

Variación temporal a *Microcyclus ulei* en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones controladas

Temporal variation to *Microcyclus ulei* in rubber tree clones FX 3864 and FX 4098 under controlled conditions

Armando Sterling Cuéllar*, Luz Marina Melgarejo**

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la variación temporal de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de dos clones (FX 3864 y FX 4098) de *Hevea brasiliensis* a *Microcyclus ulei* en condiciones controladas. Las inoculaciones se realizaron en cámara húmeda a 23 °C, una humedad relativa superior al 90% y un fotoperíodo de 12 h. Con un modelo de medidas repetidas en el tiempo y mediante correlaciones se analizaron cuatro variables: severidad de ataque (SA), intensidad de esporulación conidial (IE), tamaño de lesión (TL) y frecuencia de infección (FI). *M. ulei* generó síntomas en los dos clones a los 4 días después de la inoculación. Los signos de la enfermedad (IE= 3) se manifestaron a los 8 días en el clon FX 3864 y a los 12 días en el clon FX 4098. FX 3864 presentó la mayor susceptibilidad a *M. ulei* (mayor severidad y una esporulación alta, IE= 4). En general, se observó una influencia del tiempo en la reacción de cada clon para las variables SA, IE y TL. Altas correlaciones significativas se encontraron entre SA y las variables IE, TL y FI, excepto en el día 12 para IE. Este estudio permite concluir que en condiciones controladas la intensidad y la frecuencia de los síntomas así como el grado de esporulación producidos por *M. ulei* cambian significativamente a través del tiempo y esta variación está influenciada a su vez por el nivel de susceptibilidad a *M. ulei* presentado por cada clon de *H. brasiliensis*.

Palabras clave: *Hevea brasiliensis*, mal suramericano de las hojas, severidad, esporulación.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of temporal variation on the main physiological components associated with the reaction to *Microcyclus ulei* of two rubber tree clones of *Hevea brasiliensis* under controlled conditions. Inoculations were performed in a moist chamber at 23 °C, a relative humidity higher than 90% and a photoperiod of 12 h. The variables severity of attack (SA), conidial sporulation intensity (IE), lesion size (TL) and infection frequency (IF) were analyzed with a repeated over time measurements model and also with correlations. *M. ulei* produced symptoms (SA, TL, FI) in both rubber tree clones 4 days after inoculation. Signs of the disease (IE = 3) appeared in the FX 3864 at day 8th and in the FX 4098 at day 12th. FX 3864 presented higher susceptibility to *M. ulei* (greater severity and high sporulation, with IE = 4). In general, the time influenced the reaction of each clone, especially in the variables SA, IE and TL. High significant correlations were found between SA and the variables IE, TL and FI, except on day 12 for IE. It was concluded that intensity and frequency of symptoms and the degree of sporulation produced by *M. ulei* change significantly over time under controlled conditions and this variation is influenced also by the level of susceptibility to *M. ulei* showed by each clone of *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*, South American leaf blight, severity, sporulation.

Recibido: mayo 5 de 2014

Aprobado: octubre 20 de 2014

* Biólogo, MSc., Candidato a Doctor en Ciencias - Biología, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Investigador Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi Sede Florencia, Florencia – Colombia. asterling@sinchi.org.co; asterlingc@unal.edu.co (Autor para correspondencia)

** Bióloga, PhD. Profesora titular, Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Immelgarejom@unal.edu.co

Introducción

El caucho natural [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR. de Juss.) Muell.-Arg.] es una especie de origen suramericano productora de látex destinado principalmente a la industria llantera (Compagnon, 1998). A nivel mundial, el Sudeste Asiático produce el 93% del caucho natural, África el 4% y América Central y del Sur el 3%. Tailandia, Indonesia y Malasia concentran el 66,5% de la producción, siendo éstos los principales países productores (IRSG, 2013).

En Colombia, a diciembre de 2013 se reportó la existencia de 44.100 ha cultivadas de caucho (producción anual de 3.950 toneladas), constituidas principalmente por clones introducidos de origen asiático, africano y americano (STN, 2013). Caquetá es el departamento con mayor tradición cauchera de Colombia y el tercero en área sembrada con 6.017 ha de caucho, de las cuales 1.581 ha son plantaciones en etapa productiva con una producción de 1.89,4 toneladas de caucho seco por año (Asoheca, 2014).

Dada la importancia del caucho natural y su creciente demanda actual en el mercado nacional, esta situación impone al sector heveícola colombiano el reto no sólo de incrementar las áreas de siembra sino además identificar para las diferentes regiones del país los clones apropiados con mejor desempeño y tolerancia a los principales limitantes del cultivo, especialmente al principal problema fitosanitario, el mal suramericano de las hojas, por sus siglas en inglés SALB (South American Leaf Blight) causada por el hongo ascomiceto *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx (Gasparotto et al. 2012).

Esta enfermedad reviste gran importancia porque produce defoliaciones prematuras repetidas, reduce la actividad fotosintética de la planta, disminuye la producción de látex entre un 20% y 75% (Chee y Holliday, 1986) y puede ocasionar la muerte de la planta (Gasparotto et al., 2012). Actualmente, el uso del mejoramiento genético para la generación de materiales con resistencia horizontal al SALB representa la principal estrategia para el manejo de la enfermedad (Gasparotto et al., 2012).

Sin embargo, en Colombia y en zonas de no escape al SALB como la región amazónica, *M. ulei* constituye la principal amenaza para el establecimiento de nuevas plantaciones de *H. brasiliensis* a escala comercial (Castellanos et al., 2009). En el Departamento del Caquetá (Amazonia colombiana) los cultivares de caucho natural: IAN 873, IAN 710 y FX 3864 han reducido el desempeño en etapa improductiva (Sterling y Correa, 2010) y se ha incrementado la susceptibilidad al SALB (Sterling et al., 2009, 2010a, b). Esta situación pone en riesgo el desarrollo de nuevas plantaciones de caucho en la región amazónica colombiana, debido a la poca variabilidad en su base genética y a la pérdida de resistencia al hongo *M. ulei* (Sterling et al., 2010a, b).

Lo anterior ha impulsado a nivel regional la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia genética a *M. ulei* dentro las cuales se ha destacado el clon FX 4098 como un material con promisorio para la región amazónica colombiana (Sterling et al., 2010a, 2011, 2012). No obstante, aún se requiere evaluar diversos componentes fisiológicos asociados a la reacción del *Hevea* a *M. ulei* dentro de la interacción hospedero-parásito de acuerdo con el clon y la variabilidad fisiológica del patógeno, antes de ofrecer una recomendación final a nivel del productor.

Los diversos estudios realizados sobre el efecto del SALB en *H. brasiliensis* han dilucidado en condiciones controladas varios de los mecanismos bioquímicos y moleculares relacionados con la resistencia parcial (García et al., 1999), la variabilidad fisiológica de *M. ulei* (Junqueira et al., 1990, Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a) y la influencia de las condiciones ambientales en la dinámica epidemiológica de la enfermedad (Furtado et al., 2008; Guyot et al., 2010).

