

REAÇÃO DE DEZ CLONES DE SERINGUEIRA (*Hevea benthamiana*) A TRÊS ISOLADOS DE *Microcyclus ulei*

Alderí Emídio de ARAÚJO¹, Antonio N. KALIL FILRO², Márcia B. M. NÓBREGA¹, Nelcimar Reis SOUSA³, José Wellington dos SANTOS¹

RESUMO - Avaliou-se a reação de dez clones de seringueira (*Hevea benthamiana* Muell. Arg.) frente a três isolados de *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, pertencentes aos grupos de patogenicidade I e II, quanto aos parâmetros monocíclicos: período de incubação, período latente, diâmetro da lesão e tipo de reação. Inoculou-se uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml na superfície abaxial de folíolos nos estádios B I/B2, deixou-se por 24 horas em câmara úmida a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e transferiu-se para câmara de crescimento à mesma temperatura até a última avaliação aos 15 dias. A maioria dos clones testados apresentou resistência aos três isolados. Verificou-se ausência de interação entre clones e isolados com relação ao período de incubação, mas verificou-se interação altamente significativa entre clones e isolados em relação ao diâmetro de lesão. Os clones CNSAM 8218 e CNSAM 8219 foram altamente resistentes e apresentaram os menores diâmetros médios de lesão quando confrontados com o isolado EB I, diferindo significativamente dos demais. CNSAM 8212 também apresentou menor diâmetro de lesão frente ao isolado EB2. O CNSAM 8205, por sua vez, apresentou o maior diâmetro médio de lesão quando inoculado com o isolado EB1 e reação semelhante ao CNSAM 8204 quando inoculado com os isolados EB2 e MBI e ao CNSAM 8201 quando inoculado com o isolado EB2. Concluiu-se que os clones avaliados apresentaram resistência vertical, o que os torna impróprios para um programa de melhoramento genético de seringueira que vise a obtenção de materiais com resistência horizontal ao *M. ulei*.
Palavras-chave: Mal das folhas, resistência vertical

Reaction of Ten Clones of Rubber (*Hevea benthamiana*) to Three *Microcyclus ulei* Isolates

ABSTRACT - The reaction of ten rubber clones (*Hevea benthamiana*) to three isolates of *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx from two pathogenicity groups I and II was evaluated. The monocyclic parameters incubation period, latent period, lesion size and reaction type were studied. A conidial suspension of 2×10^5 conidial/ml was inoculated on the abaxial leaflet surface in the B I/B2 stage; the seedlings were placed a humid chamber during 24 hours at $24 \pm 1^\circ\text{C}$, then transferred to a growth chamber at the same temperature until the last evaluation at 15 days. The majority of the clones showed resistance to the three isolates. There was no significant interaction between clones and isolates in relation to incubation period, but there was significant interaction between clones and isolates in relation to lesion diameter. The clones CNSAM 8218 and CNSAM 8219 were highly resistant and showed the smallest mean lesion diameter when inoculated with isolate EB I, while CNSAM 8219 showed a small mean lesion diameter when inoculated with isolate EB2 also. At the other extreme, the clone CNSAM 8205 showed the largest mean lesion diameter when inoculated with isolate EB1 and the same reaction as clone CNSAM 8204 when inoculated with isolates EB2 and MBI and clone CNSAM 8201 when inoculated with isolate EB2. These clones show vertical resistance making their unsuitable for the rubber breeding program that plans to obtain clones with horizontal resistance to *M. ulei*.

Key-words: leaf blight, vertical resistance

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Caixa Postal 174, CEP 58.107-720, Campina Grande, PB.

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Caixa Postal 319, Guaraituba, CEP 83405-970, Colombo, PR

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental, Caixa Postal 319, CEP 69.011-970, Manaus, AM.

