

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**BRENO BENVINDO DOS ANJOS**

**DIAGNOSE E EPIDEMIOLOGIA DA SECA DO PAINEL DE SANGRIA DA  
SERINGUEIRA**

**ALEGRE**

**2018**

BRENO BENVINDO DOS ANJOS

**DIAGNOSE E EPIDEMIOLOGIA DA SECA DO PAINEL DE SANGRIA DA  
SERINGUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Fitossanidade (Fitopatologia).

Orientador: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes.

Coorientador: Edson Luiz Furtado.

Coorientador: Márcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientador: Samuel de Assis e Silva.

ALEGRE

2018

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

- Ad Anjos, Breno Benvindo dos, 1992-  
Diagnose e epidemiologia da seca do painel de sangria da seringueira / Breno Benvindo dos Anjos. - 2018.  
50 f. : il.
- Orientador: Willian Bucker Moraes.  
Coorientadores: Edson Luiz Furtado, Márcia Flores da Silva Ferreira, Samuel de Assis e Silva.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
1. Heveicultura. 2. Hevea brasiliensis. 3. Fusarium spp. 4. Seca do painel. 5. Sangria. I. Moraes, Willian Bucker. II. Furtado, Edson Luiz. III. Ferreira, Márcia Flores da Silva. IV. Silva, Samuel de Assis e. V. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. VI. Título.

CDU: 63

---

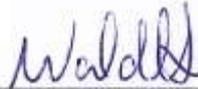
BRENO BENVINDO DOS ANJOS

**DIAGNOSE E EPIDEMIOLOGIA DA SECA DO PAINEL DE SANGRIA DA  
SERINGUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, linha de pesquisa em Fitossanidade (Fitopatologia)

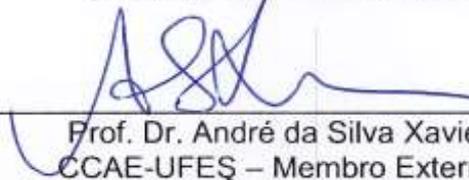
COMISSÃO EXAMINADORA

APRESENTADA: 16 de julho de 2018



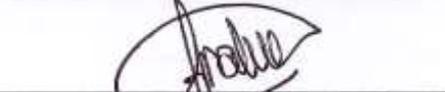
---

Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Júnior  
UFSCAR – Membro Externo



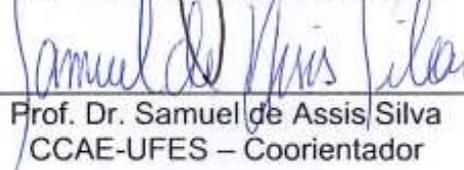
---

Prof. Dr. André da Silva Xavier  
CCAUE-UFES – Membro Externo



---

Prof. Dr. Fábio Ramos Alves  
CCAUE-UFES – Membro Interno



---

Prof. Dr. Samuel de Assis Silva  
CCAUE-UFES – Coorientador



---

Prof. Dr. Willian Bucker Moraes  
CCAUE-UFES - Orientador

*“A grande glória da vida não está em nunca cair, mas em se levantar a cada vez que caímos.”*

*(Nelson Mandela)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e iluminar o meu caminho;

Aos meus pais Claumir Alves dos Anjos e Rosilda Alves da Conceição Benvindo, ao meu irmão Bruno Benvindo dos Anjos, por toda dedicação, apoio, paciência, compreensão e esforço, que possibilitou essa importante conquista e muito mais que está por vir. Tenho imenso orgulho de fazer parte dessa família!

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram, sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e me dando força, em especial às minhas avós Edith Benvindo (*In memoriam*) e Cecília Alves do Anjos, por toda a torcida pelo meu sucesso;

Ao Professor Willian Bucker Moraes, pela amizade, confiança e orientação, desde o primeiro dia, tendo-o como exemplo de profissional e pessoa. Cada momento ao seu lado foi um grande aprendizado que levarei para minha vida!

Aos Professores Samuel de Assis Silva, Edson Luiz Furtado e à Professora Marcia Flores da Silva Ferreira pela orientação, apoio e ensinamentos;

A todos os integrantes da equipe que trabalharam no Laboratório de Manejo e Epidemiologia de Doenças de Plantas – LEMP/UFES, em especial aos integrantes Guilherme de Resende Camara, Rodolfo Ferreira Mendonça, Kaique Alves dos Santos, Ângelo de Oliveira Gonçalves e a Regina Gonçalves dos Santos Oliveira, pela amizade e apoio;

Aos integrantes do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, em especial a Francine Alves Nogueira de Almeida pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos produtores José Carlos e Neno que permitiram desenvolver essa pesquisa em suas áreas de produção de seringueira;

À minha amiga Tamyris de Mello, alguém muito especial que Deus colocou na minha vida. Sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando, obrigado pelo companheirismo, carinho e especialmente pela paciência de sempre!

Aos meus amigos Ronie Brunhara, Rodrigo Brunhara e Wesley Jhonny da Silva e Santos por toda a amizade durante todos esses anos pelas palavras de incentivo, carinho e companheirismo;

Ao Professor Dr. Antônio Fernando de Souza por possibilitar meu primeiro contato com a pesquisa e pela amizade;

Ao Professor Dr. Lusinério Prezotti pelo carinho e pela amizade;

A Madalena Caetano Capucho de Oliveira por toda compreensão e ajuda, durante o curso do programa de pós-graduação;

Ao centro de Ciências Agrárias e Engenharia e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, por me proporcionar a oportunidade de ingresso na pós-graduação;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

A FAPES e a UFES pelo auxílio financeiro do projeto;

Ao NUDEMAFI e ao LEMP por todo o suporte e infraestrutura;

A todos que torceram e acreditaram no meu sucesso, muito obrigado!

## RESUMO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Jussieu) Muell. Arg.] é a maior fonte de borracha natural. A produção de látex é influenciada por diversos fatores, entre eles: ambientais, sistema de sangria adotado, características genéticas dos clones e pelo ataque de patógenos. Os patógenos que atacam o painel de sangria da seringueira, causando a seca do painel, afetam diretamente a produção da borracha natural, além de inviabilizar a sangria das árvores doentes. Estima-se que a incidência dessa doença é de 12 a 50%, causando perdas de 12 a 14% para o setor, anualmente. A seca do painel de sangria é caracterizada pela parada parcial ou total da sangria das árvores em produção. Neste trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos associados à seca do painel de sangria da seringueira, e a dinâmica espaço-temporal da doença. Para caracterização molecular foram analisados os 58 isolados fúngicos, coletados das três regiões produtoras do estado do Espírito Santo, nos municípios de Mimoso do Sul, Guarapari e Pinheiros. Os isolados foram coletados em painéis de sangria sintomáticos dos clones FX 3864, SIAL 1005, IAN 6590, CDC 508, FDR 4575, FDR 5777, CDC 56 e CDC 312. A partir da ampliação da região ITS do DNA de cada isolado, foi realizada a identificação com base no nível de identidade verificado no GenBank. Foram realizadas 12 avaliações em duas áreas de cultivo de seringueira (clone FX 3864), nos municípios de Mimoso do Sul e Guarapari, para a análise da dinâmica espaço-temporal da doença. Ao todo, foram obtidos 58 isolados nas três áreas de coleta, sendo 22 isolados de Mimoso do Sul, 23 em Guarapari e 13 em Pinheiros. Análises morfológicas e moleculares revelaram que espécies do gênero *Fusarium* foram prevalentes em associação à seca do painel de sangria da seringueira. As espécies identificadas foram: *F. solani*, *F. lateritium* e *F. incarnatum*. Quanto à dinâmica temporal da seca do painel houve 100% de incidência da doença nas duas áreas, durante todas as avaliações. Os meses de outubro/16 a fevereiro/17, para as duas áreas, e dezembro/17 para Guarapari, foram os meses com a maior severidade da doença. Para a dinâmica espacial, a doença apresentou maior distribuição espacial na linha de plantio com tendência a agregação dos focos

Palavras-chave: Heveicultura, *Hevea brasiliensis*, *Fusarium* spp., Seca do painel, sangria.

## ABSTRACT

The rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. Jussieu) Muell. Arg.] is the largest source of natural rubber. The production of latex is influenced by several factors, among them: environmental, tapping system adopted, genetic characteristics of the clones and the attack of pathogens. The pathogens that attack the tapping panel of the rubber tree, causing the drought of the panel, directly affect the production of the natural rubber, besides preventing the tapping of diseased trees. It is estimated that the incidence of this disease is 12 to 50%, causing losses of 12 to 14% for the sector annually. The tapping panel dryness is characterized by the partial or total stoppage of bleeding of the trees in production. In this work, the objective was to perform the morphological and molecular characterization of the pathogens associated to the rubber tree tapping panel, and the spatio-temporal dynamics of the disease. For the molecular characterization, 58 isolates were collected in three different producing regions of the state of Espírito Santo, in the municipalities of Mimoso do Sul, Guarapari and Pinheiros. The isolates were collected on the bleeding panels of clones FX 3864, SIAL 1005, IAN 6590, CDC 508, FDR 4575, FDR 5777, CDC 56 and CDC 312. From the DNA of each isolate, each fungus was identified based on the identity level verified in GenBank. Twelve evaluations were carried out in two areas of rubber tree cultivation (clone FX 3864), in the municipalities of Mimoso do Sul and Guarapari, to analyze the spatio-temporal dynamics of the disease. Altogether, 58 isolates were obtained in the three collection areas, of which 22 were isolated from Mimoso do Sul, 23 from Guarapari and 13 from Pinheiros. The pathogen associated to the tapping panel dryness identified by the morphological and molecular characterization in the evaluated areas was the fungus of the genus *Fusarium* sp. The species identified were: *Fusarium solani*, *F. lateritium* and *F. incarnatum*. As for the temporal dynamics of the drought of the panel there was 100% incidence of the disease in both areas, during all evaluations. The months of October / 16 to February / 17, for the two areas, and December / 17 for Guarapari, were the months with the highest grade of the disease. For the spatial dynamics, the disease showed a clustered distribution, with tendency to aggregation of foci in the plant line.

**Keywords:** Rubber tree cultivation, *Hevea Brasiliensis*, *Fusarium*, Tapping panel dryness, tapping.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	16
Caracterização morfológica e molecular de fungos associados à seca do painel de sangria da seringueira no estado do Espírito Santo .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 02</b> .....	36
Dinâmica espaço-temporal da seca do painel de sangria da seringueira .....	36
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	48

## INTRODUÇÃO GERAL

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell. – Arg] é uma planta perene e nativa da bacia amazônica, que pertence à família Euphorbiaceae e tem sido cultivada comercialmente em áreas tropicais do mundo todo (UTHUP et al., 2011). O látex extraído da seringueira (polímero cis-1,4-poliisopreno) é utilizado amplamente em indústrias, sendo conhecido como borracha natural (DALL'ANTONIA et al., 2006; OBIANGA et al., 2009).

A borracha natural é a matéria-prima utilizada na fabricação de mais de 40.000 tipos de produtos, incluindo materiais hospitalares como, preservativos, luvas, cateteres entre outros. A borracha natural é principalmente usada na área pneumática, especificamente no setor de pneus radiais e pneus de avião. Também é utilizada na fabricação de calçados e adesivos, além de inúmeros produtos de engenharia e consumo (MOOIBROEK; CORNISH, 2000; IRSG, 2017). Devido às suas propriedades únicas, como resiliência, elasticidade ao impacto e abrasão, dispersão eficiente do calor e maleabilidade à temperatura fria, ainda não foi possível ser substituída por alternativas sintéticas (CORNISH, 2001).

Em todo o mundo, há mais de 2000 espécies de plantas que produzem látex, sendo a *H. brasiliensis* a única espécie na qual a extração é a mais viável economicamente. Embora seja uma planta nativa da floresta amazônica, a seringueira é amplamente cultivada no sudeste da Ásia (LI et al., 2016).

A expansão rápida da borracha natural para setores importantes da economia e a combinação com outras formas de borrachas especiais, acarretaram no aumento da demanda da borracha natural em todo o mundo (WU et al., 2017).

A demanda mundial por borracha natural cresce anualmente devido às propriedades físico-químicas típicas, que ainda não foram alcançadas pelos produtos sintéticos (SAINT BEUVE, 2012). Durante o período de 2010-2020, espera-se que ocorra um crescimento médio da produção de 4,6% ao ano, atingindo mais de 16 milhões de toneladas de borracha em 2020 (IRGS, 2017).

