



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL - PPGPV**

VANUSA RODRIGUES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE CLONES DE CACAUEIRO PARA RESISTÊNCIA A
Phytophthora palmivora POR INOCULAÇÃO EM DISCOS DE FOLHAS E
FRUTOS DESTACADOS E INFECÇÃO NATURAL A CAMPO**

ILHÉUS - BAHIA

2019

VANUSA RODRIGUES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE CLONES DE CACAUEIRO PARA RESISTÊNCIA A
Phytophthora palmivora POR INOCULAÇÃO EM DISCOS DE FOLHAS E
FRUTOS DESTACADOS E INFECÇÃO NATURAL A CAMPO**

Dissertação apresentada à Universidade
Estadual de Santa Cruz para obtenção do
título de Mestre em Produção Vegetal

Linha de pesquisa: Proteção de Plantas

Orientadora: Prof^ª. PhD. Edna Dora
Martins Newman Luz

Coorientadores: Prof. D.Sc. Jadergudson
Pereira

Dr. José Luis Pires

ILHÉUS – BAHIA

2019

VANUSA RODRIGUES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DE CLONES DE CACAUEIRO PARA RESISTÊNCIA A
Phytophthora palmivora POR INOCULAÇÃO EM DISCOS DE FOLHAS E
FRUTOS DESTACADOS E INFECÇÃO NATURAL A CAMPO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal.

Ilhéus, 20 de fevereiro de 2019.

Prof^a. PhD. Edna Dora Martins Newman Luz
UESC/CEPLAC
(Orientadora)

Prof. Dr. José Luiz Bezerra
UESC/UFRB

Dr. Marcos Vinícius Oliveira dos Santos
UESC

DEDICATÓRIA

À minha mãe biológica, Maria de Lourdes de Jesus (*in memoriam*), que muito sofreu em vida, ao agir com a razão, para que eu tivesse uma melhor educação e, assim, chegasse até esta etapa da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por permitir que eu tenha determinação e foco para alcançar os meus objetivos, sempre.

À Universidade Estadual de Santa Cruz-UESC e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela bolsa de pesquisa concedida.

À Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), Ilhéus-BA, por concederem a infraestrutura e disponibilizarem servidores para a execução e desenvolvimento desta pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. PhD. Edna Dora Martins Newman Luz, pela orientação, zelo, amizade e apoio durante todo o curso.

Ao Dr. José Luis Pires, pelas importantes contribuições no planejamento e desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. D.Sc. Jadergudson Pereira, pelo conhecimento transmitido, pelo incentivo e amizade.

À funcionária do CEPEC/CEPLAC Cenilda Serra, pelo apoio, carinho, amizade e pela fundamental colaboração.

Às amigas de laboratório, e agora de vida, Elisângela dos Santos, Francis Tocaundo, Giselle de Souza Rodrigues e Tita Primo, pelo apoio, amizade, carinho e pelas contribuições na execução deste trabalho.

Aos funcionários dos setores de Fitopatologia e Genética da CEPLAC, Agostinho Carlos Gomes (*in memoriam*), Luiz Carlos de Almeida, Maria de Lourdes Alves, Magnaldo Nascimento, Eduardo Catarino da Silva, Denise Argôlo, Dilze Maria Argôlo, Joel Feitosa, Ana Rosa Niella, Virgínia Damasceno, Verinha, Senhor Crispim e demais servidores, pelas contribuições, pelo apoio, incentivo e zelo para comigo ao longo de toda essa trajetória do curso de Mestrado.

Ao estagiário Willian, pela importante colaboração na execução deste trabalho.