INTRODUÇÃO

O mal-das-folhas, causado por *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, é a doença mais importante da seringueira (*Hevea spp.*) na América Latina. No Brasil, encontra-se presente em todas as regiões onde se cultiva a *Hevea*, causando perdas significativas à produção, especialmente na Amazônia, no Sudeste da Bahia e em alguns municípios do Estado de Mato Grosso (Gasparotto *et al.*, 1990; Kalil Filho & Junqueira, 1989).

As tentativas infrutíferas de cultivo da seringueira em Fordlândia e Belterra, no Pará, determinaram o início das pesquisas visando o melhoramento genético pela companhia Ford, em 1937, que baseava-se no cruzamento entre clones produtivos e suscetíveis ao *M. ulei* com clones resistentes e de baixa produção (Valois, 1978). A princípio foram utilizados cruzamentos intraespecíficos de clones de *H. brasiliensis*, entretanto, em virtude da grande suscetibilidade dos genótipos obtidos, tomou-se necessário utilizar fontes de germoplasma de outras espécies de *Hevea* resistentes ao patógeno (Brasil Sudhevea, 1971; Valois, 1978).

Os híbridos obtidos de cruzamentos entre *H. brasiliensis* x *H. guianensis*, *H. brasiliensis* x *H. microphylla* e *H. brasiliensis* x *H. spruceana* não atenderam aos objetivos preconizados pelo programa e foram descartados, enquanto os híbridos de *H. brasiliensis* x *H. benthamiana* constituíram-se em fontes de resistência nos programas de melhoramento genético da

cultura (Valois, 1978). O clone F 4542 (*H. benthamiana*) foi a principal fonte de resistência utilizada nos cruzamentos (Junqueira *et al.*, 1992).

Em geral, os híbridos apresentavam resistência vertical (Chee *et al.*, 1986), que era quebrada quando os clones eram plantados em regiões úmidas da Amazônia, com condições ecológicas diferentes das regiões de obtenção dos clones. A resistência vertical dos híbridos propiciavam o aparecimento de novos patótipos do patógeno, virulentos ao germoplasma melhorado (Chee *et al.*, 1986; Gasparotto *et al.*, 1990; Kalil Filho & Junqueira, 1989; Miller, 1986; Paiva & Gonçalves, 1989).

O estudo dos principais componentes de resistência de alguns clones apontava para a possibilidade de obtenção de genótipos com resistência horizontal (Junqueira *et al.*, 1988). Dentre os clones avaliados no antigo CNPSD-EMBRAPA, o IAN 6158 foi considerado promissor por apresentar bom nível de resistência horizontal, bom potencial produtivo e qualidade do látex satisfatória (Kalil Filho & Junqueira, 1989). Este clone passou a ser empregado intensivamente em programas de cruzamentos, havendo expectativa de utilização de outros clones de *H. benthamiana*, desde que apresentassem resistência horizontal ao *M. ulei*. O objetivo do trabalho foi avaliar clones de *Hevea benthamiana*, visando identificar fontes de resistência horizontal a isolados de *M. ulei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Testaram-se dez clones de *Hevea benthamiana* (CNSAM 8201, 8202,

8203, 8204, 8205, 8214, 8216, 8218, 8219, 8224), coletados em 1982 na região do Rio Padauri nos municípios de Barcelos, Amazonas e de Belterra, Pará.

Os isolados testados pertencem aos grupos de patogenicidade I e 11, de acordo com a classificação de Junqueira (1985): Embrapa 1 (EB 1), Embrapa 2 (EB2) e Montebor 1 (ME 1). Os isolados EB 1 e EB2 foram obtidos, respectivamente, dos clones IAN 717 e Fx 4098, em áreas experimentais distintas no Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental, em Manaus, AM, enquanto o isolado ME 1 é procedente de plantio comercial do clone IAN 6158 (*H. brasiliensis* x *H. benthamiana*) no município de Presidente Figueiredo-AM. Após isolamento monospórico, os isolados foram cultivados em meio de Batata-Sacarose-Ágar (BSA) enriquecido com um complexo vitamínico de nome comercial Panvit (Junqueira *et al.*, 1986) e mantidos *in vivo* por meio de inoculações sucessivas nos clones IAN 717 (suscetível a isolados do grupo I) e Fx 4098 (suscetível a isolados do grupo 11), mantendo-se os clones em câmara de crescimento a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 85%.