O continente Asiático responde por 92% da produção de borracha natural mundial, contribuindo com o maior volume de matéria-prima. Em 2017 a produção mundial de

borracha natural foi de aproximadamente 12.771 milhões de toneladas. Os maiores produtores no ano de 2017 foram: Tailândia (4.381.000 ton), Indonésia (3.230.000 ton), Vietnã (1.120.000 ton), China (840.000 ton), Índia (750.000 ton), Malásia (700.000 ton), Costa do Marfim (255.000 ton), Brasil (201.000 ton), Camboja (196.000 ton) e Sri Lanka (85.000 ton) (IRGS, 2017).

Em 2017, o Brasil apresentou uma produção de aproximadamente 201.000 toneladas de borracha natural, e uma área total de plantio de aproximadamente 146.552 mil hectares, sendo a produtividade média de 1.260 kg.ha<sup>-1</sup> de borracha seca (IBGE, 2017).

No Brasil, 16 estados se destacam na produção de borracha natural, São Paulo, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Pará, Paraná, Pernambuco, Acre, Rio de Janeiro, Amazonas, Tocantins e Rondônia (IBGE, 2017). O estado do Espírito Santo é o 4º produtor nacional de borracha natural, totalizando uma área de cultivo de 15 mil hectares plantados, sendo que a meta é atingir 75 mil hectares até 2030 (INCAPER, 2017).

A extração do látex das árvores é realizada por meio da sangria, que consiste na realização da remoção de pequenas porções da casca do tronco da seringueira com a finalidade de induzir o fluxo de látex. A realização desse procedimento ocasiona a perda de metabólitos, dessa forma é importante interromper o fluxo após um certo tempo para evitar a perda de látex e prevenir a entrada de patógenos (PRIYADARSHAN, 2011).

Nos últimos anos a utilização de clones com alto rendimento e a aplicação de ethephon (um precursor de etileno) fez com que houvesse um aumento substancial no rendimento de borracha, porém, esse rendimento pode ser afetado pela ocorrência da seca do painel de sangria, a qual interrompe o fluxo de látex (JIANG, 1997, CHEN et al., 2003). Estima-se que as perdas anuais para o setor heveicultor causadas pela seca do painel, estejam em torno de 12 a 14%, sendo a incidência nas áreas de 12 a 50% (CHEN et al., 2003).

O primeiro sintoma da seca do painel de sangria é o surgimento de áreas parcialmente secas ao longo do painel. No estágio mais avançado da seca, o painel de sangria fica completamente seco e sem fluxo de látex, afetando o rendimento da

cultura. Outros sintomas podem ocorrer em estágios mais avançados como escurecimento, espessamento e até mesmo descamação da casca (SOOKMARK et al., 2002)

A inspeção dos sintomas e dos sinais constituem a etapa inicial para diagnose das doenças. Para compreender o patossistema é necessário caracterizar e identificar o agente etiológico de uma doença, permitindo melhores planos de manejo (AMORIM et al., 2018). Para a identificação desse agente etiológico, diversas técnicas podem ser utilizadas como microscopia, testes imunológicos e análises moleculares (PUTNAM, 1995).

A identificação correta do agente causal é de fundamental importância para o conhecimento e manejo da doença, os métodos de identificação de espécies utilizados tradicionalmente às vezes podem ser demorados e pouco conclusivos, o que gera a demanda por novas técnicas, mais rápidas e com nível de confiabilidade maior (WARD et al, 2004). Os métodos baseados no DNA possibilitam uma análise mais precisa da variabilidade genética, desta forma é possível detectar alterações mutacionais em regiões com número limitado de genes que se expressam em enzimas (CORREL et al., 1993; SREENIVASAPRAD et al., 1994). O conhecimento a respeito da variabilidade genética dos patógenos torna-se de extrema importância por oferecer um suporte concreto que permite explicar uma gama de aspectos biológicos (FALEIRO et al., 2004).

Além da correta identificação do agente causal faz-se necessário entender o comportamento da doença, como é seu processo de desenvolvimento no tempo e no espaço, essas análises permitem compreender a sua interação com o hospedeiro e o ambiente, o que contribui de forma significativa para tomada de decisão e manejo adequado (BERGAMIN FILHO et al., 2004).

Dado o exposto, com este trabalho objetivou-se: (a) realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos associados à seca do painel de sangria da seringueira; e (b) compreender a dinâmica espaço-temporal da seca do painel de sangria da seringueira.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM et al. **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2018. v. 1. 573 p. il.

BERGAMIN FILHO, A., HAU, B., AMORIM, L., JESUS JUNIOR, W.C. **Análise espacial de epidemias**. In: VALE, F.X.R., JESUS JUNIOR, W.C. ZAMBOLIM, L. (Eds.) Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Editora Perffil. p. 193-240, 2004.

CHELLEMI, D. O.; ROHRBACH, K. G.; YOST, R. S.; SONODA, R. M. Analysis of the spatial pattern of plant pathogens on diseased plants using geostatistics. **Phytopathology**, n. 78, p. 221-226, 1988.

CHEN, S. et al. Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 1, p. 51-58, 2003.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1123–1134, 2001.

DALL'ANTONIA et al. Avaliação de Clones de Borracha Natural Crua por Ensaio Padrão e Análise Dinâmico-Mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.16, n. 3, p. 239-245, 2006.

FALEIRO, F. G. et al. Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro diferentes meios de cultura, visando extração de DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 312-315, 2004.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2012. 255p.

IBGE. **Lavoura permanente 2016**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=lavourapermanente2016>>. Acesso: em 5 dezembro de 2017.

INCAPER. Disponível em: <[http://www.incaper.es.gov.br/noticia\\_completa.php?id=2388](http://www.incaper.es.gov.br/noticia_completa.php?id=2388)>. Acesso em: 5 dezembro de 2017.

IRSG. International Rubber Statistical Group. Rubber Statistical Bulletin. Disponível em: <<http://www.rubberstudygroup.com/publications.aspx>>. Acesso em 5 janeiro 2018.

JIANG, J. S.; ZHOU, Z. Y. Prospects of science and technology for natural rubber in China. **Chinese Journal of Tropical Crops**, v. 21, p. 1–7, 1997.

LI, D. et al. Transcriptome analyses reveal molecular mechanism underlying tapping panel dryness of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Scientific Reports**, n. 6, 23540, 2016.

LIEBEREI, R. South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**, n. 100, p. 1125-1142, 2007.

MOOIBROEK, H.; CORNISH, K. Alternative sources of natural rubber. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 53, p. 355–365, 2000.

OBIANGA, N. L. E. Et al .Susceptibility of rubber trees to Loranthaceae in Gabon. **Journal of Plant Interact**, n. 4, p. 233-240, 2009.

PRIYADARSHAN, P.M. **Biology of Hevea rubber**. Rubber Research Institute of India, India. Wallingford, UK: CABI, 250 p, 2011.

PRIYADARSHAN, P. M.; GONÇALVES, P. S.; OMOKHAFE, K. O. **Breeding Hevea rubber**. In: JAIN, S. M.; PRIYADARSHAN, P. M., editor. In Breeding plantation tree crops: tropical species. New York: Springer, p. 469–522, 2009.

PUTNAM, M.L. Evolution of selected methods of plant disease diagnosis. **Crop Protection**, n. 14, p. 517-525, 1995.

SAINTE-BEUVE, J. Caoutchouc 2012. In: Cyclope 2012: les marchés mondiaux. **Economica**, Paris, p. 387–390, 2012.

SOOKMARK, U. et al. Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 1323–1333, 2002.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A. E.; MILLS, P. R. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotrichum* as *C. acutatum*. **Mycological Research**, v. 98, p. 186-188, 1994.

UTHUP, T. K. et al. Divergent DNA methylation patterns associated with abiotic stress in *Hevea brasiliensis*. **Molecular Plant**, v. 4, n. 6, p. 996-1013, 2011.

WARD, E.; FOSTER, S. J. FRAAIJE, B. A. McCARTNEY, H. A. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. **Annals of applied biology**, n. 145, p. 1-16, 2004.

WU, C. et al. Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate diphosphate decarboxylase gene from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Tree genetics & genomes**, v.13, n. 1, p. 13-22, 2017

## CAPÍTULO 1

Caracterização morfológica e molecular de fungos associados à seca do painel de sangria da seringueira no estado do Espírito Santo

**Resumo:** A ocorrência de patógenos associados ao painel de sangria da seringueira ganha destaque, por afetar o desenvolvimento das plantas e a produção do látex, matéria-prima da borracha natural. Com este trabalho, objetivou-se realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos associados ao painel de sangria da seringueira. Para a identificação dos fungos associados ao painel de sangria foram coletados fragmentos do painel em três municípios: Mimoso do Sul, Guarapari e Pinheiros. A partir dos isolamentos cada espécime fúngica foi submetida à caracterização morfológica e molecular. Para caracterização morfológica e análise molecular foram preparadas culturas monospóricas. A identificação molecular dos isolados foi realizada com base na região rDNA ITS. Ao todo foram obtidos 58 isolados nas três áreas avaliadas, sendo 22 isolados em Mimoso do Sul, 23 em Guarapari e 13 em Pinheiros. O fungo associado à seca do painel de sangria da seringueira identificado pela caracterização morfológica e molecular nas áreas avaliadas, foi o fungo do gênero *Fusarium* spp. Foram sequenciados 23 isolados. As espécies identificadas foram: *Fusarium solani*, *F. lateritium* e *F. incarnatum*. Este é o primeiro relato da ocorrência de *F. lateritium* na cultura da seringueira no Brasil e no mundo.

**Palavras-chave:** *Fusarium* spp., seca do painel, diagnose, *Hevea brasiliensis*, heveicultura.

**Abstract:** The occurrence of pathogens associated with the tapping panel dryness is highlighted, as they affect the development of plants and the production of latex, raw material of natural rubber. The objective of this work was to perform the morphological and molecular characterization of the pathogens associated with the rubber bleeding panel. For the identification of the pathogens associated to the tapping panel, fragments of the panel were collected in three municipalities: Mimoso do Sul, Guarapari and Pinheiros. From the isolates was carried out the morphological and molecular characterization of the isolates. Monosporic cultures were prepared for morphological characterization and molecular analysis. The molecular identification of the isolates was performed based on the ITS rDNA region. A total of 58 isolates were obtained in the three evaluated areas, of which 22 were isolated from Mimoso do Sul, 23 from Guarapari and 13 from Pinheiros. The pathogen associated to the tapping panel of the rubber tree identified by the morphological and molecular characterization in the evaluated areas was the fungus of the genus *Fusarium* sp. Twenty-three isolates were sequenced. The species identified were: *Fusarium solani*, *F. lateritium* and *F. incarnatum*.

**Keywords:** *Fusarium* spp., Tapping panel dryness, diagnosis, *Hevea brasiliensis*, Rubber tree cultivation.

## 1. INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell. – Arg] é uma espécie nativa da amazônica responsável por fornecer a borracha natural, matéria-prima para fabricação de produtos industriais. Atualmente é o único recurso de borracha natural comercialmente usado de alta qualidade (ZWART et al., 2015). A produção de borracha natural pode ser afetada por diversos fatores, um dos principais, são as doenças causadas por fungos que afetam o painel de sangria da seringueira, pois prejudicam diretamente a exploração de látex (FURTADO; TRINDADE, 2005).

A identificação de fungos fitopatogênicos tradicionalmente é feita pela caracterização morfológica, envolvendo a pigmentação das colônias, textura, velocidade de crescimento micelial, processo de formação, forma e tamanho de esporos (BURGESS et al., 1995). Nos últimos anos os métodos moleculares têm se destacado como ferramenta complementar à taxonomia de fungos e nos estudos de variabilidade genética em diferentes espécies fúngicas (JEEWON et al., 2013).

A utilização da análise molecular apresenta vantagens, pois não depende do estágio de desenvolvimento, plasticidade morfológica e facilidade de cultivo (SHARMA et al., 2013). O sequenciamento de genes ribossomais fornece uma rápida detecção e identificação dos fungos (BORMAN et al., 2008). A região do espaçador interno transcrito (ITS) é um dos alvos ribossomais mais utilizados para identificação (CHEN et al., 2000), pode ser amplificada a partir de um amplo espectro de fungos utilizando os primers ITS1 e ITS4 (CHEN et al., 2001).