Aunque son diversos los estudios que han contribuido con el análisis de los principales componentes de resistencia a *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada, es necesario fundamentar el efecto del progreso de la infección sobre los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción al SALB en clones de caucho con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad. Dicho conocimiento es importante para la detección y la valoración en el tiempo del impacto del estrés ocasionado por el SALB en *H. brasiliensis* y a partir de esto diseñar estrategias de manejo adecuadas que permitan realizar un control integrado de la enfermedad.

Al respecto se presume que el desarrollo del SALB debe estar influenciado no sólo por la interacción hospedero-parásito, sino también por la dinámica temporal de los síntomas y signos producidos por *M. ulei* de una manera diferencial según el nivel de susceptibilidad presentado por el respectivo clon de *H. brasiliensis*.

De acuerdo con lo anterior, este estudio tuvo como objetivo evaluar la variación temporal de los principales componentes fisiológicos relacionados con la reacción a *M. ulei* de dos clones de caucho (FX 3864 y FX 4098) con distinta susceptibilidad al SALB en condiciones de inoculación controlada en Caquetá (Colombia).

Materiales y métodos

Área de estudio y condiciones de inoculación

El estudio se realizó en el cuarto climatizado del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi en Florencia, Caquetá (Colombia), municipio localizado entre las coordenadas 1° 37' 03" de latitud Norte y 75° 37' 03" de longitud Oeste (IGAC, 2010). Al interior del cuarto

climatizado se adecuaron 10 cubículos (cabinas para inoculación). Cada cubículo con dimensiones de 1,3 m x 1,2 m x 2,5 m, se construyó en plástico negro con armazón en madera y con dos aperturas (un tragaluz y una puerta) para el control de entrada del aire climatizado. La temperatura del aire se controló a 23 °C mediante el uso de dos aires acondicionados de 12000 Btu cada uno tipo mini split con filtro deshumificador. El control de la humedad relativa (> 90%) se manejó mediante un sistema de riego independiente por goteo. Finalmente dentro de cada cubículo se manejó un fotoperíodo de 12 h mediante la adecuación de un temporizador y cuatro lámparas fluorescentes de 40 W (PAR= 11.5 $\mu\text{mol fotonos/m}^2\cdot\text{s}^2$) (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010 a, b).

Fuente de inóculo

Se empleó el aislamiento CV12 de *M. ulei* perteneciente al banco de aislamientos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto Sinchi. Este aislamiento se obtuvo *in vitro* a partir de lesiones conidiales presentes en foliolos infectados en campo (vivero del género *Hevea* del Instituto Sinchi, Itarca, La Montañita, Colombia) y escogido por su virulencia (Sterling et al., 2011). El aislamiento fue conservado en medio de crecimiento (MC) (adaptado de Junqueira et al., 1984) en oscuridad a 24 °C y esporulado en medio M4 (papa dextrosa agar – PDA) (adaptado de Mattos, 1999) con un fotoperíodo de 12 h. El inóculo primario, consistió de conidios crecidos *in vitro* los cuales se depositaron con un pincel pelo de marta (No. 2) en el envés de foliolos en estadio B2 (Hallé et al., 1978) de plantas de un clon altamente susceptible (PB 260) (Sterling et al., 2009). Las esporas se recolectaron a partir de foliolos lesionados 8 días después de la inoculación con un pincel pelo de marta estéril y humedecido con Tween 80 al 0,05%. Se preparó en agua destilada estéril una sus-

pensión de inóculo de 2 x 10⁵ conidios/ml (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a, b).

Material vegetal

Se utilizaron los clones FX 4098 y FX 3864 (tabla 1) procedentes del Jardín clonal del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi en Florencia, Caquetá (Colombia). La identidad varietal del clon FX 3864 fue confirmada por Fonseca y Aristizabal (2010) y la del clon FX 4098 por Quintero et al. (2012), mediante el uso de la técnica SSR usando cinco pares de cebadores microsátélites del genoma de *H. brasiliensis*: hmc4, hmc5, hmct1, hmct5 (Saha et al., 2005), y M574 (Lespinasse et al., 2000; Lekawipat et al., 2003).

Por cada clon de *H. brasiliensis* se emplearon plántulas de 4 meses de edad (dos pisos foliares) crecidas en bolsa con suelo de 7 Kg dentro de cubetas plásticas de 20 cm x 30 cm y mantenidas en una casa de malla a una temperatura promedio de 29,7 °C, una humedad relativa media de 80,8% y una radiación PAR promedio de 275 $\mu\text{mol fotonos/m}^2\cdot\text{s}$. El material vegetal fue fertilizado periódicamente cada dos meses de acuerdo con sus requerimientos nutricionales (Viegas et al., 1992) con aplicaciones edáficas de NPK [Triple 15® (5 g/plántula)] y elementos menores [Agriminis® (5 g/plántula)]. Para las inoculaciones se seleccionaron plántulas libres de síntomas por deficiencias nutricionales o por ataque de plagas o patógenos (Mattos et al., 2003; Sterling et al., 2010a, b).

Inoculaciones controladas y diseño experimental

Las inoculaciones se realizaron en cuarto climatizado a 23 °C y una humedad relativa superior al 90%. Se utilizó una concentración de inóculo de 2 x 10⁵ conidios/ml la cual se asperjó en el envés de 12 foliolos jóvenes (12 días de edad) en estadio B₂ (Hallé et al. (1978) pertenecientes al segundo piso foliar de cada

Tabla 1. Descripción de los clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) evaluados por la reacción a *Microcyclus ulei* en condiciones de inoculación controlada.

Clon	Progenitores	Especie de Hevea	Origen	Tipo de reacción a <i>M. ulei</i>	Descripción general
FX 4098	PB 86 x B 110	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. brasiliensis</i>	Brasil	Resistente	Clon producido por la compañía Ford en Brasil, con características de alta productividad (Mattos et al., 2007), crecimiento vigoroso (Sterling y Correa, 2010; Sterling et al., 2012) con susceptibilidad al secamiento del panel. Resistencia parcial a <i>M. ulei</i> (Le Guen et al., 2008, Sterling et al. 2009, 2010; Rivano et al., 2010).
FX 3864	PB 86 x FB 38	<i>H. brasiliensis</i> x <i>H. brasiliensis</i>	Brasil	Susceptible	Clon secundario desarrollado por la compañía Ford, en el Brasil, resultante del cruzamiento intra específicos de los clones primarios de <i>Hevea brasiliensis</i> . Susceptible a <i>M. ulei</i> (Junqueira et al., 1988; Matos et al., 2003; Sterling et al., 2009)

planta con la ayuda de un aerógrafo acondicionado con un compresor eléctrico calibrado a 4.5 Pa de presión (Sterling *et al.*, 2010a, b). Luego de la inoculación, las plantas permanecieron 24 horas en oscuridad y a partir de ahí hasta el día 20 se sometieron a un fotoperíodo de 12 h (radiación fotosintéticamente activa, PAR: 11.5 μmol fotones/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$).

El experimento consistió en un diseño completamente al azar con dos tratamientos (clon resistente inoculado FX 4098 y clon susceptible inoculado - FX 3864) con cinco repeticiones. La unidad experimental correspondió a cada una de las plantas inoculadas. El experimento se realizó por triplicado.