A inoculação foi feita com uma suspensão de 2×10^5 conídios/ml obtida de lesões esporulantes em clones suscetíveis, os quais haviam sido previamente inoculados com uma suspensão de conídios na mesma concentração, obtida a partir do crescimento do fungo em tubos de ensaio, contendo meio de Batata-

Sacarose-Ágar (BSA), enriquecido com um complexo vitamínico de nome comercial Panvit. A suspensão foi aplicada na superfície abaxial de folíolos nos estádios B //B2 (Junqueira *et al.*, 1989), utilizando-se um pequeno pulverizador modelo Paashe air brush H3, Chicago (Junqueira *et al.*, 1988). Inocularam-se quatro plantas por genótipo e seis folíolos por planta. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida a $24 \pm 10^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 95%, no escuro, durante 24 horas, e transferidas posteriormente para câmaras de crescimento à mesma temperatura e umidade relativa acima de 85%, onde permaneceram por 15 dias após a inoculação, duração necessária para o término das avaliações.

Nas avaliações foram medidos período de incubação, período latente, diâmetro de lesão, tipo de lesão e tipo de reação. O tipo de reação foi avaliado com a escala proposta por Junqueira *et al.* (1989):

- 0 - Lesões cloróticas com diâmetro inferior a 1 mm sem esporos
- 1 - Lesões necróticas com diâmetro inferior a 1 mm sem esporos
- 2 - Lesões necróticas com diâmetro de 1 a 2 mm sem esporos
- 3A - Lesões necróticas com diâmetro superior a 2 mm sem esporos
- 3B - Lesões não necróticas, com diâmetro superior a 2,0 mm, sem esporos
- 4A - Lesões com diâmetro até 2 mm e esporulação apenas nas bordas
- 4B - Lesões com diâmetro superior a 2 mm e esporulação apenas nas bordas
- 5A - Lesões com diâmetro até 2 mm e esporulação parcial em toda a

superfície

5B - Lesões com diâmetro superior a 2 mm e esporulação parcial em toda a superfície

6 - Lesões com diâmetro até 1,5 mm e abundante esporulação na face abaxial

7 - Lesões com diâmetro entre 1,5 a 2,5 mm e abundante esporulação na face abaxial

8 - Lesões com diâmetro entre 1 a 2,5 mm e abundante esporulação na face abaxial

9 - Lesões com diâmetro superior a 2,5 mm e abundante esporulação na face abaxial

10 - Lesões com diâmetro superior a 2,5 mm com esporulação na face adaxial e abundante esporulação na face abaxial

Os genótipos foram enquadrados em cinco classes, com base nesta escala: Altamente Resistente - AR (0 - 1), Resistente - R (2 - 3), Moderadamente Resistente - MR (4 - 5), Suscetível - S (6 - 7), e Altamente Suscetível - AS (8 - 10).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 10 x 3 (dez clones e três isolados) com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela combinação dos fatores, totalizando 30 tratamentos. Procedeu-se a análise de variância das variáveis período de incubação e período latente, sendo as médias dos clones e isolados testados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sete dos clones testados

apresentaram resistência aos três isolados, um foi suscetível e 2 foram variáveis (Tab. 1). No entanto, nenhum clone apresentou todas as respostas esperadas, pois clones com genes de *H benthamiana*, sejam eles puros ou híbridos com *H. brasiliensis*, geralmente apresentam reação de suscetibilidade a isolados de *M ulei* pertencentes ao grupo I e resistência a isolados do grupo II (Junqueira, 1985; Junqueira *et al.*, 1986). Os clones avaliados apresentam características fenológicas típicas de *H benthamiana* e, conseqüentemente, esperava-se que os mesmos não apresentassem reação de suscetibilidade ao isolado de *M. ulei* pertencente ao grupo II (EB2), específico para clones com genes de *H brasiliensis*.