As regiões do ITS do RNA ribossomal possuem regiões conservadas do DNA que auxiliam no estabelecimento das relações filogenéticas e na distinção das espécies (CHEN et al., 2004). A região do ITS do rDNA está localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA e pode ser amplificada utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos por PCR, o que tem se tornado prática comum para identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012)

A PCR é uma técnica empregada para amplificação de DNA, que vem sendo utilizada para os mais diversificados objetivos, incluindo a identificação de patógenos em plantas (LAU; BOTELLA, 2016). A PCR permite a síntese específica da parte do

DNA em milhões de cópias através de ciclos alternados de desnaturação, recozimento e alongamento usando primers específicos. A utilização de primers específicos permite uma identificação altamente confiável para determinadas regiões (FANG; RAMASAMY, 2015).

A diferenciação e a identificação precisa dos patógenos de plantas são passos importantes para o manejo de doenças de plantas, a fim de iniciar medidas preventivas e/ou curativas. Portanto, diante do exposto, objetivou-se, realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos associados à seca do painel de sangria da seringueira, coletados em diferentes regiões do estado do Espírito Santo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras do painel de sangria foram coletadas em três regiões produtoras, localizadas nos municípios de Mimoso do Sul, Guarapari e Pinheiros no estado do Espírito Santo.

### **2.1 Obtenção e preservação dos Isolados**

Para o isolamento dos fungos coletou-se fragmentos da casca do painel de sangria da seringueira nas três regiões produtoras (FIGURA 1). Nos municípios de Mimoso do Sul e Guarapari, os fragmentos da casca do painel de sangria foram do clone FX 3864, enquanto que em Pinheiros, coletaram-se os fragmentos da casca dos clones FX 3864, SIAL 1005, IAN 6590, CDC 508, FDR 4575, FDR 5788, FX4098, CDC 56 e CDC 312, em um plantio experimental de competição de clones.



Figura 1 – Coleta de fragmentos do painel de sangria da seringueira de árvores com sintomas da seca.

As amostras coletadas foram levadas ao laboratório, para o isolamento dos fungos. Os fragmentos da casca do painel foram submetidos à desinfestação em solução de álcool 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e enxague em água autoclavada esterilizada. Em seguida, os fragmentos foram depositados sobre papel toalha para secagem. Todos os procedimentos foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar. Após a secagem, os fragmentos foram colocados em placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (39 g/L) e depois foram mantidos em câmara tipo BOD (Biological Oxygen Demand) à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 7 dias.

## 2.2 Obtenção dos isolados monospóricos

Para a obtenção das culturas monospóricas a metodologia utilizada foi a descrita por Alfenas; Mafia (2007). Para isso, preparou-se uma suspensão de esporos diluída em água esterilizada autoclavada, contendo aproximadamente  $1 \times 10^3$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Logo, verteu-se 1 mL desta suspensão em placa de petri contendo meio de cultura ágar-água e espalhou uniformemente, com movimentos rotatórios manualmente até cobrir toda a superfície do meio, sendo incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas.

Após esse período, as placas foram analisadas em microscópico óptico para observação dos esporos germinados em meio de cultura. Os esporos germinados isoladamente foram repicados com auxílio de uma alça previamente flambada. Foi retirada uma porção do meio Ágar-água (1 mm<sup>2</sup>) com o esporo já germinado, transferindo-o para o centro de uma placa de Petri, contendo meio de cultura BDA Acumedia®, em condições assépticas.

### 2.3 Caracterização morfológica

As lâminas para observação das estruturas dos fungos foram realizadas pelo processo de repicagem. Com o auxílio de uma alça foram retirados os esporos de cada colônia e depositados em lâminas contendo uma gota de lactofenol, e cobertas com uma lamínula. Posteriormente, as lâminas foram vedadas passando esmalte nas bordas das lamínulas, para preservação até a observação em microscópio óptico. A caracterização baseou-se na taxonomia de *Fusarium* spp. (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Foram avaliados a forma, o tamanho e o número de septos dos macroconídios, microconídios e/ou mesoconídios (FIGURA 2).

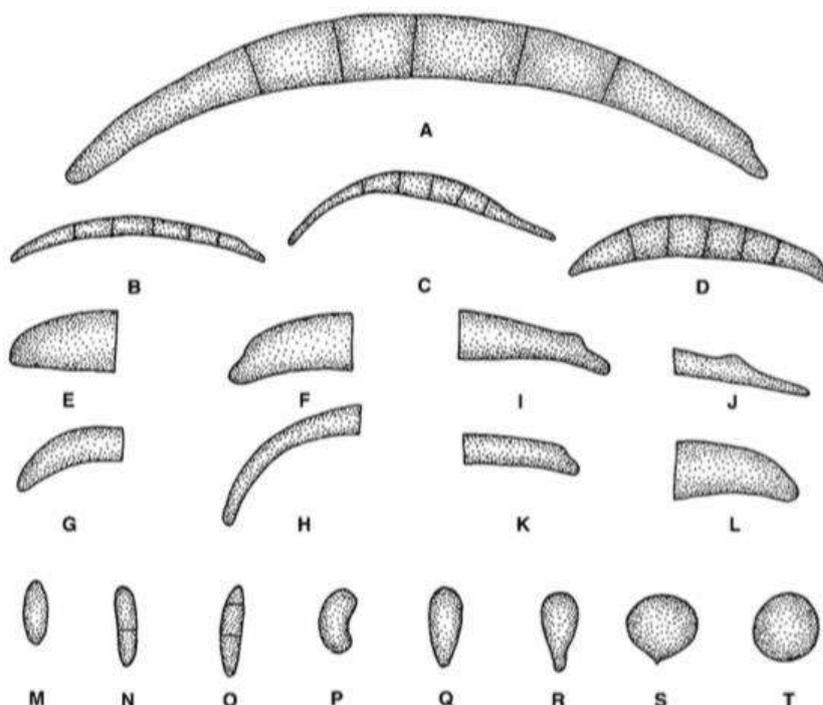


Figura 2 - Morfologia dos esporos utilizada na identificação de espécies de *Fusarium*. A-D: Forma macroconidial. A. Típico macroconídio de *Fusarium*. Célula apical à esquerda, célula basal à direita. B. Macroconídio delgado, reto, quase em forma de agulha, p. ex., *F. avenaceum*. C. Macroconídio com curvatura dorsiventral, p. ex., *F. equiseti*. D. Macroconídio com lado dorsal mais curvado que o lado ventral. E-L: Formas de microconídios e mesoconídios. M-T: Formas de esporos adicionais.

ventral, p. ex., *F. crookwellense*. E-H: Formas das células apicais dos macroconídios. E. Abrupto, p. ex., *F. culmorum*. F. Papilar, p. ex., *F. sambucinum*. G. Curvado, p. ex., *F. lateritium*. H. Afunilado, p. ex., *F. equiseti*. I-L: Formas das células basais dos macroconídios. I. Formato de pé, p. ex., *F. crookwellense*. J. Formato de pé alongado, p. ex., *F. longipes*. K. Distintamente entalhado, p. ex., *F. avenaceum*. L. Mal entalhado, p. ex., *F. solani*. M-T: Forma microconidial. M. Oval. N. Oval de duas células. O. Oval de três células. P. Reniforme. Q. Obovoide com a base truncada. R. Piriforme. S. Napiforme. T. Globoso. FONTE: LESLIE; SUMMERELL, 2006.

## 2.4 Extração e quantificação do DNA

O DNA de cada isolado foi extraído utilizando a metodologia proposta por Gardes & Bruns (1993) com as seguintes modificações: os micélios fúngicos foram transferidos para microtubos de 1,5 ml e macerados no “MagNA Lyser” (Roche®) a 3000 rpm por 90 segundos. Em seguida foi adicionado 600 µL de tampão de extração (200 mM de Tris HCl, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 0,5 % de SDS) e foi agitado por 30 segundos em vortex.

Posteriormente, incubou-se a 90°C por 10 min e foram adicionados 300 µL de acetato de sódio (3M) e homogeneizado por inversão. Em seguida foram levados ao freezer a -20°C durante 20 min. Após esse período, foi centrifugado a 15000 rpm durante 15 min e 700 µL de sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, seguindo-se a adição de 700 µL de isopropanol e foram incubados à temperatura ambiente por 10 min.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com álcool 70% e colocado para secagem em câmara de difusão laminar. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 50 µL de água. Por fim, foi adicionado 1 µL de RNase e incubado a 37°C por 30 min.

O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração foi ajustada para 10 ng µL<sup>-1</sup> utilizando-se o Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.). O DNA foi estocado em freezer a -20°C, para evitar a degradação, sendo descongelado para as reações de PCR.

## 2.5 Análise por PCR

Os oligonucleotídeos usados para amplificação foram ITS1 – (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 – (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). As reações PCRs foram incubadas em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®) e a cada reação com volume final de 13 µL foi adicionado cerca de 20 ng de DNA genômico.

Para as análises o reagente de extração foi o Master Mix, composto de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega Inc.), 10mM de cada dNTPs, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mg/ml BSA, 5 unidades de Taq DNA polimerase (Promega Inc.). A reação foi composta de 7,5 µL de Master Mix, 0,2 µL de cada primer, 2 ng de DNA extraído e 5,1 µL de água.

O termociclador foi programado para um ciclo de 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, com uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Uma alíquota de 4 µL da reação de PCR de cada amostra foi separada em gel de agarose 1,2 % e a eletroforese foi realizada a 80 v/ 250 mA/ 90 minutos e utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (KASVI) para observar o tamanho dos fragmentos obtidos. Após a corrida, o gel foi colocado em brometo de etídio 1% por 15 minutos.

Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta pelo sistema de fotodocumentação modelo ChemiDoc XRS + System (BIO-RAD®).

## 2.6 Purificação do produto de PCR e sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com enzimas Exonuclease I (Exo I) e FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase para retirada de reagentes excedentes da reação de PCR, como primers e nucleotídeos não incorporados. Para cada reação de PCR foi utilizado 0,5uL de Exo I (10U), 1 uL de FastAP (1U) e 5uL da reação da PCR. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e em seguida foi aquecida a 85°C por 15 minutos, utilizando o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para a empresa Myleus Facility para serem sequenciadas e em seguida analisadas.

## 2.7 Análise dos resultados

Os cromatogramas foram analisados utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). As amostras em análise foram alinhadas e confrontadas com as amostras referência disponibilizadas no banco de dados Genbank, para identificação das espécies.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo, foram obtidos 58 isolados coletados nas áreas de plantio de seringueira no estado do Espírito Santo, nos municípios de Mimoso do Sul (TABELA 1), Guarapari (TABELA 2) e Pinheiros (TABELA 3).

Dos 22 isolados obtidos em Mimoso do Sul, seis foram sequenciados, sendo todos *Fusarium solani* (TABELA 1, FIGURA 4). As demais amostras que não foram sequenciadas foram identificadas morfológicamente como sendo do gênero *Fusarium*.