Evaluación de la enfermedad- componentes fisiológicos

A partir del día 1 después de la inoculación y en adelante hasta el día 20 se evaluaron en cuarto climatizado las siguientes variables:

Severidad de ataque (SA), adaptada de la escala de Gasparotto *et al.* (1989): definida como el porcentaje de área foliar lesionada, valorada de 0 a 4: 0= nulo (0% de área foliar afectada); 1= bajo (0,2 - 5% del área foliar afectada); 2= medio (6 - 15% del área foliar afectada); 3= alto (18 - 30% del área foliar afectada); 4= muy alto (40 - 100% del área foliar afectada).

Intensidad de esporulación conidial (IE) de 1 a 6: 1= lesiones necróticas sin esporas; 2= lesiones cloróticas sin esporas; 3= esporulación muy baja y heterogénea sobre la cara inferior de los folíolos; 4= esporulación alta, heterogénea o parcial sobre la cara inferior de los folíolos; 5= esporulación muy alta y uniforme cubriendo la lesión entera sobre la cara inferior de los folíolos; y 6= esporulación muy alta cubriendo la lesión entera sobre ambas caras de los folíolos (Mattos *et al.*, 2003).

Tamaño de lesión (mm) (TL): el diámetro promedio de la lesión fue calculado a partir de la medición del diámetro de las lesiones observadas en cada folíolo con un pie de rey digital (adaptado de García *et al.*, 1999).

Frecuencia de infección (lesiones/8 cm^2) (FI): El número de lesiones observadas sobre un rectángulo de 8 cm^2 (García *et al.*, 1999).

En ambos clones se determinaron también los períodos de incubación (número de días entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas cloróticos) y de latencia (número de días entre la inoculación y la primera aparición macroscópica de los conidios) (Junqueira *et al.*, 1990).

Análisis estadístico

Se ajustó un modelo lineal general con los factores: clon (FX 3864 y FX 4098), tiempo (4, 8, 12, 16 y 20 días después de la inoculación) y su interacción, así:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk}	variable respuesta (SA, IE, TL, FI)
μ	media general
C_i	efecto del clon i, con $i = 1, 2$
T_j	efecto del tiempo j, con $j = 1, 2, 3, 4, 5$
$(CT)_{ij}$	Interacción clon x tiempo
ε_{ijk}	error residual de la planta k perteneciente al clon i en el tiempo j

La varianza residual se modeló para contemplar varianzas diferentes (Heterocedasticidad, H) por clon, mientras que la correlación residual para las observaciones sucesivas realizadas sobre una misma planta se contempló mediante los modelos de simetría compuesta (SC), autorregresiva de orden 1 (AR1) y sin estructura (SE). Los criterios de Akaike (AIC), Bayesiano (BIC) y LogLik se utilizaron para la selección de la estructura de varianzas y correlaciones residuales (Di Rienzo *et al.*, 2011). Los menores valores para estos criterios indicaron el mejor modelo. El ajuste se realizó mediante la función lme de la librería nlme (Pinheiro *et al.*, 2013) de R (R Core Team, 2013), bajo la interfaz implementada en InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

El análisis de la interacción clon x tiempo para la comparación de medias se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher ($\alpha = 0,05$). Los coeficientes de correlación (Prueba de Pearson) entre las distintas variables se estimaron para cada tiempo con el fin de determinar la variación en el grado de interdependencia de los principales componentes de resistencia al SALB a lo largo del proceso infeccioso en laboratorio. Todas las pruebas estadísticas se corrieron en el programa InfoStat versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Resultados y discusión

Selección del modelo estadístico para el análisis de los datos

El análisis de las variables SA, IE, TL y FI se basó en un modelo de análisis de varianza de datos longitudinales (tablas 2, 3 y 4). El mejor modelo fue el de simetría compuesta con varianzas homogéneas (SC) (tabla 2). En general, para las variables evaluadas, los criterios (AIC y BIC) fueron mínimos para éste modelo, excepto para la variable TL en la cual el modelo SE presentó el menor valor para el criterio AIC (tabla 2). El modelo SC se utilizó para la inferencia estadística principalmente para analizar la significancia de la interacción Clon x Tiempo (tabla 3 y figuras 1A-D).

El modelo seleccionado en éste estudio para analizar la variación temporal del SALB en condiciones de inoculación controlada difiere del utilizado por Rivano *et al.* (2010) quienes reportaron un modelo autorre-

gresivo de primer orden con varianzas heterogéneas (AR1H) para la evaluación mensual de la susceptibilidad al SALB en condiciones de campo en Ecuador. En ambos estudios, los criterios AIC y BIC fueron los más importantes en la elección del modelo.

Reacción del FX 3864 y FX 4098 a *Microcyclus ulei*

M. ulei generó síntomas cloróticos (SA, TL, FI) del SALB en ambos clones de caucho (FX 3864 y FX 4098) (tabla 4), los cuales se observaron a los 4 días después de la inoculación (período de incubación) (figuras 1A-C). Los signos de la enfermedad (IE= 3) se manifestaron a los 8 días en el clon FX 3864 y a los 12 días en el clon FX 4098 (período de latencia) (figura 1D). El clon FX 3864 presentó la mayor susceptibilidad a *M. ulei* con las mayores notas de severidad de la enfermedad (tabla 4) y una esporulación alta, heterogénea sobre la cara inferior de los folíolos (IE= 4) registrada a partir del día 16 después de la inoculación (figura 1D). Luego del día 12 después de la inoculación, en general se observaron a través del tiempo mínimas diferencias en los valores medios de las cuatro variables analizadas (tabla 4 y figuras 1A-D).

El período de incubación observado en este estudio para los clones FX 3864 y FX 4098 fue de 4 días para

ambos clones, muy similar a los reportes de Chee (1976) (5 días), Junqueira *et al.* (1990) (2,6 a 5 días) y García *et al.* (1999) (4,5 días). Según Hashim *et al.* (1978) los folíolos con mayor edad (12 - 20 días) son menos receptivos a la infección por *M. ulei*, por lo que en materiales susceptibles como resistentes, los síntomas se presenta en un mayor tiempo (10 - 25 días después de la inoculación). Lo anterior, podría explicar por qué clones que han demostrado resistencia parcial a *M. ulei* como el FX 4098 (Junqueira *et al.*, 1990, Mattos *et al.*, 2003, Sterling *et al.*, 2010a, b), en este estudio presentó lesiones cloróticas antes de los 5 días, igual a lo observado en el clon más susceptible, el FX 3864.

En relación con el período de latencia, Junqueira *et al.* (1988) observaron signos de *M. ulei* en el clon FX 3864 con un rango de 6,5 a 11 días después de la inoculación, mientras que en el clon FX 4098 fue de 8 a 10 días. Hashim *et al.* (1978) observaron signos del patógeno a los 9 días. García *et al.* (1999), registraron un período de latencia de 7 días en el clon FX 4098. En este estudio el período de latencia para FX 4098 (12 días) fue superior a lo reportado por dichos autores, lo que indica una menor virulencia del aislamiento CV12 en el clon FX 4098. Sin embargo, según Mattos *et al.* (2003), la reacción (resistente o susceptible) a *M. ulei*

Tabla 2. Criterios para la elección del modelo de análisis de datos longitudinales para la evaluación en el tiempo (días) del SALB (*Microcyclus ulei*) en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones de inoculación controlada.