Embora os clones CNSAM 8201 a 8205, provenientes da região de Belterra, apresentassem características morfológicas típicas de *H. benthamiana*, não foram resistentes ao isolado do grupo II, específico para *H brasiliensis*, com exceção do clone CNSAM 8203. O clone CNSAM 8202, por sua vez, apresentou resistência moderada aos três isolados, caracterizada, principalmente, por um maior período latente (PL) e baixa esporulação do patógeno. Porém, este mesmo clone permitiu a esporulação do isolado pertencente ao grupo II (Tab. 1). É provável, assim, que os clones desta série não sejam puros mas, sim, híbridos naturais com *H. brasiliensis*. Kalil Filho (1994), ao caracterizar os padrões isoenzimáticos de alguns destes clones de seringueira, constatou que os clones CNSAM

8203, 8204 e 8205, apesar de possuírem características fenológicas de *H. benthamiana*, não possuem o alelo 3 da enzima álcool desidrogenase (ADH), característico desta espécie (Gasparotto *et al.*, 1992). Com base nessa observação e na reação dos referidos clones aos isolados testados, sugere-se que os mesmos sejam híbridos naturais de *H. brasiliensis* x *H. benthamiana*, com reação de resistência não típica de *H. benthamiana*.

Os clones CNSAM 8214, 8216, 8218, 8219 e 8224 foram resistentes ou altamente resistentes a todos os isolados. Estes clones são resultantes de material coletado em seringal de alta produção (0,5 a 2 l de látex/árvore/sangria) em prospecção realizada no município de Barcelos, Amazonas. Apresentaram características fenológicas de *H. benthamiana*, entretanto, não apresentaram reação de suscetibilidade

aos isolados do grupo I (EB 1 e MB 1), virulentos para esta espécie.

Baldwin Júnior (1947) afirmou que no centro primário de diversidade do gênero *Hevea* no alto Rio Negro, ocorrem híbridos que representam a maior parte das espécies existentes como consequência de uma ou mais espécies serem simpátricas. Esse fenômeno permite a hibridação introgressiva em tal dimensão que determinadas populações do gênero chegam a perder suas identidades originando ecotipos ou híbridos interespecíficos.

Supõe-se que a maioria dos genótipos caracterizados como *H. benthamiana* e o grande número de clones utilizados em cruzamentos como fontes de resistência ao *M. ulei*, provavelmente, são híbridos naturais com *H. brasiliensis*. Porém, há que se considerar que o melhoramento genético buscava resistência ao

Tabela 1. Reação de clones de seringueira (*Hevea benthamiana*) a três isolados de *Microcyclus ulei*

Clones	Isolados														
	EB1					EB2					MB1				
CNSAM	PI1	PL2	DL3	TL4	TR5	PI	PL	DL	TL	TR	PI	PL	DL	TL	TR
8201	3,0	7,0	1,5b	6	S	3,0	6,0	2,5c	8	AS	3,0	*	1,0ab	1	AR
8202	3,0	9,0	1,0ab	4A	MR	3,0	8,0	1,5b	5A	MR	3,0	9,0	1,5b	5A	MR
8203	3,5	*	1,0ab	2	R	3,0	*	1,0ab	3B	R	3,0	*	1,0ab	2	R
8204	3,0	*	1,5b	3B	R	2,5	7,0	2,5c	7	S	3,5	5,0	2,5c	7	S
8205	2,0	5,0	3,0c	10	AS	2,5	6,0	2,5c	7	S	3,0	6,0	3,0c	9	AS
8214	4,0	*	1,0ab	2	R	3,0	*	1,0ab	2	R	4,0	*	1,0ab	2	R
8216	3,0	*	1,0ab	2	R	3,0	*	1,0ab	2	R	3,0	*	1,0ab	2	R
8218	3,0	*	0,5a	1	AR	3,0	*	1,0ab	2	R	2,0	*	0,5a	1	AR
8219	3,0	*	0,5a	1	AR	3,5	*	0,5a	1	AR	3,0	*	1,5b	3B	R
8224	3,0	*	1,5b	2	R	3,0	*	1,0ab	2	R	2,5	*	1,0ab	2	R