**Tabela 1** – Identificação dos isolados coletados no município de Mimoso do Sul – ES.

Amostra	Clone	Id. morfológica	Id. Molecular*	Score	Identidade
M04	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M05	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M08	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M12	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	211	86%
M15	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M18	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	798	95%
M21	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M29	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M30	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M31	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M32	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M35	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M36	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	798	95%
M39	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M57	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M65	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	211	86%
M130	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M163	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	870	97%

M183	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M191	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	211	86%
M207	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
M250	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

\* Id – Identidade

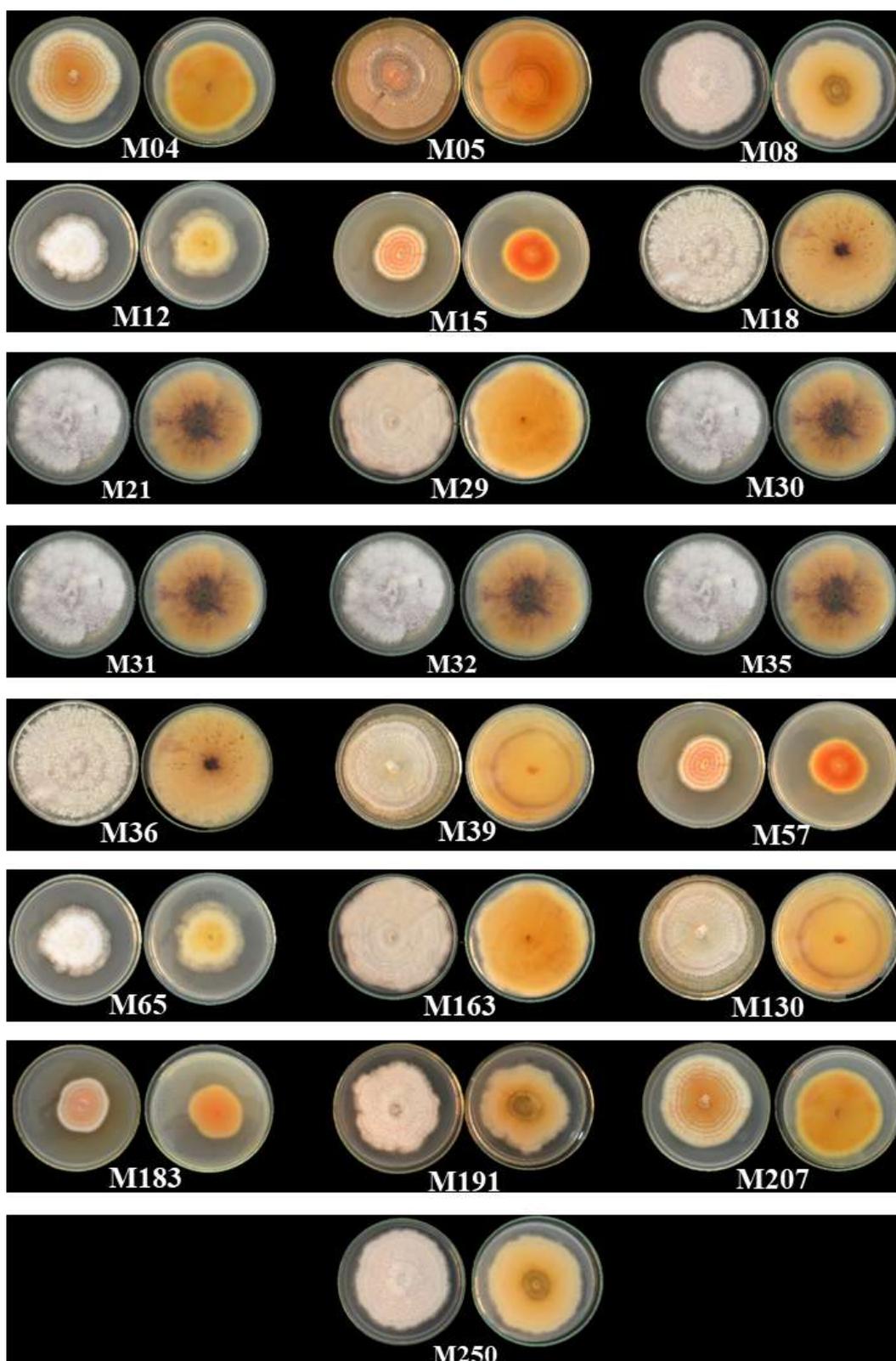
A identidade molecular dos isolados de *Fusarium* spp. com as sequências nucleotídicas encontradas no GenBank variou de 86 a 97% para a região rDNA ITS na área de Mimoso do Sul.

A espécie de *Fusarium solani* (FIGURA 3) foi verificada nas três áreas de coleta. A forma do macroconídio foi classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*), “D” Macroconídio com lado dorsal mais curvado que o ventral. O tamanho médio dos macroconídios variou entre 12.66 – 15.40 µm de comprimento e o número médio de septos foi cinco. As células apicais foram classificadas como curvadas e as células basais como mal entalhadas. A forma do microconídio variou entre oval e ovoide, e sem septos presentes.



**Figura 3** – Microscopia óptica de esporos de *F. solani*.

Esta espécie tem a capacidade de atingir um diversificado número de plantas, como leguminosas e plantas tropicais (LESLIE & SUMMERELL, 2006). O *F. solani* tem vários registros de ocorrência em muitas culturas encontradas no Brasil. A espécie foi relatada ocorrendo em painéis de sangria da seringueira nos estados de São Paulo, Mato Grosso e Bahia (FURTADO et al., 2001).



**Figura 4** – Coloração das colônias dos isolados monospóricos (frente e verso) coletados na área de Mimoso do Sul – ES.

**Tabela 2** – Identificação dos isolados coletados no município de Guarapari – ES.

Amostra	Clone	Id. morfológica	Id. Molecular*	Score	Identidade
G03	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G08	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G10	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G20	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	809	95%
G30	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G39	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	933	99%
G39I	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	924	98%
G42	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G43	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G45	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	470	93%
G72	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G88	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	924	98%
G109	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G109I	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G115	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	896	98%
G160	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	889	97%
G183	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G208	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium lateritium</i>	374	87%
G210	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G229	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	292	87%
G230	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G232	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
G250	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

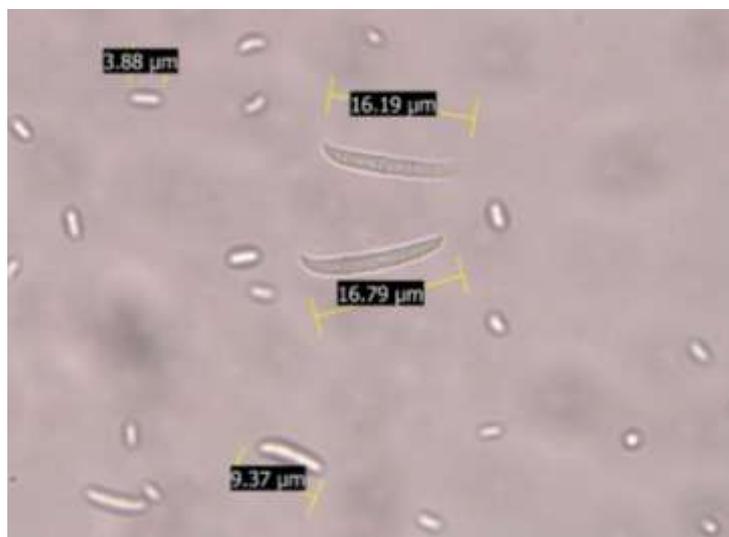
\* Id– Identidade

Dos 23 isolados obtidos em Guarapari (FIGURA 5), nove foram sequenciados, sendo oito identificados como *F. solani* e um como *F. lateritium* (TABELA 2, FIGURA 6). As demais amostras que não foram sequenciadas foram identificadas morfolologicamente como sendo do gênero *Fusarium*.

A identidade molecular dos isolados de *Fusarium* spp. com as sequências nucleotídicas encontradas no GenBank variou de 87 a 98% para a região rDNA ITS na área de Guarapari.

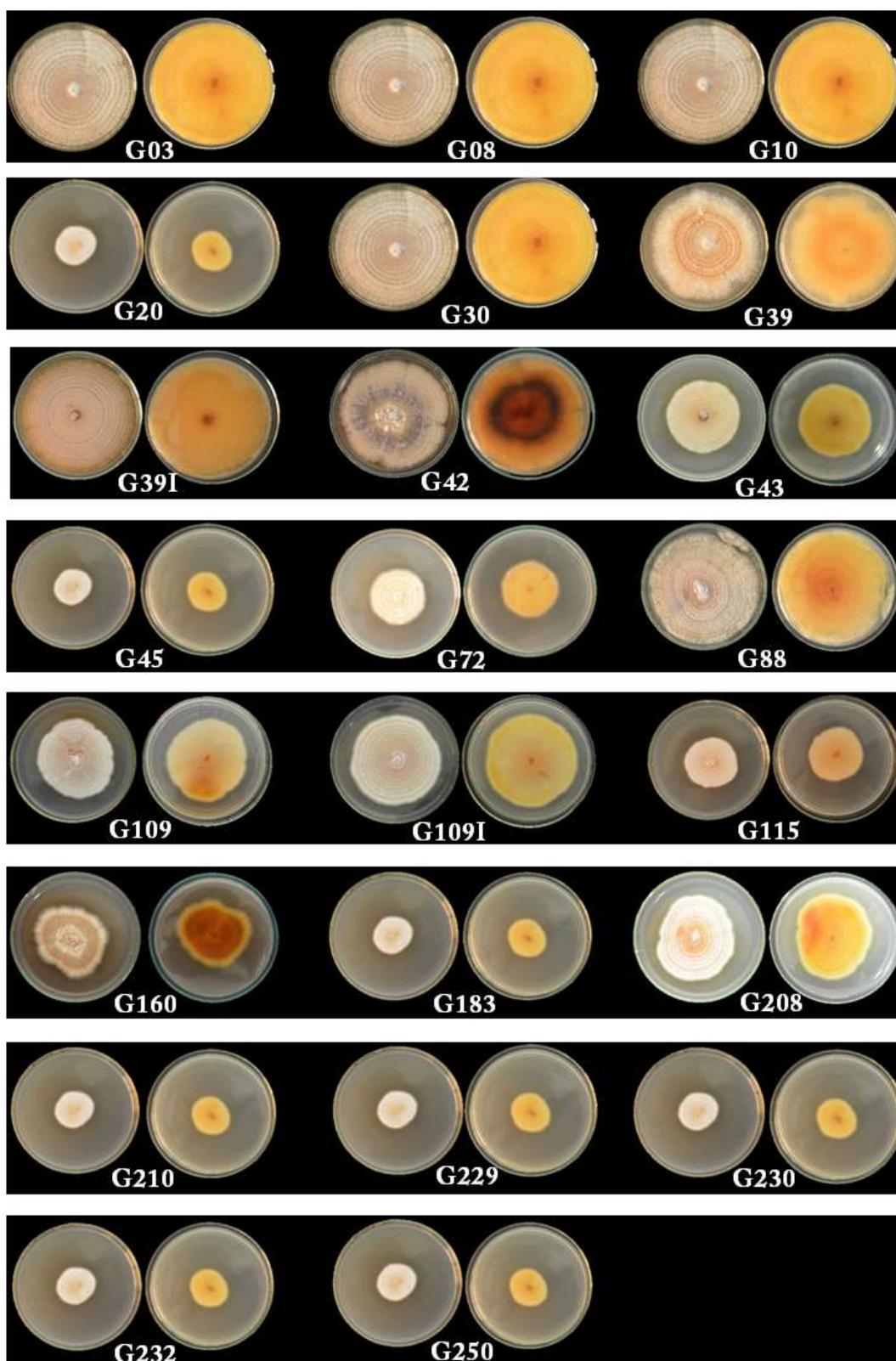
O isolado G208 foi classificado como pertencente à espécie *Fusarium lateritium*. A forma do macroconídio foi classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*), “D” Macroconídio com lado dorsal mais curvado que o ventral. O tamanho médio dos macroconídios variou entre 16.19 - 16.79 µm de comprimento e o número médio de septos foi cinco. As células apicais foram classificadas como

curvadas e as células basais como mal entalhadas. A forma do microconídio variou entre oval e ovoide, e sem septos presentes.



**Figura 6** – Microscopia óptica dos esporos do isolado G208 (*F. lateritium*).

Neste trabalho foi identificado a presença de microconídios e mesoconídios de *F. lateritium*, na literatura não há relatos dessa espécie em associação com *H. brasiliensis* causando doenças no painel de sangria da seringueira.



**Figura 5** – Coloração das colônias dos isolados monospóricos (frente e verso) coletados na área de Guarapari – ES.

Em Pinheiros foram obtidos 13 isolados (FIGURA 7), desse total, oito amostras foram sequenciadas, sendo seis identificadas como *F. solani*, uma como *F. lateritium* e uma como *F. incarnatum* (TABELA 3, FIGURA 8). As demais amostras que não foram sequenciadas foram identificadas morfológicamente como sendo do gênero *Fusarium*.

**Tabela 3** – Identificação dos isolados coletados no município de Pinheiros – ES.

Amostra	Clone	Id. morfológica	Id. molecular	Score	Identidade
P01	SAIL 1005	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium lateritium</i>	904	98%
P02	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P08	IAN6590	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium incarnatum</i>	821	97%
P08I	IAN6590	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	905	98%
P09	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	398	89%
P10	CDC508	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P11	CDC508	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	837	97%
P12	FDR4575	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	889	98%
P15	FDR5788	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	928	99%
P16	FX4098	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	889	98%
P17	FX3864	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P18	CDC56	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
P19	CDC312	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

\* Id – Identidade.

