373, 1964.

ROCHA, H. M.; VASCONCELLOS FILHO, A. P. Epidemiology of the South American leaf blight of rubber in the region of Ituberá, Bahia, Brazil. **Turrialba**, v. 28, n.4, p.325-329, 1978.

SANIER, C.; BERGER, P.; COUPÉ, M.; MACHEIX, J. J.; PETAT, J. M.; RIVANO, F.; SAINT BLANQUAT, A.; D'AUZAC, J. Relationship between resistance to *Microcyclus ulei*

and clonal foliar phenolics of rubber trees. **Journal Rubber Research Institute of Malaysia**, v.7, n.1, p.38-59, 1992.

SANTOS, C. D. **Severidade do mal-das-folhas da seringueira e fases estromáticas de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx. em Viçosa, MG.** 1992. 25 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L. **Doenças da seringueira no Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto Biológico, 1995. 30/p. (Boletim Técnico, 7).

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy.** San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573/p.

TRINDADE, D.R.; FURTADO, E.L. Doenças da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. de Juss.) Muell. & Arg.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p.628-641.