¹Período de incubação (dias); ²Período Latente (Dias); ³Diâmetro Médio da Lesão (mm) – médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ⁴Tipo de Lesão (escala); ⁵Tipo de Reação (escala); *Não esporulou. Isolados EB1 (Embrapa 1), EB2 (Embrapa 2), MB1 (Montebor 1).

referido patógeno em materiais genéticos com genes de *H. benthamiana*, não importando se eram ou não híbridos e sim que tipo de resistência apresentavam. Programas de melhoramento genético visando resistência ao mal-das-folhas devem considerar o caráter da resistência do material genético utilizado. Neste caso, a resistência horizontal é a que deve ser procurada, uma vez que a resistência vertical pode ser quebrada pelo surgimento de novas raças do patógeno (Bergamin Filho, 1982; Van der Plank, 1968, 1978).

O isolado MB 1 foi considerado altamente virulento para o clone IAN 6158 (híbrido *H. brasiliensis* x *H. benthamiana*), tendo sido responsável por um surto de mal-das-folhas em plantio comercial. Junqueira *et al.* (1989) testaram um grande número de isolados de *M. ulei* e mostraram que o mesmo clone IAN 6158 apresentava resistência incompleta a alguns isolados e resistência completa a outros, não tendo sido observadas reações de alta suscetibilidade.

Assim, procurou-se caracterizar o tipo de resistência apresentado pelo material genético avaliado com base nas variáveis quantitativas: período de incubação, período latente e diâmetro da lesão. Entre clones e isolados, verificou-se interação altamente significativa em relação à variável diâmetro da lesão. A presença de interação diferencial entre raças e variedades é um pressuposto básico para se determinar o caráter vertical da resistência (Bergamin Filho & Kimati, 1978). Na maioria dos casos, os

maiores diâmetros de lesão estiveram sempre associados à maior esporulação e, por conseguinte, a reações de suscetibilidade.

A análise do desdobramento entre clones e isolados em relação à variável diâmetro de lesão permitiu constatar que a reação dos clones de *Hevea* ao *M. ulei* é dependente do isolado. Os clones CNSAM 8218 e 8219 apresentaram os menores diâmetros médios de lesão quando confrontados com o isolado EB 1, diferindo significativamente dos demais, sendo que este último apresentou, também, menor diâmetro de lesão quando inoculado com o isolado EB2. O clone CNSAM 8205, por sua vez, apresentou o maior diâmetro médio de lesão, quando inoculado com o isolado EB 1, e apresentou reação semelhante ao clone CNSAM 8204, quando inoculado com os isolados EB2 e MB 1, e ao clone CNSAM 8201 quando inoculado com o isolado EB2 (Tab. 1). A interação diferencial significativa entre clones e isolados em relação ao diâmetro da lesão constitui um indicativo de resistência completa ou do tipo vertical. Um aspecto importante a ser considerado neste contexto é a ausência de esporulação na maioria dos genótipos estudados. Esta reação é a que reduz o inóculo inicial (x₀) e não a taxa de crescimento da doença (x), importante no dimensionamento do nível de resistência horizontal de um genótipo (Parlevliet, 1979). Com base nos resultados obtidos não se considera recomendável o uso do material genético estudado como fonte de

resistência horizontal a *M. uley*.

CONCLUSÃO

A utilização destes genótipos como fonte de resistência a *M. ulei* não é recomendável, uma vez que apresenta características típicas de resistência vertical, incompatível com um programa de melhoramento de seringueira visando resistência a *M. uley*.