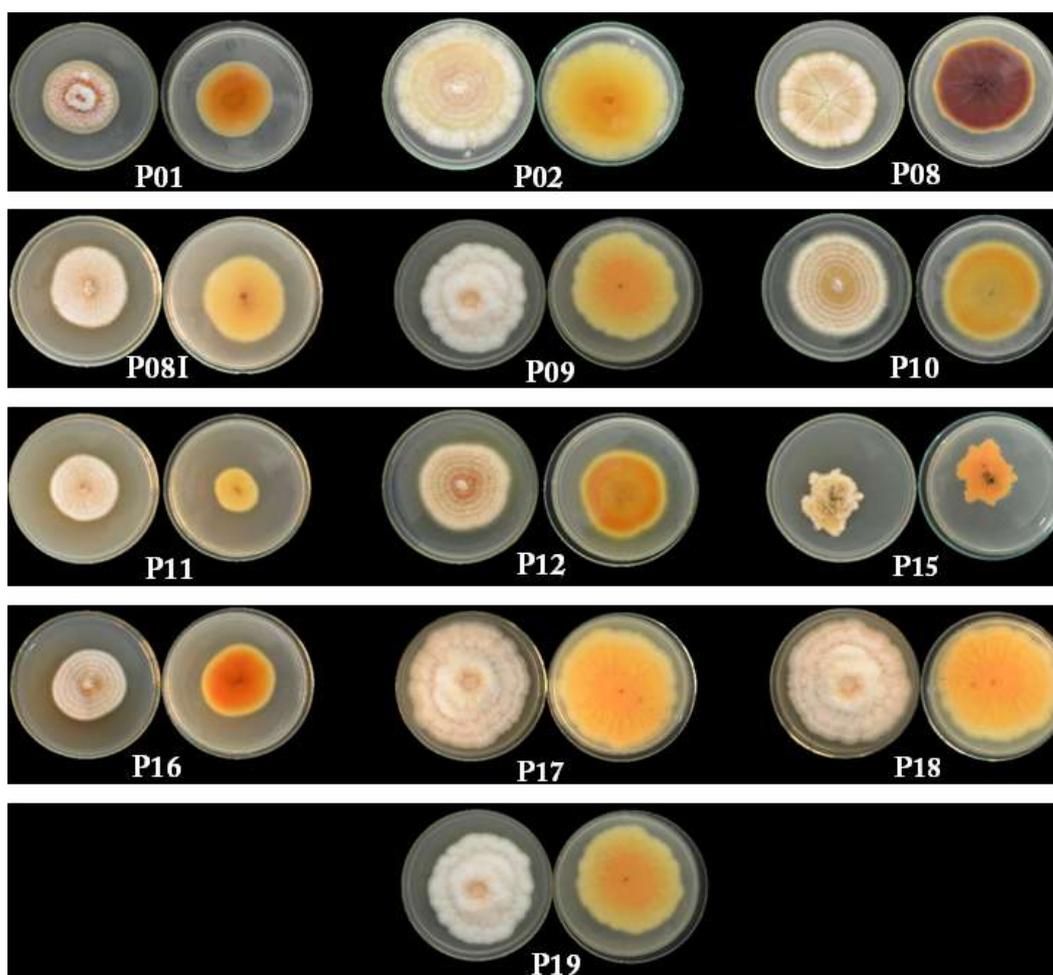
A identidade molecular dos isolados de *Fusarium* spp. com as sequências nucleotídicas encontradas no GenBank variou de 97 a 99% para a região rDNA ITS na área de Pinheiros.

O isolado P08 foi classificado como pertencente à espécie *F. incarnatum*. A forma do macroconídio foi classificada como “A” (macroconídio em formato típico de *Fusarium*), “B” Macroconídio delgado, reto, quase em forma de agulha. O tamanho médio dos macroconídios variou entre 28.35 – 31.65 µm de comprimento e o número médio de septos foi oito. As células apicais foram classificadas como curvadas e as células basais como mal entalhadas. A forma do microconídio variou entre oval e ovoide, e sem septos presentes. Resultados similares com *Fusarium incarnatum* (sin.: *Fusarium semitectum*) foram encontrados em dendezeiro

(SUWANDI; AKINO; KONDO, 2012), em noqueira comum (BELISARIO et al., 2010) e em pitaia (HAWA; SALLEH; LATIFFAH, 2010). Neste trabalho só foi observado a presença de mesoconídios. Mali et al. (2016) também observou a ausência de microconídios para essa espécie (sin.: *Fusarium semitectum*).



**Figura 8** – Microscopia óptica dos esporos do isolado P08 (*Fusarium incarnatum*).



**Figura 7** – Coloração das colônias dos isolados monospóricos (frente e verso) coletados na área de Pinheiros – ES.

Os danos causados pelo fungo *Fusarium* spp., em seringueira vem se destacando pelos prejuízos causados a produção de látex e no aumento de árvores infectadas. O fungo penetra na planta por meio dos ferimentos ocasionados durante a sangria das arvores, sendo esse disseminado, se o material de corte não for esterilizado.

A técnica de análise molecular é uma ferramenta imprescindível para correta identificação dos patógenos. Além do uso do rDNA ITS, considerado marcador universal para identificação de fungos.

A análise molecular complementou a caracterização morfológica, e validou os resultados morfológicos, confirmando a presença do gênero *Fusarium* associado à seca do painel nas áreas de coleta.

Até o momento já foi relatada ocorrência de espécies de *Fusarium* nas principais regiões produtoras de borracha natural do mundo, tais como: *F. solani* no Brasil, Malásia, Sri Lanka e China, *F. oxysporum* na Malásia e na China, *F. incarnatum* na Malásia, *F. decemcellulare* no Brasil e no Congo, *F. moniliforme* e *F. verticillioides* no Brasil, *F. tumidum* na Malásia, *F. javanicum* na China, Sri Lanka e Índia (FURTADO et al., 2001; BETELONI et al., 2009; DÓRIA, 2012; LI et al., 2014; HUANG et al., 2016). Este é o primeiro relato de *Fusarium lateritium* em *H. brasiliensis* no Brasil e no mundo. Será realizado o teste de patogenicidade desse isolado.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os fungos associados ao painel de sangria da seringueira identificados pela caracterização morfológica e molecular nas áreas avaliadas, foram os do gênero *Fusarium* sp.

Foram sequenciados 23 isolados, destes foram identificadas três espécies: *Fusarium solani*, *F. lateritium* e *F. incarnatum*.

Este é o primeiro relato da ocorrência de *F. lateritium* na cultura da seringueira no Brasil e no mundo.

## 5. REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, 2007. 382 p.

BELISARIO, A. et al. First report of *Fusarium semitectum* as the agent of twig cankers on Persian (English) Walnut in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 6, p.791-791, 2010.

BETELONI, F.G. et al. *Fusarium moniliforme*, novo patógeno no painel da seringueira, no estado de São Paulo. In: XXXII CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 2009, São Pedro. **Anais do XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia**. São Pedro: Summa Phytopathologica, v. 35, p. 35 – 35, 2009

BORMAN, A. M. Molecular identification of pathogenic fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 7-12, 2008.

BURGESS, T. et al. Variation in Pisolithus and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Edinburg, v. 99, n. 1, p. 1-13, 1995.

CHEE, K. H. A new disease of *Hevea brasiliensis* caused by *Fusarium solani* and *Botryodiplodia theabromae*. **Plant Disease Reporter**, v. 55, p. 152-153, 1971.

CHEN, C.A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribossomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies**, v. 43, p. 759-771, 2004.

CHEN, Y. C., et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2302-2310, 2000.

CHEN, Y. C. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4042-4051, 2001.

DÓRIA, K.M.A.B.V.S. Caracterização morfológica, cultural, molecular e enzimática de isolados de *Fusarium* spp. de seringueira. 2012. 115f. Tese (**Doutorado**) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

FANG, Y.; RAMASAMY, R.P. Current and prospective methods for plant disease detection. **Biosensors**, v. 5, n. 3, p. 537–561, 2015.

FURTADO, E.L.; ALFENAS, A.C.; HARRINGTON, T.C.; BAKER, C. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.439, 2001.

FURTADO, E.L. et al. *Fusarium solani*, novo patógeno causando mofo cinzento em painel de seringueira, no Estado de São Paulo. In: XXXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2001, São Pedro. **Anais do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. São Pedro: Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 439-439. 2001.

FURTADO, E.L.; TRINDADE, D.R. Doenças da seringueira (*Hevea* spp.). In: Kimati, H. et al. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ed, São Paulo. Agronômica Ceres. p. 477-488. 2005.

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

HAWA, M.M.; SALLEH, B.; LATIFFAH, Z. Characterization and intraspecific variation of *Fusarium semitectum* (Berkeley and Ravenel) associated with red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton and Rose) in Malaysia. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 9, p. 273-284, 2010.

HUANG, G.X. et al. First report of rubber tree gummosis disease caused by *Fusarium solani* in China. **Plant Disease**, v. 100, n. 8, p. 1788-1788, 2016.

JEEWON, R.; ITTOO, J.; MAHADEB, D.; FAKIM, Y. J.; WANG, H.-K.; LIU, A.-R. DNA based identification and phylogenetic characterisation of endophytic and saprobic Fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in mauritius. **Journal of Mycology**, New York, v. 2013, p. 1-10, 2013.

LAU, H. Y., BOTELLA, J. R. Advanced DNA-Based Point-of-Care Diagnostic Methods for Plant Diseases Detection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2016.

LI, B.X. et al. First report of rubber tree stem rot caused by *Fusarium oxysporum* in China. **Plant Disease**, v. 98, n. 7, p.1008-1008, 2014.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. *The Fusarium Laboratory Manual*. EUA: Blackwell Willey, 2006. 388 p.

MALI, A.M. et al. First report of leaf spot caused by *Fusarium* sp. NFCCI 2882 on *Angiopteris evecta*: A King Fern From Western Ghats, India. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 3, p. 646, 2016.

SHARMA G, et al. Apmat gene can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 117–138, 2013.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 109, p. 6241-6246, 2012.

SUWANDI; AKINO, S.; KONDO, N. Common Spear Rot of Oil Palm in Indonesia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 4, p.537-543, 2012

ZWART, H. et al. Is dandelion rubber more natural? naturalness, biotechnology and the transition towards a bio-Based society. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, Guelph, v. 2, n. 28, p. 313–334, 2015.

## CAPÍTULO 02

### Dinâmica espaço-temporal da seca do painel de sangria da seringueira

**Resumo:** A seca do painel de sangria da seringueira é um dos principais problemas encontrados nas regiões produtoras de borracha em todo o mundo. Pouco se sabe sobre a etiologia e epidemiologia dessa doença nas áreas de plantio de seringueira. Objetivou-se com este trabalho, compreender a dinâmica espaço-temporal da seca do painel de sangria da seringueira. Foram avaliadas duas áreas de produção de seringueira no estado do Espírito Santo, nos municípios de Mimoso do Sul e Guarapari, cultivadas com o clone FX3864. Ao todo foram realizadas doze avaliações, em que foi verificada a intensidade da doença em 250 plantas, ao longo do tempo. A avaliação da intensidade da doença foi realizada com auxílio de uma escala de notas com variação de nota de 1 a 4. A atribuição das notas era de acordo com a sintomatologia apresentada no painel de cada árvore e os resultados foram submetidos à análise temporal e espacial para verificar o comportamento da doença. Foi possível verificar a incidência de 100% nas duas áreas em todas as avaliações realizadas, com variação na atribuição das notas 2 e 3. Os meses de outubro/16 a fevereiro/17, para as duas áreas, e dezembro/17 para Guarapari, foram os meses com a maior severidade da doença. A doença apresentou maior distribuição espacial na linha de plantio com tendência a agregação dos focos.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, análise da dinâmica e estrutura de foco, epidemiologia.

**Abstract:** The tapping panel dryness is one of the main problems encountered in rubber producing regions around the world. Little is known about the aetiology and epidemiology of this disease in the rubber plantation areas. The objective of this work was to understand the space-time dynamics of the drought of the rubber tree bleeding panel. Two areas of rubber production were evaluated in the state of Espírito Santo, in the municipalities of Mimoso do Sul and Guarapari, cultivated with clone FX3864. Twelve evaluations were carried out, in which the intensity of the

disease was verified in 250 plants, over time. The evaluation of the intensity of the disease was performed with the help of a scale of notes with a variation of 1 to 4. The assignment of the scores was according to the symptomatology presented in the panel of each tree and the results were submitted to temporal and spatial analysis to verify the behavior of the disease. It was possible to verify the incidence of 100% in the two areas in all evaluations, with variation in the attribution of grades 2 and 3. The months of October/16 to February/17, for the two areas, and December/17 for Guarapari, were the months with the highest severity of the disease. The disease showed a clustered distribution, with tendency to aggregation of foci in the plant line.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*, the dynamics and structure analysis of foci technique, epidemiology.