Variable	Severidad de ataque, SA			Intensidad de esporulación conidial, IE			Tamaño de lesión (mm), TL			Frecuencia de infección (lesiones/8cm ²), FI		
	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik	AIC	BIC	LogLik
SC	53,1	73,37	-14,55	40,94	61,21	-8,47	-23,5	-3,23	23,75	135,48	155,75	-55,74
SCH	-	-	-	-	-	-	-24,13	-2,18	25,07	136,71	158,66	-55,35
AR1	65,32	85,59	-20,66	41,07	61,34	-8,54	-18,89	1,38	21,45	175,76	196,03	-75,88
AR1H	-	-	-	-	-	-	-20,73	1,23	23,36	157,93	179,89	-65,97
SE	-	-	-	58,72	94,19	-8,36	-28,56	6,91	35,28	143,28	178,75	-50,64

AIC: Criterio de información de Akaike; BIC: Criterio de información bayesiano; LogLik: Log de Likelihood (Di Rienzo *et al.*, 2011)

SC: Modelo de simetría compuesta con varianzas uniformes; SCH: Modelo de simetría compuesta con varianzas heterogéneas; AR1: Modelo autorregresivo de orden 1 con varianzas uniformes; AR1H: Modelo autorregresivo de orden 1 con varianzas diferentes; SE: Modelo sin estructura. El mejor modelo es el de simetría compuesta con varianzas uniformes (SC).

Tabla 3. Análisis de la varianza basado en el modelo de simetría compuesta con varianzas uniformes (SC).

Efecto	gl	SA	IE	TL	FI
Clon	1	72,25 (<0,0001)	103,14 (<0,0001)	216,62 (<0,0001)	186,12 (<0,0001)
Tiempo	4	53,39 (<0,0001)	89,91 (<0,0001)	87,66 (<0,0001)	42,52 (<0,0001)
Clon x Tiempo	4	2,96 (0,0313)	4,70 (0,0033)	22,47 (<0,0001)	0,78 (0,5432)

SA, severidad de ataque; IE, intensidad de esporulación conidial, TL, tamaño de lesión (mm), FI, frecuencia de infección (lesiones/8 cm²)

Tabla 4. Medias para cuatro componentes fisiológicos asociados a la reacción a *Microcyclus ulei* de dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) evaluados a través del tiempo, en condiciones de inoculación controlada.

Factor	Nivel	Variables de reacción a <i>M. ulei</i>			
		SA	TL	FI	IE
Clon	FX 3864	3,16 ± 0,11 ^a ^b	1,83 ± 0,03 ^a	16,84 ± 0,54 ^a	3,20 ± 0,05 ^a
	FX 4098	1,80 ± 0,11 ^b	1,13 ± 0,03 ^b	6,40 ± 0,54 ^b	2,44 ± 0,05 ^b
Tiempo (días después de la inoculación)	4	1,50 ± 0,10 ^b	1,02 ± 0,04 ^d	9,70 ± 0,42 ^d	1,80 ± 0,08 ^d
	8	2,60 ± 0,10 ^a	1,38 ± 0,04 ^c	11,30 ± 0,42 ^c	2,50 ± 0,08 ^c
	12	2,70 ± 0,10 ^a	1,62 ± 0,04 ^b	11,90 ± 0,42 ^b	2,80 ± 0,08 ^b
	16	0,80 ± 0,10 ^a	1,63 ± 0,04 ^b	12,40 ± 0,42 ^{ab}	3,50 ± 0,08 ^a
	20	2,80 ± 0,10 ^a	1,75 ± 0,04 ^a	12,80 ± 0,42 ^a	3,50 ± 0,08 ^a

a Error estándar

b Valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba LSD, $p < 0,05$)

SA, severidad de ataque; IE, intensidad de esporulación conidial, TL, tamaño de lesión (mm), FI, frecuencia de infección (lesiones/8 cm²)

del clon FX 4098 puede variar según la virulencia del aislamiento probado.

Por otro lado, el período de latencia para el clon FX 3864 (8 días) estuvo dentro del rango observado por Hashim *et al.* (1978) lo que confirma la susceptibilidad de éste clon a *M. ulei*. García *et al.* (1999), afirman que la esporulación en folíolos jóvenes susceptibles en general, se manifiesta entre los 5 y los 8 días posteriores a la inoculación, similar a lo observado en este estudio para el clon FX 3864 (8 días) (figura 1D).

Según las tabla 3 y 4, se encontraron diferencias significativas entre los dos clones de caucho y entre los días después de la inoculación para las cuatro variables del SALB. La prueba de hipótesis con el modelo SC resultó significativa para la interacción Clon x Tiempo en las variables SA, IE y TL (tabla 3). La significancia observada en este estudio por efecto del genotipo también ha sido reportada en condiciones de inoculación controlada por autores como Junqueira *et al.* (1990), García *et al.* (1999), Mattos *et al.* (2003), Le Guen *et al.* (2008) y Sterling *et al.* (2010b, 2011). En relación con el efecto del tiempo, la mayoría de estos estudios han analizado la reacción a *M. ulei* en lecturas iniciales (períodos de incubación y latencia) y finales de la enfermedad (severidad, esporulación conidial, diámetro de lesión, frecuencia de infección, entre otros) entre los 12 y 17 días después de la inoculación.

Análisis de la interacción Clon x Tiempo

El análisis de la interacción Clon x Tiempo para las cuatro variables estudiadas se presenta en las figura 1A-D. En este sentido, se encontró que el valor medio de SA (severidad de ataque) fue de 2,48 el cual osciló entre 1,00 (ataque bajo) para el clon FX 4098 en el día 4 después de la inoculación y 3,60 (ataque alto a muy

alto) en el clon FX 3864 a partir del día 16 después de la inoculación (figura 1A).

A lo largo del tiempo, el valor medio de SA en el clon FX 3864 fue significativamente superior a lo observado en el clon FX 4098 ($p < 0,05$). La SA en el clon más susceptible (FX 3864) se estabilizó a partir del día 12 después de la inoculación, mientras que en el clon FX 4098 ocurrió a partir del día 8 en donde se observó una severidad media máxima constante (SA= 2,00) (figura 1A).

Los mayores tamaños de lesión (TL) se presentaron en el clon FX 3864, las cuales oscilaron entre 1,16 mm y 2,24 mm a los 4 y 20 días después de la inoculación, respectivamente (figura 1B). Entre el día 16 y 20 se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) de TL en el clon FX 3864 contrario a lo registrado en el clon FX 4098. El mayor tamaño de lesión (1,26 mm) en el clon FX 4098 se observó en el día 20 después de la inoculación.