Bibliografia citada

- Baldwin Júnior, T. 1947. *Hevea*, a first interpretation. *Heredity*, 38:54-64.
- Bergamin Filho, A.; Kimati, H. 1978. Variedades Resistentes. In: Galli, F.; Tokeshi, H.; Carvalho, P. C. T.; Balmer, E.; Kimati, H.; Cardoso, C. O. N.; Salgado, C. L.; Krugner, T. L.; Cardoso, E. J. B. N. & Bergamin Filho, A. *Manual de Fitopatologia*. Ceres, Piracicaba. 373p.
- Bergamin Filho, A. 1982. Alternativas para o controle do mal-das-folhas da seringueira: uma revisão. *Summa Phytopathologica*, 8(3/4):65-74.
- Brasil Sudhevea. 1971. O gênero *Hevea*, descrição das espécies e distribuição geográfica. Ministério da Indústria e Comércio, Superintendência da Borracha (Plano Nacional da Borracha), Rio de Janeiro. 428p.
- Chee, K.H.; Darmono, T.W.; Santos, A.F. 1986. Laboratory screening of fungicides using cellulose film and leaf discs against South American leaf blight pathogen, *Microcyclus ulei*. *Journal of Natural Rubber Research*, 1(2):98-103.
- Gasparotto, L.; Ferreira, F.A.; Lima, M.I.P.M.; Pereira, J.C.R.; Santos, A.F. 1990. *Enfermidades da seringueira no Brasil*. Circular Técnica 3, EMBRAPA-CPAA, Manaus. 169p.
- Gasparotto, L.; Araujo, A.E.; Lima, M.I.P.M.; Santos, A.F. 1992. Surto do mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*) em seringal enxertado de copa do clone IAN 6158 em Manaus-AM. *Fitopatologia Brasileira*, 17 (suplemento): 192. Resumo.
- Junqueira, N.T.V. 1985. *Variabilidade fisiológica de Microcyclus ulei (P.Henn)* v. Arx. Tese Doutorado, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 135 p.
- Junqueira, N.T.V.; Chaves, G.M.; Zambolin, L.; Gasparotto, L.; Alfenas, X.C. 1986. Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*, 11(4):823-834.
- Junqueira, N.T.V.; Chaves, G.M.; Zambolin, L.; Alfenas, A.C.; Gasparotto, L. 1988. Reação de clones de seringueira a vários isolados de *Microcyclus ulei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 23(8):877-893.
- Junqueira, N.T.V.; Gasparotto, L.; Lieberei, R.; Normando, M.C.S.; Lima, M.I.P.M. 1989. Especialização fisiológica de *Microcyclus ulei* em diferentes espécies de seringueira: identificação de grupos de patótipos. *Fitopatologia Brasileira*, 14 (2): 147. Resumo.
- Junqueira, N. T. V., Kalil Filho, A. N.; Araújo, A. E. 1992. Genética da resistência da seringueira ao *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*, 17(2): 149. Resumo.
- Kalil Filho, A.N. 1994. *Associação entre padrões isoenzimáticos de clones de seringueira (Hevea spp.) e resistência ao Microcyclus ulei (P. Henn.)* v. Arx. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 97p.
- Kalil Filho, A.N.; Junqueira, N.T.V. 1989. *Bases e procedimentos para o programa de melhoramento de seringueira no CNPSD-Manaus, AM*. Documentos 8, EMBRAPA-CNPSD, Manaus. 13p.
- Miller, J.W. 1986. Differential clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidela ulei*. *Plant Disease Reporter*, 30 (3): 187-190.
- Paiva-Lk.; Gonçalves, P.S. 1989. *Eficiência do programa de melhoramento da seringueira no Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê - nove anos de experiências*. Boletim de Pesquisa

2, EMBRAPA-CNPQSD, Manaus. **41p**

Parlevliet, J. E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, 17: 203-22.

Vaióis, A. C. C. 1978. *Melhoramento genético de seringueira*. Curso de Especialização em Heveicultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém. 24p. mimeografado.

Van Der Plank, J.E. 1968. *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York. 196p.

Van Der Plank, J.E. 1978. *Genetic and molecular basis of plant pathogenesis*. Springer-Verlag, New York. 167p.