## 1. INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. De Juss.) Muell. – Arg] é nativa de florestas tropicais na região amazônica da América do Sul, incluindo Brasil, Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Bolívia. Foi introduzida em muitas regiões tropicais ou subtropicais em todo o mundo e é cultivada em muitas dessas regiões (PRIYADARSHAN, 2011).

É a espécie mais utilizada para exploração comercial de látex pela qualidade e quantidade que produz (GONÇALVES; FONTES, 2009). O látex produzido é matéria-prima da borracha natural amplamente utilizada para fabricação de uma variedade de produtos (CRERDCHIM; SATANSAT, 2016). Entre esses produtos destacam-se pneus, luvas manuais, preservativos, materiais cirúrgicos e uma diversidade de outros produtos (SOMWONG et al., 2017).

A produtividade e a vida útil do seringal estão diretamente ligadas à sangria da seringueira, considerada como uma das práticas mais importantes da cultura, e que representa 60% dos custos totais da extração da borracha (GONÇALVES et al., 2000).

As seringueiras são suscetíveis a fatores de estresse bióticos (fúngicos, bacterianos, etc.) bem como abióticos (seca, frio e ferimentos) que afetam significativamente o

rendimento da cultura (JACOB et al., 1999). Como em outras plantas cultivadas, as condições fisiológicas das plantas e as doenças provocadas pelo ataque de patógenos influenciam diretamente na produção da borracha natural (FAÏ, 2011).

No Brasil, as doenças que ocorrem na cultura, principalmente as que afetam o painel de sangria, são os principais entraves na produção e exploração do látex (FURTADO; TRINDADE, 2005). Informações sobre a epidemiologia das doenças que afetam o painel de sangria da seringueira são extremamente importantes para compreender o patossistema e esclarecer o progresso da doença.

Uma forma de caracterizar espacialmente a epidemia é com a análise de dinâmica e estrutura de focos (ADEF), cujas avaliações são baseadas na incidência. O foco de doença é definido como árvores que apresentam sintomas imediatamente adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou diagonal (NELSON, 1996). É considerado como foco um agrupamento de plantas doentes ou lesões, podendo caracterizar uma fonte de inóculo ou coincidir como uma área favorável ao estabelecimento da cultura (LARANJEIRA et al., 1998). Por ser simples e de fácil utilização, a aplicação deste método permite determinar um razoável número de descritores da epidemia, tais como o número de focos de plantas doentes, sua forma, e o número médio de plantas por foco e sua capacidade em função da incidência da doença. Além da rapidez e simplicidade de execução, o uso da ADEF pode complementar informações de outras técnicas de análise espacial (JESUS JUNIOR; BASSANEZI, 2004)

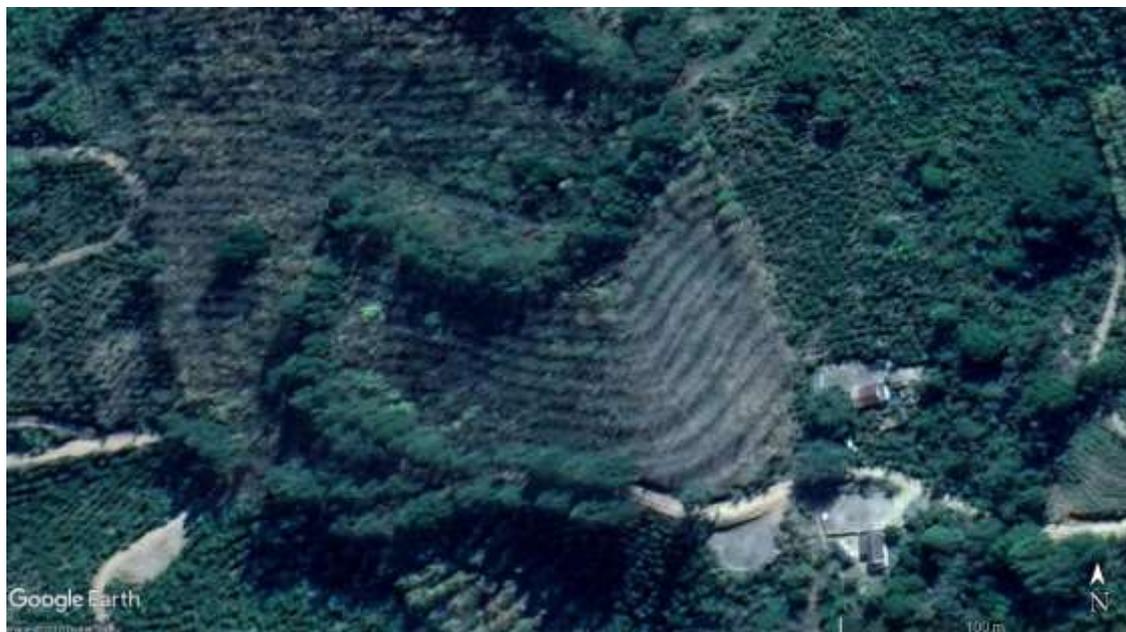
Visto a importância das informações epidemiológicas sobre a seca do painel de sangria da seringueira, este trabalho teve como objetivo caracterizar a dinâmica e estrutura de focos da seca do painel de sangria da seringueira.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

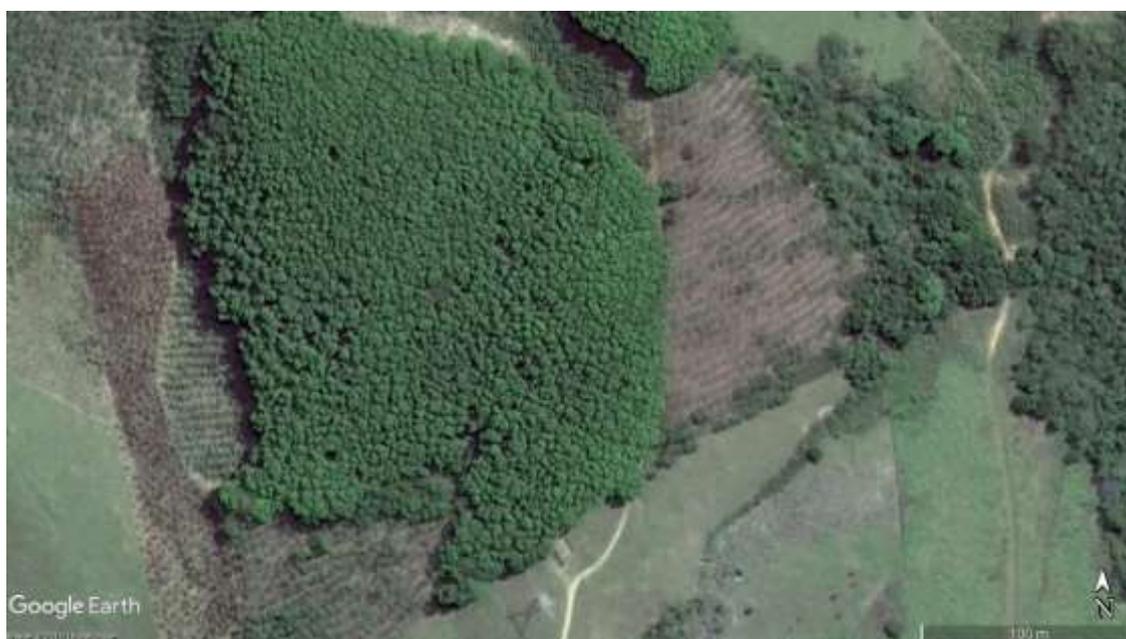
### **2.1 Identificação da área de estudo e amostragem**

As áreas de estudo estão localizadas nos municípios de Mimoso do Sul (A1) (21°6'8.85"S, 41°25'21.88"O) (FIGURA 1) e Guarapari (A2) (20°38'23.68"S,

40°33'41.68"O) (FIGURA 2), pertencentes às regiões sul e metropolitana, respectivamente no estado do Espírito Santo.



**Figura 1-** Imagem aérea da área de avaliação do clone FX3864, no município de Mimoso do Sul – ES.



**FIGURA 2 -** Imagem aérea da área de avaliação do clone FX3864, no município de Guarapari – ES.

O tamanho de cada área de plantio é de aproximadamente um (1,0) hectare. O clone plantado nas duas áreas é o FX 3864. A idade do seringal na área A1 é de dez anos, e na A2 de quinze anos. A altitude da A1 está entre 290 a 320 m, enquanto na A2 está entre 50 a 70 m.

Em cada área foram avaliadas 250 plantas, com espaçamento de 7m x 3m em curva de nível. A primeira avaliação para a quantificação da incidência da seca do painel foi em outubro de 2017, após 90 dias realizou-se a segunda avaliação. A partir desta, as avaliações ocorreram no intervalo de 30 dias, tendo ao final 12 avaliações.

Para avaliação da distribuição das doenças durante os meses avaliados, aplicou-se a análise de dinâmica e estrutura de focos, através de planilhas de campo, onde foi analisado o número total de ocorrência de focos (NF), focos unitários (FU), número médio de plantas por foco (NMPF).

O índice de compactação de foco (ICF) e índice de formação de foco (IFF) foram calculados pela equação:

$$IFF = \frac{\left(\frac{If}{Ic}\right)}{NF} \quad (3)$$

Em que:

IFF = índice médio de forma de focos;

If = número máximo de linhas ocupadas no foco;

Ic = número máximo de colunas ocupadas no foco;

NF = número total de ocorrência de focos.

Em que:

Valores de IFF = 1,0 indicam focos isodiamétricos.

Valores de IFF > 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção entre as linhas de plantio.

Valores de IFF < 1,0 indicam focos com maior comprimento na direção da linha de plantio.

$$ICF = \frac{\left(\frac{NPF}{Ic \times Lf}\right)}{NF} \quad (4)$$

Em que:

ICF = índice médio de compactação de focos;

Lf = número máximo de linhas ocupadas no foco;

Ic = número máximo de colunas ocupadas no foco;

NF = número total de ocorrência de focos.

Em que:

Valores de ICF próximos a 1,0 indicam focos mais compactos, isto é, maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco.

Levou-se em consideração para as análises os valores de maior severidade que se repetiram em todas as avaliações, a nota 3. Considerou-se como foco as árvores que apresentavam maior nota de severidade, no caso nota 3 e as árvores adjacentes no padrão de proximidade vertical, horizontal ou diagonal com a mesma nota.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análise Temporal**

Foram realizadas doze avaliações nas duas áreas A1 e A2 do experimento, nesse período verificou-se 100% de incidência da seca do painel nas plantas avaliadas. Para realização da extração do látex da seringueira se faz necessário a utilização da faca de sangria, a utilização desta ferramenta pode causar injúrias mecânicas, além de funcionar como meio de disseminação de patógenos, principalmente, quando não

realizada a sua desinfestação de uma planta para outra, e/ou causando ferimentos, que servem de abertura para penetração e colonização de patógenos.

Durante o período avaliado, a severidade da doença ficou entre as notas 2 e 3 nas duas áreas (FIGURA 3). Na A1 houve na maior parte dos meses a ocorrência da nota 2 (FIGURA 3A), já para A2, a nota 2 prevaleceu em todas as avaliações (FIGURA 3B). Os meses de outubro/16 a fevereiro/17, para as duas áreas, e dezembro/17 para A2, foram os meses com a maior nota da doença.