En relación con la frecuencia de infección (FI), en ambos clones se observó un incremento significativo en el número de lesiones hasta el día 12 (6.6 lesiones/ 8 cm² en FX 4098 y 17.2 lesiones/ 8 cm² en FX 3864), en adelante FI no presentó una variación significativa en el tiempo (figura 1C), dado el desarrollo fenológico de los folíolos (estadio C) que impide que el inóculo presente reinfecte (Lieberei, 2007). Aunque la interacción Clon x Tiempo no resultó significativa para FI (tabla 3), la prueba LSD de Fisher mostró diferencias debido al efecto significativo exhibido por los efectos principales (Clon y Tiempo) (ambos, $p < 0,01$) (tablas 3 y 4). Lo anterior significa que aunque el FI medio observado en cada clon no fue influenciado por el tiempo transcurrido entre la inoculación y el avance de la enfermedad (se observó el mismo patrón de incremento), si se evidenció a lo largo del tiempo una mayor susceptibilidad

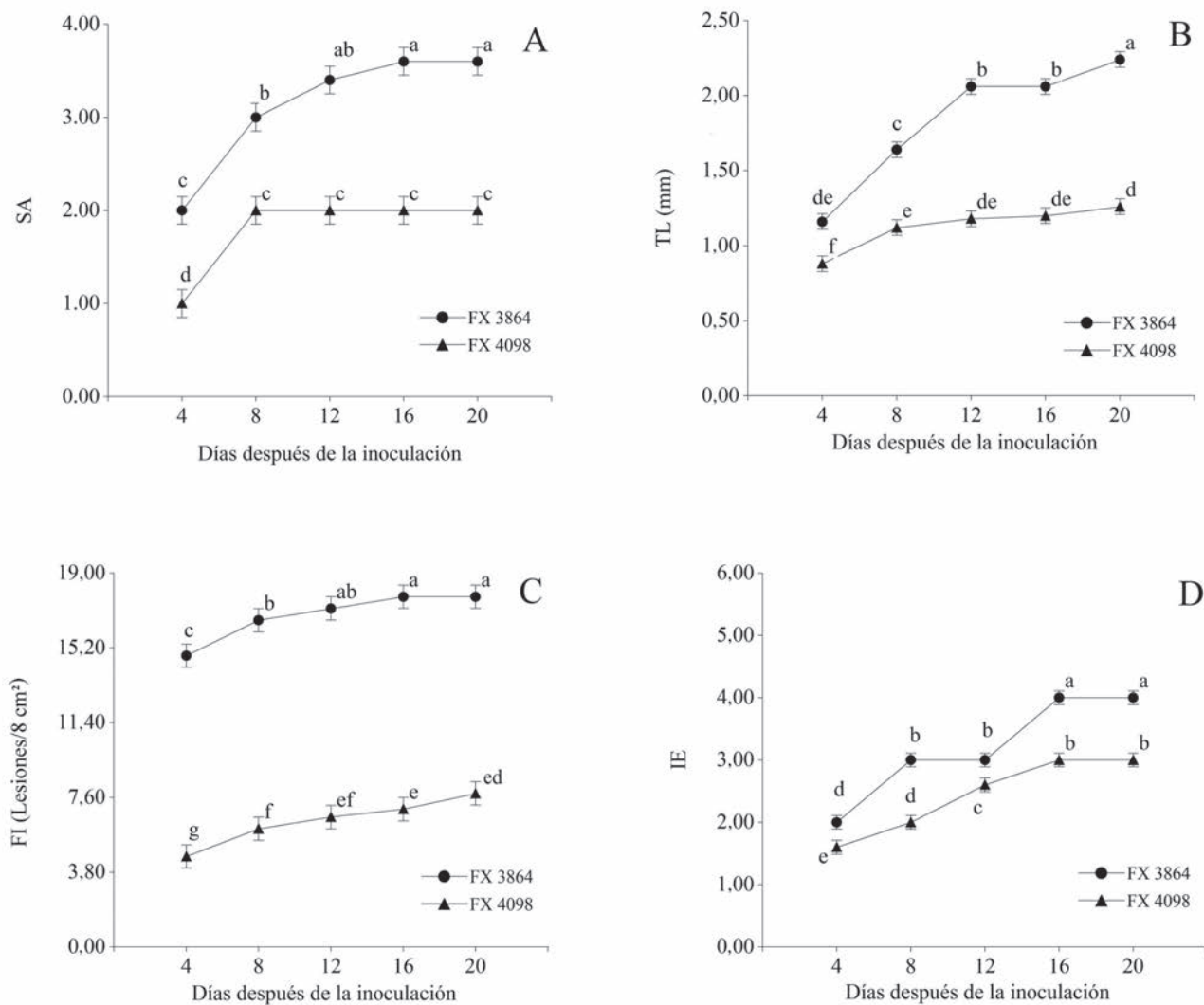


Figura 1. Progreso del SALB (*Microcyclus ulei*) en dos clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) en condiciones de inoculación controlada en Caquetá (Colombia). **A.** Severidad de ataque (SA) de 0 a 4 (0: nulo; 1: leve; 2: medio; 3: alto y 4: muy alto), modificada de la escala de Gasparotto *et al.* (1989). **B.** Tamaño de lesión (mm) (TL) (García *et al.*, 1999). **C.** Frecuencia de infección (Lesiones/8 cm²) (FI) (García *et al.*, 1999). **D.** Intensidad de esporulación conidial (IE) de 1 a 6 (1 y 2: lesiones sin esporas; 3 y 4: lesiones con esporulación débil; 5 y 6: lesiones con esporulación fuerte y muy fuerte, respectivamente), según la escala de Mattos *et al.* (2003). Cada punto representa la media de cinco réplicas. Las barras representan el error estándar. Medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba LSD; $p < 0,05$).

en el clon FX 3864 en relación con el clon FX 4098 (figura 1C).

En relación con los signos del SALB, se observó una esporulación conidial débil ($IE > 2$) en el clon FX 4098 en el día 8 y en el clon FX 3864 en el día 12 posteriores a la inoculación. La máxima $IE (\geq 4)$ (esporulación alta) en el clon FX 3864 se presentó a partir del día 16 y hasta el día 20 después de la inoculación (figura 1D). La mayor producción de esporas ($IE = 3$) en el clon FX

4098 se registró en los días 16 y 20 posteriores a la inoculación.

En general, se observó para este estudio que un aumento en TL conllevó a una mayor severidad (SA) y esporulación (IE) de la enfermedad, aunque la frecuencia de infección (FI) no fuese importante en algunos días posteriores a la inoculación. Esta aseveración es similar a lo afirmado por Hashim y Pereira (1989) quienes reportaron mayores severidades del SALB en clones

que habían desarrollado lesiones de mayores tamaños y menos abundantes por unidad de superficie foliar.

Los resultados de ésta investigación para SA y FI en ambos clones coincide con García *et al.* (1999); se observan mayores notas de éstas variables (mayor susceptibilidad) en el clon FX 3864 y por tanto una mayor resistencia en el clon FX 4098. Sin embargo, las notas medias máximas observadas por García *et al.* (1999) para ambos clones fueron inferiores (SA= 0,8 y FI= 5 para FX 4098 y SA= 1,3 y FI= 15 para FX 3864) a lo observado en este estudio. La mayor susceptibilidad observada en el clon FX 3864 también ha sido reportada en condiciones de campo por diferentes autores (Mattos *et al.*, 2005; Sterling *et al.*, 2009, 2010c; Rivano *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2014).

En este estudio, las variables IE y TL se observaron con medias significativamente diferentes en ambos clones (tabla 2). Sin embargo, García *et al.* (1999) no evidenciaron diferencias para IE y TL entre los clones FX 3864 y FX 4098. Al respecto, Junqueira *et al.* (1988, 1990) afirman que la reacción a *M. ulei* del clon FX 4098 difiere de lo observado en el clon FX 3864, ya que el menor tamaño de lesiones (0,5 a 2,2 mm) y la menor esporulación se observaron en el clon FX 4098.

Hashim y Pereira (1989), Mattos *et al.* (2003), Le Guen *et al.* (2008) y Sterling *et al.* (2010a, b) reportaron que el clon FX 4098 posee una menor esporulación conidial producida por *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada, lo cual es similar a lo encontrado en el presente estudio (figura 1D). García *et al.* (1999) reportaron que el clon FX 4098 y FX 3864 presentan para el aislamiento FTP25 de *M. ulei* los componentes más desfavorables para el desarrollo del hongo. Lo anterior coincide para el clon FX 4098 pero difiere para el clon FX 3864 dado que éste material fue el más susceptible en la presente investigación.

En general, en el presente estudio la mayor resistencia al SALB en el clon FX 4098 también ha sido registrada en campo por García *et al.* (2004), Sterling *et al.* (2009, 2010c, 2012, 2013). No obstante, Rivano *et al.* (2010) en condiciones de campo, observaron en el clon FX 4098 una alta severidad de ataque en hojas jóvenes y maduras y una alta esporulación (mayor a 4) durante el período de mayor precipitación.

Variación de las correlaciones entre variables

Se observaron bajas correlaciones, no significativas ($r \leq 0,45$; $gl= 9$; $p > 0,05$), en el día 12 después de la inoculación entre IE y las tres variables restantes (figura 2). Cabe mencionar además que las bajas correlaciones que se analizaron entre IE y las variables SA y FI en el día 12 también se evidenciaron en el día 4 después de la inoculación. La correlación más baja ($r = 0,44$) se presentó entre IE y FI en el día 4 después de la inoculación. Altas correlaciones significativas ($r \geq 0,84$; $gl=9$; $p < 0,01$) se encontraron entre SA y las variables TL y

FI en todos los puntos del tiempo de progreso de la enfermedad. Lo mismo ocurrió entre TL y FI ($r \geq 0,81$). En general, los coeficientes de correlación se hicieron mayores con el tiempo, es decir, que a lo largo de todo el proceso infeccioso, aumentó la inter-dependencia entre las variables que explican la intensidad de los síntomas y signos del SALB.

El comportamiento atípico evidenciado entre IE y SA especialmente en el día 12 después de la inoculación (figura 2) se puede atribuir al hecho que entre los días 8 y 12, la severidad y la esporulación fueron constantes en los clones FX 4098 y FX 3864, respectivamente (figura 1A) contrario a lo observado en los demás intervalos de tiempo en los que ambas variables se incrementaron significativamente.

Por otro lado, la relación atípica entre la esporulación y las variables TL y FI en el día 12 después de la inoculación, podría explicarse en los valores constantes de IE en el clon FX 3864 entre los días 8 y 12, diferente a lo observado en las variables TL y FI, las cuales se incrementaron significativamente a través del tiempo (figuras 1 B - D).

Las bajas correlaciones observadas en éste estudio en el día 12 entre IE y las variables SA y TL, difieren de Sterling *et al.* (2010b) quienes encontraron para el mismo período de evaluación una importante correlación entre la esporulación y la severidad del SALB ($r = 0,76$). Sterling *et al.* (2011) en condiciones de campo también reportaron una alta correlación entre el ataque y la esporulación ($r = 0,87$) de *M. ulei* en genotipos élite regionales de caucho en la Amazonia colombiana. Con excepción de las correlaciones observadas entre IE y SA en los días 4 y 12 (figura 2), en los demás días del progreso del SALB, la severidad de ataque y la esporulación conidial de *M. ulei* se correlacionaron positivamente ($r \geq 0,90$), similar a los reportes de los autores antes mencionados.

Hashim y Almeida (1987), Hashim y Pereira (1989) y García *et al.* (1999) reportaron la mayor correlación entre el diámetro de lesión y la intensidad de esporulación, resultados que difieren de lo reportado en éste estudio para IE y TL en el día 12 después de la inoculación ($r = 0,47$). Sin embargo, los reportes de estos autores coinciden con el presente estudio en los demás días del progreso del SALB, con coeficientes de correlación altos ($r \geq 0,81$).

En la presente investigación las altas correlaciones observadas a lo largo del tiempo entre TL y FI difieren de García *et al.* (1999) quienes no encontraron correlación entre el tamaño de lesión y la frecuencia de infección. Sin embargo, las correlaciones entre la severidad del SALB y la producción de esporas, y también entre producción de esporas y el tamaño de lesión, fueron similares a las observadas en éste estudio. Adicionalmente en ésta investigación entre los días 12 y 20 después de la inoculación se evidenciaron correlaciones