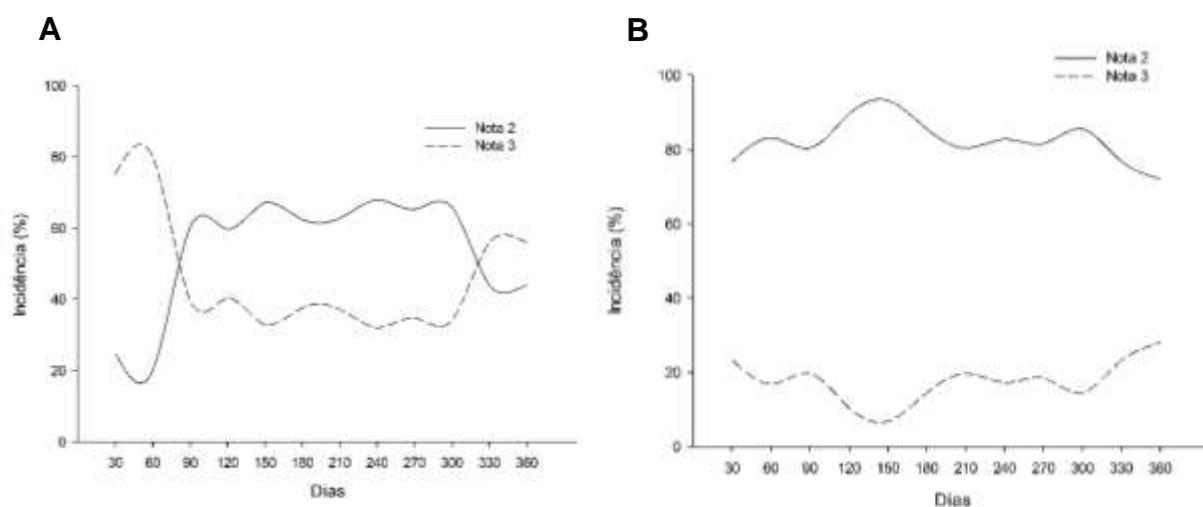


Figura 3 – Curvas de progresso das notas de severidade nas áreas de avaliação: A) Mimoso do Sul (A1); B) Guarapari (A2).

Os valores de AACPI foram de 18300 e 14700 para notas 2 e 3, respectivamente, para A1, totalizando 33000, e de 27408 e 5592, para notas 2 e 3, respectivamente, para A2, totalizando 33000 (FIGURA 4).

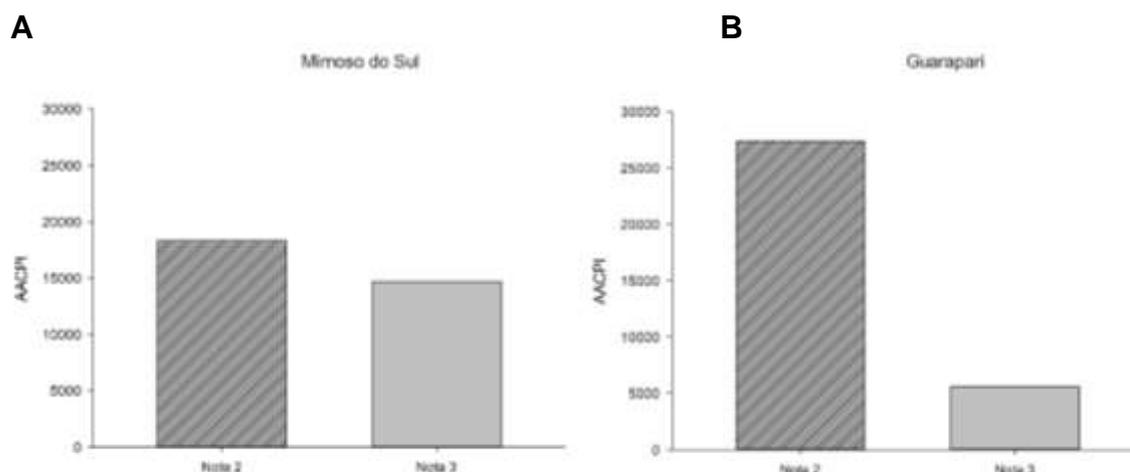


Figura 4 – Área abaixo da curva de progresso da incidência AACPI: a) Mimoso do Sul; b) Guarapari.

Os modelos matemáticos testados para o ajuste das curvas de progresso da seca do painel (logístico, monomolecular, Gompertz) apresentaram valores diversificados de coeficiente de determinação. Dessa forma, não foi possível a escolha de um dos modelos citados acima para as áreas avaliadas, o que impossibilitou a comparação entre o inóculo inicial e a taxa de progresso da doença entre as duas áreas.

### 3.2 Análise Espacial

As curvas do número de focos unitários e do número de focos apresentaram padrões semelhantes, porém os picos foram diferentes. Ao mesmo tempo que houve a redução do número de focos unitários com o aumento da incidência na área A1, ocorreu a redução do número de focos, ao passo que o número médio de plantas por foco aumentou gradativamente com o aumento da incidência na área. Com 20% de incidência na área A1, 15% dos focos eram constituídos por uma única planta, com 80 % da incidência na área com pouco mais de 1% dos focos era unitário (FIGURA 5).

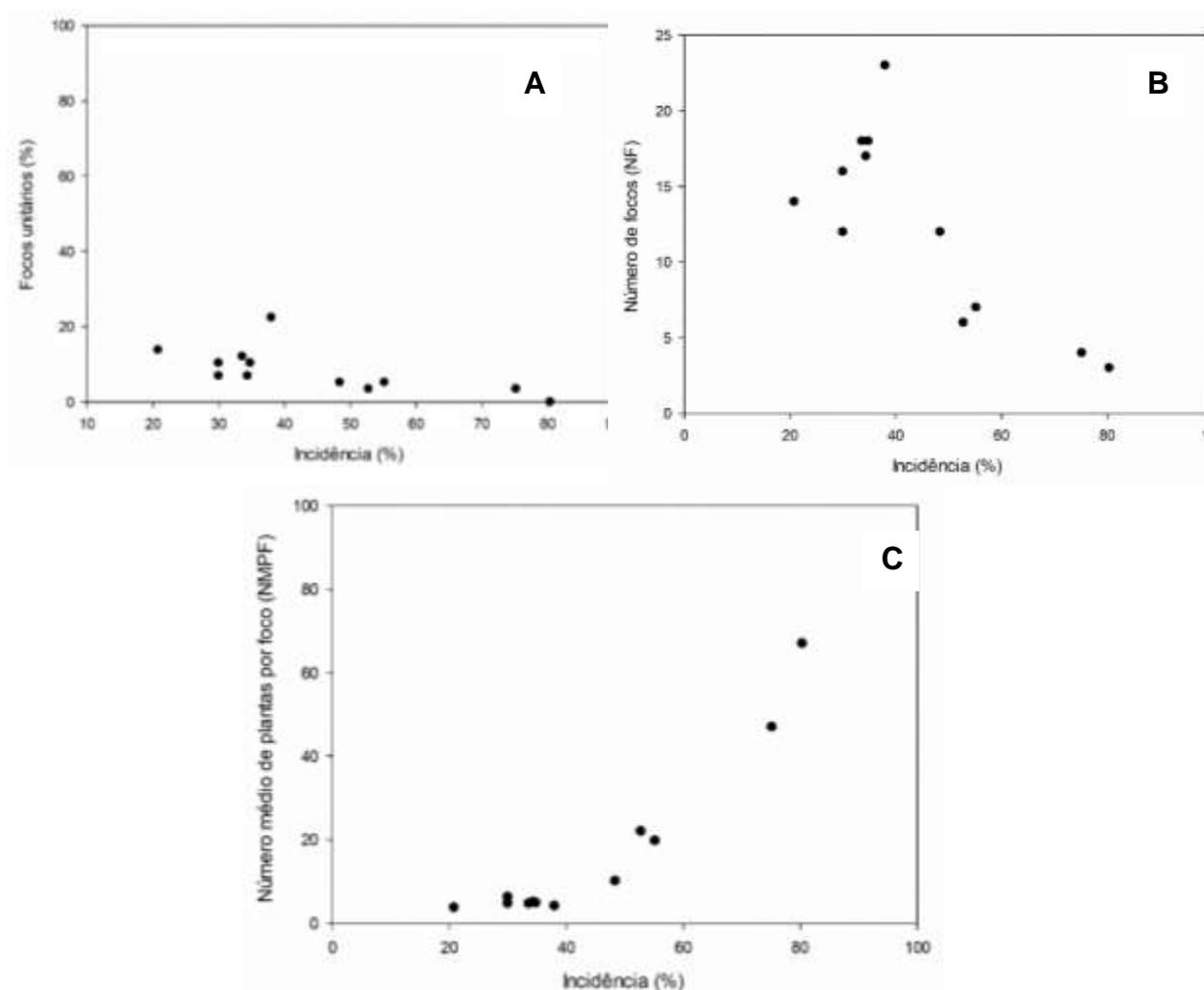


Figura 5 – Dinâmica de focos da seca do painel de sangria da seringueira na área de Mimoso do Sul (*H. brasiliensis*): (A) Número de focos unitários (FU); Número de focos (NF); Número médio de plantas por foco (NMPF).

A sangria realizada nas áreas de cultivo era realizada ao longo das linhas de plantio, sem desinfestação da face de sangria durante a extração do látex, o que contribuiu diretamente no processo de disseminação da doença nas áreas.

O NMPF aumentou com o aumento da incidência de plantas com os sintomas da seca do painel de sangria (FIGURA 5C). Este fato evidencia a maior proximidade das plantas com sintomas observados em campo, no qual havia um maior número de plantas sintomáticas seguindo as linhas de plantio. Até 40% de incidência, o NMPF era inferior a 10 plantas por foco, alcançando o número médio de 70 plantas por foco com incidência de 80%. Grandes focos só foram observados na área A1 com valores de incidência acima de 40% (FIGURA 5C).

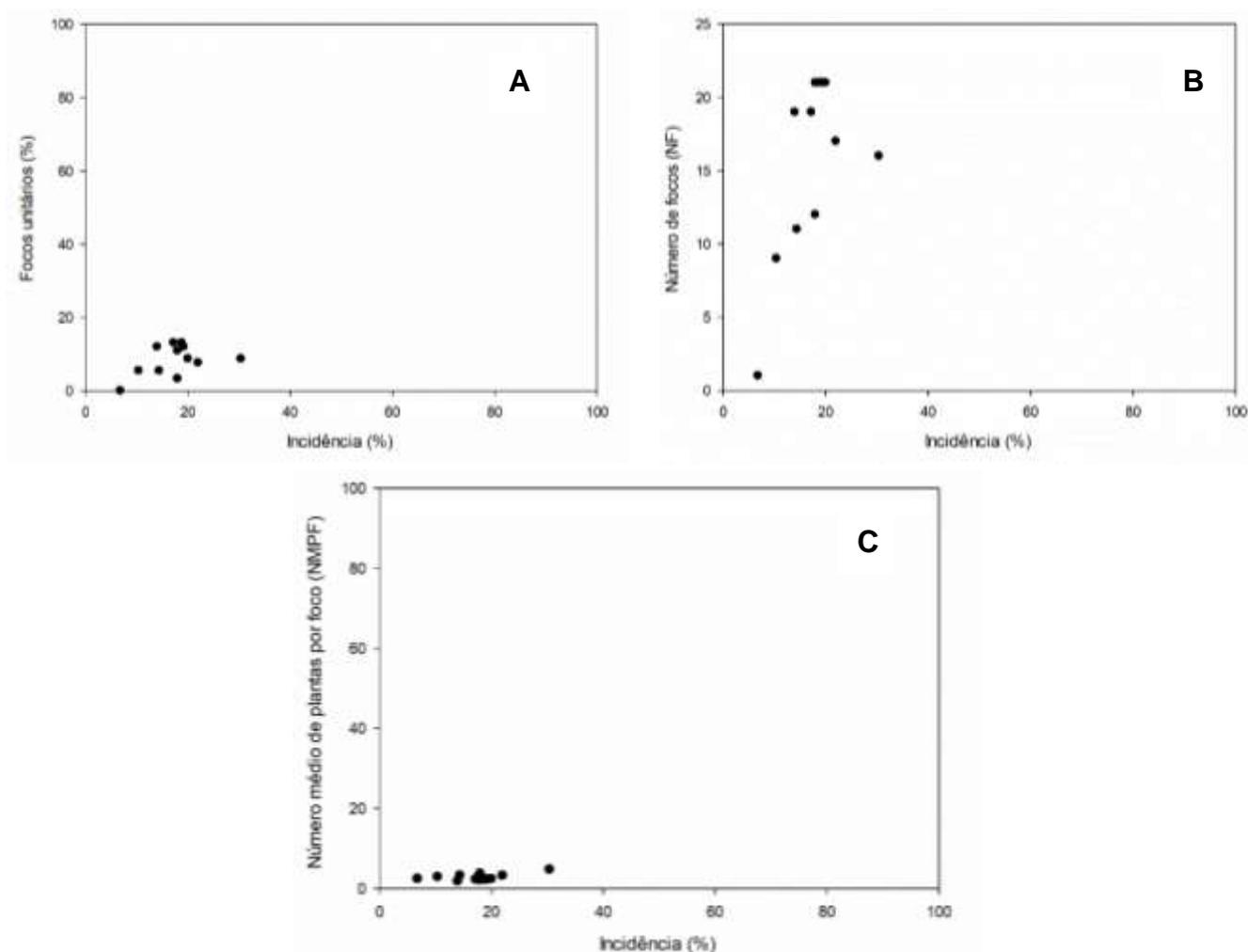


Figura 6 – Dinâmica de focos da seca do painel de sangria da seringueira na área de Guarapari (*H. brasiliensis*), na área de Mimoso do Sul: A) Número de focos unitários (FU); B) Número de focos (NF); C) Número médio de plantas por foco (NMPF).