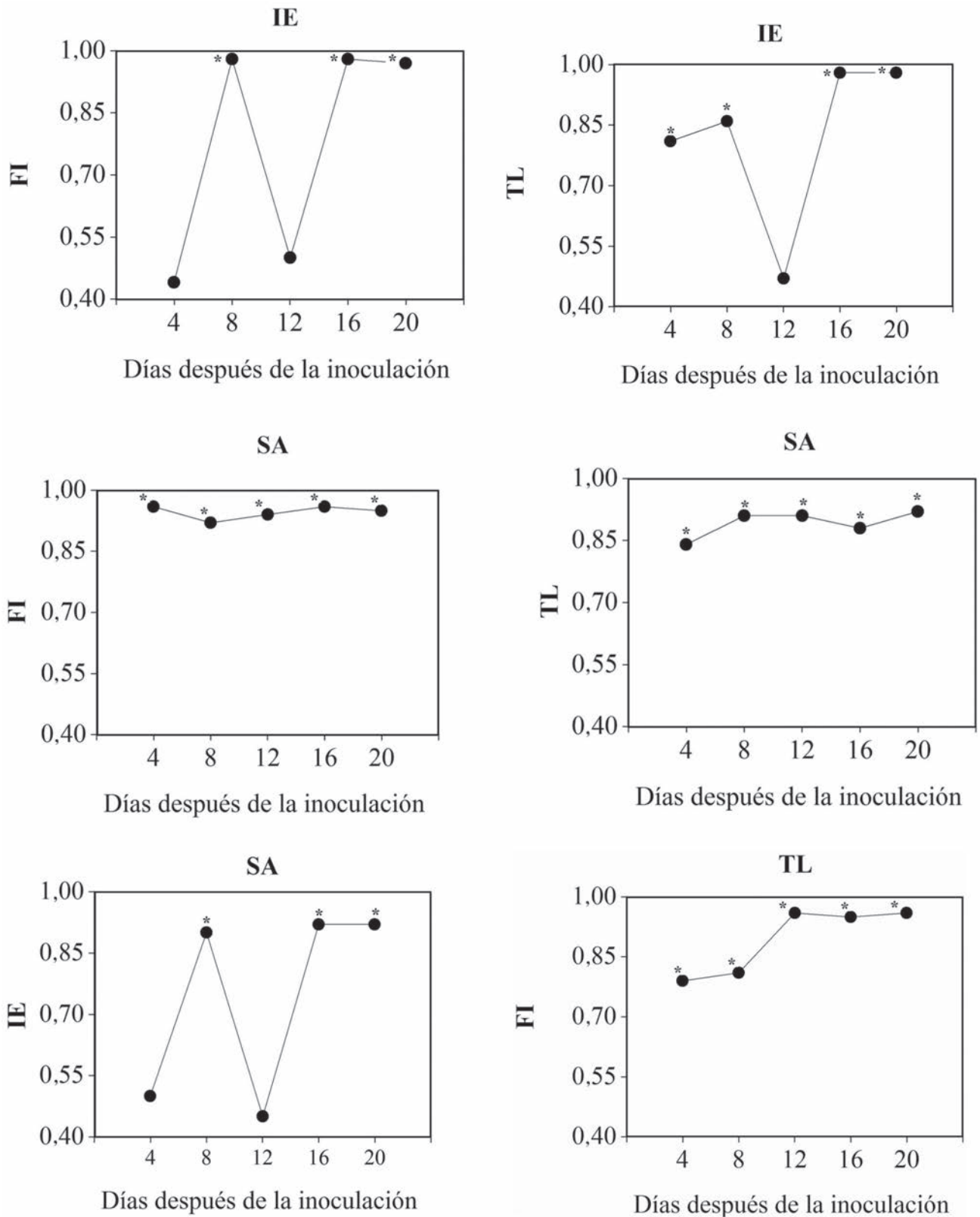


Figura 2. Correlaciones entre las cuatro variables de reacción a *Microcyclus ulei* evaluadas en los clones de caucho (*Hevea brasiliensis*) FX 3864 y FX 4098 a través del tiempo (días después de la inoculación). Severidad de ataque (SA). Intensidad de esporulación conidial (IE). Tamaño de lesión (mm) (TL). Frecuencia de infección (Lesiones/8 cm²) (FI). Los asteriscos indican correlaciones significativas en un punto del tiempo dado (Prueba Pearson; $p < 0,05$).

altas y uniformes entre TL y FI. Lo anterior indicaría que el desarrollo de la enfermedad a partir del día 12 avanzó con tamaños y frecuencias de lesiones con un patrón de crecimiento uniforme hasta el final del seguimiento.

Conclusiones

El análisis de la variación temporal de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de los clones de *H. brasiliensis* FX 3864 y FX 4098 a *M. ulei*, permite concluir que en condiciones controladas, la intensidad y la frecuencia de los síntomas así como el grado de esporulación producidos por *M. ulei* cambian significativamente a través del tiempo y esta variación está influenciada a su vez por el nivel de susceptibilidad a *M. ulei* presentado por cada clon. Se observa además que la variación temporal de los síntomas y signos del SALB en los clones FX 3864 y FX 4098, afecta significativamente el grado de inter-correlación entre las variables de ataque y esporulación conidial especialmente entre los días 8 y 12 posteriores a la inoculación. Este estudio es el primer reporte en el que se analiza desde un enfoque multi-temporal los cambios de los principales componentes fisiológicos asociados a la reacción de los clones FX 3864 y FX 4098 a *M. ulei* en condiciones de inoculación controlada durante la fase infecciosa de la enfermedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto: Evaluación del asocio agrisilvícola: caucho (*Hevea brasiliensis*) – nuevos clones de copoazú (*Theobroma grandiflorum*) mediante el uso de indicadores agronómicos, ecofisiológicos, bioquímicos y epidemiológicos en el departamento del Caquetá. Contrato RC No.746 -2011- Fiduciaria Bogotá – Colciencias – Sinchi – UNAL - Asoheca por el soporte económico a la presente investigación.

Referencias bibliográficas

Asoheca (Asociación de Reforestadores y Cultivadores de Caucho del Caquetá, CO). 2014. Información estadística de caucho en el Departamento del Caquetá (Colombia) a diciembre de 2013. Documento interno de agronegocios. Ed. I. Dussan. p. 2.

Cardoso, S.E.A.; Freitas, T.A.; Silva, D. da C.; Gouvea, L.R.L.; Goncalves, P.; Mattos, C.R.R.; García D. 2014. Comparison of growth, yield and related traits of resistant *Hevea* genotypes under high South American leaf blight pressure. Brasil. *Industrial Crops and Products*. 53: 337-349.

Castellanos, D.O.; Fonseca, R.S.; Barón, N.M. 2009. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de caucho natural y su industria en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural/Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. p. 209.

Chee, K.H. 1976. Assessing susceptibility of *Hevea* clones to *Microcyclus ulei*. *Ann. Appl. Biol.* 84: 135-145.

Chee, K.H.; Holliday, P. 1986. South American leaf blight of *Hevea* Rubber. Malaysian Rubber Research and Development Board. *Malaysian Rubber Research and Development Board Monograph*.13: 50.

Compagnon, P. 1998. El Caucho Natural, Biología - Cultivo - Producción. Consejo Mexicano del Hule - CIRAD. México, D. F. p. 701.

Di Rienzo, J.A.; Macchiavelli, R.E.; Casanoves, F. 2011. Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat. 1ª ed. Grupo Infostat. Córdoba, Argentina. p. 248.

Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Fecha de consulta: 21 de julio de 2013. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

Fonseca, P.D.; Aristizabal, G.F.A. 2010. Contribución a la certificación por técnicas moleculares del material comercial de *Hevea brasiliensis* de interés para Colombia. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia – IBUN – Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi. Fecha de consulta: 09 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://biblioteca.agronet.gov.co:8080/jspui/handle/123456789/1910>.

Furtado, E.L.; Menten, J.O.M.; Passos, J.R. 2008. Intensidade do Mal das Folhas em plantas jóvenes e adultas de seis clones de seringueira na regio do Vale do Ribeira. *Tropical Plant Pathology, Brasilia*, DF. 2 (33): 130-137.

García, D.; Troispoux, V.; Grance, N.; Rivano, F.; Auzac, D. 1999. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. *Eur. J. For. Path.* 29: 323-338.

Gasparotto, L.; Zambolim, L.; Maffia, L.A.; Ribeiro, D.O.; Vale, F.X.; Junqueira, N.T.V. 1989. Efeito da temperatura e umidade sobre a infeccao de seringueira (*Hevea* spp.) por *Microcyclus ulei*. *Fitopatol.Bras.* 14 (1).

Gasparotto, L.; Ferreira, F.A.; dos Santo, A. F.; Rezende, P.J.C.; Furtado, E.L. 2012. Capítulo 3: Doenças das folhas. pp. 39-176. En: Gasparotto L.; Pereira R.J.C. (Eds.). Doenças da seringueira no Brasil. EMBRAPA Amazônia Occidental. Brasília, DF. 255 p.

Guyot, J.; Condina, V.; Doaré, F.; Cilas, C.; Sache, I. 2010. Segmentation applied to weather-disease relationships in South American leaf blight of the rubber tree. *Eur. J. Plant. Pathol.* 126: 349-362.

Hallé, F.; Oldeman, R.; Tomlinson, P.B. 1978. Tropical trees and forest. Springer-verlag. Berlin, DE. p. 441.

Hashim, I.; Chee, K.H.; Duncan, E.J. 1978. Reaction of *Hevea* leaves to infection with *Microcyclus ulei*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaysia*. 26 (2): 67-75.

Hashim, I.; Almedia, L.C.C. 1987. Identification of races and in vitro Sporulation of *Microcyclus ulei*. *J. Nat. Rubb. Res.* 2 (2): 111-117.

Hashim, I.; Pereira, J.C. 1989. Lesion Size, latent period and sporulation on leaf Discs as indicators of resistance of *Hevea* to *Microcyclus ulei*. *J. Nat. Rubb. Res.* 4 (11): 56-65.

IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, CO). 2010. Caquetá, características geográficas. Imprenta Nacional de Colombia. Bogotá. p. 373.

IRSG (International Rubber Study Group, SI). 2013. Rubber Statistical Bulletin. Noviembre de 2013. Fecha de consulta: 2 de Abril de 2014. Disponible en: <http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>

Junqueira, N.T.V.; Chaves, G.M.; Zambolim, L.; Romeiro R., da S.; Gasparotto, L. 1984. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres*. 31: 322-331.

Junqueira, N.T.V.; Lieberei, R.; Kail Filho, A.N.; Lima, M.I.P.M. 1990. Components of partial resistance in *Hevea* clones to rubber tree leaf blight, caused by *M. ulei*. *Fitopatologia Brasileira*.15: 211- 214.

Le Guen, V.A.; Guyot, J.B.; Mattos, C.C.R.; Seguin, M.A.; Garcia, D. 2008. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop Protection*. 27: 1498-1503.

Lekawipat, N.; Teerawatanasuk, K.; Rodier-Goud, M.; Seguin, M.; Vanavichit, A.; Toojinda, T.; Tragoonrun, S. 2003. Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea*

- brasiliensis* Muell. Arg. By using microsatellite markers. *Journal of Rubber Research*. 6 (1): 36-47.
- Lespinasse, D.; Roider-Goud, M.; Grivet, L.; Leconte, A.; Legnate, H.; Seguin, M. 2000. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) bases on RPLP, AFLP, microsatellite and isozyme markers. *Theoretical Applied Genetics*. 100: 127-138.
- Lieberei, R. 2007. South american leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. *Invited Review. Annal of Botany*. 100: 1125-1142.
- MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CO) - Agronet (Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario, CO). 2013. Presentación Subsector Heveícola Colombiano.
- Mattos, C.R.R. 1999. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. *Fitopatologia Brasileira*. 24: 470.
- Mattos, C.R.R.; García, D.; Pinard, F.; Le Guen, V. 2003. Variabilidade de Isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste de Bahia. *Fitopatologia Brasileira*. 28 (5): 502-507.
- Mattos, C.R.R.; García, D.; Le Guen, V. 2005. Seleção de Clones de Seringueira com Alta Produção e Resistentes ao Mal-Das-Folhas. *Ceplac. Comunicação técnico*. 28: 1-9.
- R Core, Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Fecha de consulta: 21 de julio de 2013. Disponible en: <http://www.R-project.org/>
- Pinheiro, J.; Bates, Douglas; Saikat, D.; Deepayan Sarkar and the R development core team. 2013. Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. *R package version*. (3): 1-109.
- Quintero, B.L.; Zapata, O.J.A.; Bolaños, M.D.C.; Sterling, C.A.; Rodríguez, A.O.L. 2012. Caracterización morfológica y molecular de diez clones de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) promisorios para la Amazonia colombiana. pp. 123-147. En: Sterling, C.A., Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Ampliación de la base genética de caucho natural con proyección para la Amazonia colombiana: fase de evaluación en período improductivo a gran escala. Capítulo 4. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 147 p.
- Rivano, F.; Martínez, M.; Cevallos, V.; Cilas, C. 2010. Assessing resistance of rubber tree clones to *Microcyclus ulei* in large-scale clone trials in Ecuador: a less time-consuming field method. *Eur J. Plant Pathol*. 126: 541-552.
- Saha, T.C.; Bindu, R.; Nazeer, M.A. 2005. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding*. 124: 86-92.
- STN (Secretaría Técnica Nacional del Caucho, CO). 2013. Ministerio de Agricultura - Presentación Subsector Heveícola Colombiano a diciembre 2013. En: Congreso Internacional Cauchero 2014. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Sterling, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L.; Correa, J. 2009. Evaluación fitosanitaria y resistencia in campo a *Microcyclus ulei* de *Hevea brasiliensis* en la Amazonia Colombiana. *Revista Colombia Amazónica*. 2: 80-90.
- Sterling, A.; Correa, J. 2010. Desempeño de una colección clonal de caucho en período de inmadurez en la Amazonia colombiana. *Ingenierías & Amazonia*. 3 (1): 16-27.
- Sterling, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L. 2010a. Variabilidad fisiológica de aislamientos de *Microcyclus ulei* de la Amazonia colombiana. *Revista Momentos de Ciencia*. 7 (1): 30-35.
- Sterling, A.; Calderón, A.; Rodríguez, O.L.; Quintero, L. 2010b. Caracterización morfológica y patogenicidad de *Microcyclus ulei* en la Amazonia colombiana. *Revista Colombia Amazónica*. 3: 99-116.
- Sterling, A.; Galindo, L.C.; Correa, J. 2010c. Incidencia y severidad de *Microcyclus ulei* en una colección de caucho en la Amazonia colombiana. *Ingenierías y Amazonia*. 3 (2): 93-104.
- Sterling, C.A.; Galindo, L.C.; Rodríguez, O.L.; Martínez, A.K.; Bonilla, R.N.M. 2011. Evaluación de la resistencia a *M. ulei* de los mejores genotipos élites de *H. brasiliensis* de origen franco bajo condiciones naturales y controladas. pp. 139-171. En: Sterling, C.A., Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Nuevos clones de caucho natural para la Amazonia Colombiana: Énfasis en la resistencia al Mal Suramericano de las Hojas (*Microcyclus ulei*). Capítulo 5. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 195 p.
- Sterling, C.A.; Rodríguez, L.C.H.; Dussán, H.I.; Correa, D.J.; Vargas, L.M.A.; Centeno, C.A.; Sánchez, L.R.; Rodríguez, M.A.F.; Plaza, C.D.; Gaviria, D.C.; Salas, T.Y.M.; Ossa, M.E.O.; Ruiz, T.P.N.; Castillo, O.J.O. 2012. Evaluación fitosanitaria con énfasis en la resistencia a *Microcyclus ulei* de diez clones de caucho natural (*Hevea brasiliensis*) en Campo Clonal a Gran Escala CCGE. pp. 79-121. En: Sterling, C.A.; Rodríguez, L.C.H. (Eds.). Ampliación de la base genética de caucho natural con proyección para la Amazonia colombiana: fase de evaluación en período improductivo a gran escala. Capítulo 3. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas - SINCHI. Bogotá. Colombia. 147 p.
- Sterling, A.; Rodríguez, C.H.; Vargas, M.A.; Caicedo, D.F.; Dussán, I. 2013. Resistencia a *Microcyclus ulei* de clones promisorios de *Hevea brasiliensis* en sistema agroforestal en la Amazonia colombiana. p 51. En: Mena V.E., Andrade H.J., Mora J.R. (Eds). Memorias IV Seminario Internacional de Agroforestería 2013. Universidad Tecnológica del Chocó - Red Agroforestal de Universidades de Colombia (RAUC). Quibdó (Chocó), Colombia. 86 p.
- Viégas, J.M.; Haag, M.; Bueno, N.; Pereira, J.D.A. 1992. Nutricao mineral de seringueira. XII. Absorção de macro e micronutrientes nos primeiros 240 dias. *Scientia Agricola*. 49 (1): 41-52.