A incidência na área A2 foi inferior a 40% (FIGURA 6) com incidência de 30%, a área apresentava 13% dos focos constituídos por uma única planta. O NF aumentou conforme houve um aumento na incidência de plantas sintomáticas, com 20% de incidência o NF era de 21 focos na área. O NMPF manteve-se baixo ao longo das avaliações mantendo-se inferior a 10 plantas por foco.

As duas áreas avaliadas apresentaram padrão de focos diferentes quando comparadas entre si, a incidência da seca do painel nas duas áreas de estudo diferenças.

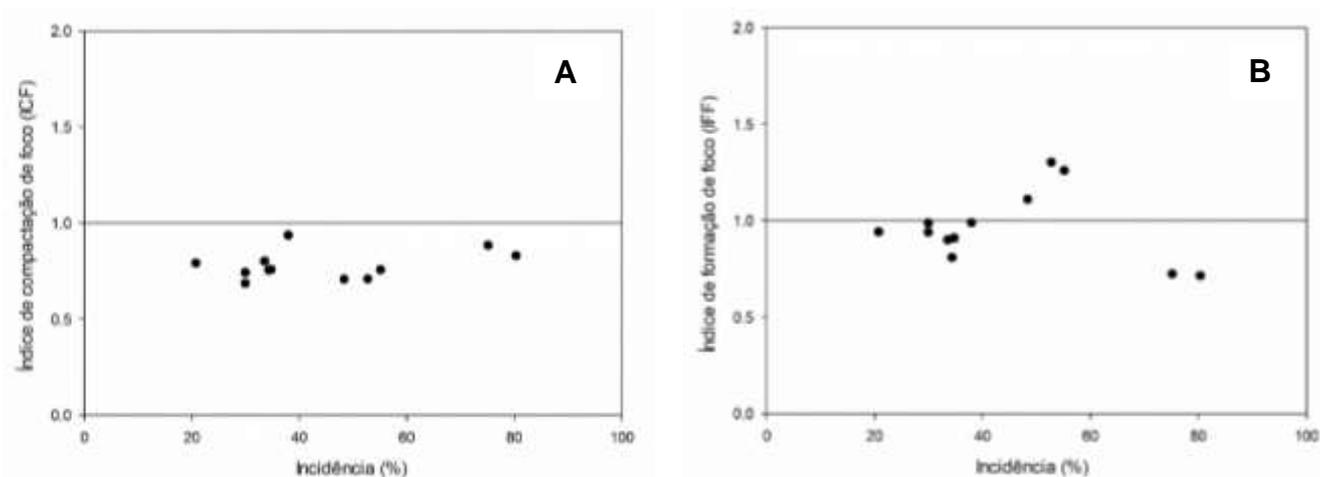


Figura 7 – Estrutura de focos da seca do painel de sangria da seringueira na área de Mimoso do Sul: A) Índice de compactação de foco (ICF); B) Índice de formação de foco (IFF).

Os valores encontrados para ICF oscilaram durante o período avaliado, a média de ICF para área foi de 0,78. Os focos que apresentam valores próximos a 1 são considerados compactos e valores menores são considerados menos compactos. Em relação aos valores encontrados par IFF a média na área foi de 0,98, sendo que quando a área apresentou incidência entre 40% e 60% os valores de IFF ficaram acima de 1, depois esse valor reduziu conforme o aumento da incidência.

Na A2 a incidência ficou abaixo de 40%, o valor médio de ICF foi de 0,81 durante o período avaliado. Para o IFF o valor médio encontrado para área foi de 0,86. Os valores de IFF ficaram acima de 1 quando a incidência ficou entre 15% e 20% (FIGURA 8).

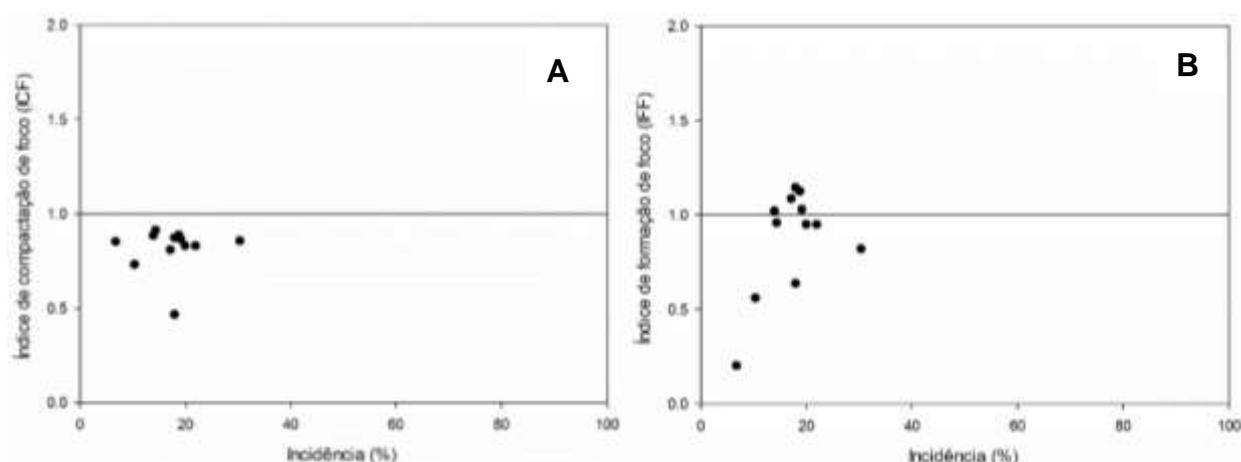


Figura 8 – Estrutura de focos da seca do painel de sangria da seringueira na área de Guarapari: A) Índice de formação de foco (ICF); B) Índice de formação de foco (IFF).

Os valores do índice de formação de focos quando analisados em conjunto para as duas áreas avaliadas, apresentaram valores de IFF menores que 1, indicando que a seca do painel de seringueira ocorreu em distribuição nas linhas de plantio, havendo um maior número de plantas doentes nas linhas de plantio.

A aplicação da ADEF no estudo da seca do painel de sangria da seringueira permite conhecer como a doença se comporta no espaço e seu modo de disseminação. Em hospedeiros perenes, doenças de causa biótica, exibem padrões definidos de aparecimento e de crescimento de focos (LARANJEIRA, 1997).

Os resultados obtidos para seca do painel de sangria da seringueira sugerem o envolvimento de processos bióticos na formação dos focos de plantas com sintomas da seca do painel.

A epidemia da seca do painel de sangria iniciou com a formação de focos unitários no talhão. O progresso da doença ocorre principalmente com aumento de novos focos unitários, e pelo aumento do número de plantas por foco e pela maior compacidade dos focos, indicando maior agregação e proximidade entre todas as plantas pertencentes ao foco, originando focos com maior comprimento na direção da linha de plantio. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Souza (2007) no estudo da distribuição espacial do cancro basal do eucalipto e por Tumura (2012) no estudo da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto.

#### 4. CONCLUSÃO

Houve 100 % de incidência da seca do painel de sangria da seringueira nas áreas e no período avaliado.

A distribuição espacial da doença ocorreu nas linhas de plantio com tendência da agregação dos focos.

#### 5. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005

ALMEIDA, L. S.; GUIMARÃES, E. C. Geoestatística e análise fatorial exploratória para representação espacial de atributos químicos do solo, na cafeicultura. **Coffee Science**, v. 11, n. 2, p. 195-203, 2016.

ALVES, M.C. et al. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, n. 31, v. 6, p. 557-563. 2006.

CAMBARDELLA, C.A et al. Field-Scale Variability of Soil Properties in Central Iowa Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 58, p. 150-151, 1994.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley & Sons, 532 p, 1990.

CHAREST, J. et al. Spatial distribution of *Venturia inaequalis* airborne ascospores in orchards. **Phytopathology**, v. 92, p. 769- 779, 2002.

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. **Annual Review Phytopathology**, v. 11, p. 343-364, 1973.

CRERDCHIM, B; SATANSAT, J. Influences of ethylene stimulation of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) on the extractives and fungal resistance of lumber. **Cerne**, v. 22, n. 3, p. 223-232, 2016.

FARIAS, P. R. S. et al. Using geostatistical analysis to evaluate the presence of *Rotylenchulus reniformis* in cotton crops in Brazil: economic implications. **Journal of Nematology**, v. 34, p. 232-238, 2002.

FAY, E. Histo- and cytopathology of trunk phloem necrosis, a form of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) tapping panel dryness. **Australian Journal of Botany**, v. 59, p. 563–574, 2011.

- FERREIRA, J. B. et al. Análise da dinâmica, estrutura de focos e arranjo espacial da mancha manteigosa em campo. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, n. 1, p. 24-30, 2009.
- FERREIRA, F. A. Murcha de *Ceratocystis* em eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 24, p. 284, 1999.
- FURTADO, E.L.; TRINDADE, D.R. **Doenças da seringueira (Hevea spp.)**. In: Kimati, H. et al. (Ed.) Manual de fitopatologia. v.2: Doenças das Plantas Cultivadas. 4ed., São Paulo. Agronômica Ceres. p.477-488, 2005
- GONÇALVES, P. S; FONTES, J. R. A. **Domesticação e Melhoramento da Seringueira**. In: Borém A, Lopes MTG, Clement CR & Noda H (Eds). Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas, Viçosa, UFV, p.395-423, 2009.
- JACOB, J. et al. Physiological constraints for cultivation of Hevea in certain unfavorable agroclimatic regions of India. **Journal Natural Rubber Research**. v. 12, p. 1-16, 1999.
- JEGER, M. J. **Mathematical analysis and modelling of spatial aspects of plant disease epidemics**. In: Kranz, J. (Ed.). Epidemics of Plant Diseases. 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, p.53-95, 1990.
- JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 399-405, 2004.
- LARANJEIRA, F.F. Dinâmica Espacial e Temporal da Clorose Variegada dos Citros. (**Dissertação de Mestrado**). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 1997.
- LEAL, R. M et al. Distribuição espacial de huanglongbing (greening) em citros utilizando a geoestatística. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, n. 3, p. 808 – 818, 2010.
- MANZIONE, R.L.; ZIMBACK, C.R.L. Análise espacial multivariada aplicada na avaliação da fertilidade do solo. **Engenharia na Agricultura**, v. 19, n. 3, p. 227-235, 2011.
- NELSON, M. R et al. Applications of geographic information systems and geostatistics in plant disease epidemiology and management. **Plant Disease**, v. 83, p. 308–319, 1999.
- NELSON, S. C. A simple analysis of disease foci. **Phytopatology**, v. 86, n. 4, p. 332-339, 1996.
- PRIYADARSHAN, P.M. **Biology of Hevea rubber**. Rubber Research Institute of India, India. Wallingford, UK: CABI, 250 p, 2011
- RIPPEL, M. M; BRAGANÇA, F. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química nova**, v. 32, p. 818-826, 2009.

SILVA, A.P et al. Variabilidade espacial da resistência a penetração de um Latossolo Vermelho-Escuro ao longo de uma transeção. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, v. 13, p. 1-5, 1989.

SOMWONG, S. et al. Contamination detection in fresh natural rubber latex by a dry rubber content measurement system using microwave reflectometer. **Biosystems Engineering**, v. 164, p. 181-188, 2017.

SOUZA, S. E. Dinâmica espaço-temporal e danos do cancro basal em *Eucalyptus grandis*. 2007. 160 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

TUMURA, K.G et al. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.54-60, 2012.