À minha família, que não me deixou faltar apoio, carinho e incentivo para que eu alcançasse e cumprisse esta etapa da minha vida, especialmente às

peças que me criaram e fizeram com que eu chegasse até aqui: vó Olira Fernandes (*in memoriam*), minhas mães Maria de Lourdes de Jesus (*in memoriam*), Mara Rúbia Fernandes e Maria Margarete Fernandes; minhas tias Emília Fernandes, Maria Nívia Fernandes, Maria dos Santos Fernandes e Pedro Fernandes. Aos demais tios e tias, que sempre torceram pelo meu crescimento e vitória.

Aos meus irmãos Dan Fernandes, Fabiana Rodrigues, Flávia Fernandes, Gustavo Fernandes, Luis Rodrigues, Lúcia Rodrigues e Vera Lúcia Rodrigues, por todo o apoio, incentivo e torcida para o meu sucesso (amo vocês).

Aos meus primos Ákila Fernandes e Carlos Roberto Felizardo, pelo apoio e incentivo; e aos demais primos pela torcida, incentivo e carinho.

Ao amigo Gonçalo de Cássia Meira Assis, pelo suporte, amizade, convívio e zelo... minha eterna gratidão.

Às amigas Deisy Janiny, Kaelem Souza, Samile Naiane, Nádia Sanábria e Alice Marssaro, pelo apoio, pela amizade, carinho e pelas experiências compartilhadas.

Aos amigos Lúcia Bezerra e Roberto Tocafundo por todo o apoio durante essa trajetória, incentivo e torcida para o sucesso no resultado deste trabalho.

Aos professores, pelos ensinamentos e pela convivência durante este período, em especial ao Dr. José Luiz Bezerra, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários da UESC/PPGPV, especialmente Caroline Tavares, pela convivência, pela eficiência e pela contribuição para o meu bom desempenho durante o curso de Mestrado.

A todos os colegas de Curso e amigos (Turma 2017), que estiveram presentes com estímulo, amizade, parceria e experiências compartilhadas ao longo do trajeto do curso.

Agradeço.

“Não são os sonhos que me movem, mas a fé, o foco e a determinação para alcançá-los”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O cacaueteiro (<i>Theobroma cacao</i> L.)	4
2.2 Doenças do cacaueteiro	6
2.2.1 Podridão Parda	7
2.3 O gênero <i>Phytophthora</i> e a espécie <i>P. palmivora</i> (E. J. Butler) E. J. Butler	11
2.4 Resistência de plantas à doença	13
2.4.1. Métodos de avaliação de resistência do cacaueteiro a <i>Phytophthora palmivora</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Material genético vegetal	16
3.2 Preparo do inóculo	16
3.3 Inoculação em discos de folhas	19
3.4 Inoculação em frutos verdoengos destacados	22
3.5 Infecção natural dos clones em campo	24
3.6 Análise estatística	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Severidade da doença (ID) em discos de folhas	25
4.2 Área da lesão (A) em frutos destacados	29
4.3 Correlação entre os testes de discos de folhas e frutos destacados e infecção natural a campo	32
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Clones de cacauero avaliados quanto à resistência a *Phytophthora palmivora*.17
- Tabela 2 - Isolados de *Phytophthora palmivora* provenientes de diferentes regiões produtoras de cacau no Sul da Bahia - Brasil.18
- Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) entre os níveis de severidade obtidos para os 78 clones pela avaliação dos sintomas aos sete dias após a inoculação em discos de folhas com suspensão de *Phytophthora palmivora* (3×10^5 zoósporos/mL⁻¹).25
- Tabela 4 - Índices de severidade da doença (ID) em discos de folhas de cacauero inoculados com *Phytophthora palmivora* e classificação dos 78 clones avaliados quanto à resistência a Podridão Parda, em cada um dos ensaios realizados (E1 e E2).27
- Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) entre as médias obtidas pela avaliação da área da lesão em frutos destacados de clones de cacauero aos nove dias após a inoculação com suspensão de *Phytophthora palmivora* (3×10^5 zoósporos/mL⁻¹).30
- Tabela 6 - Áreas médias de lesões (A) causadas por *Phytophthora palmivora* em frutos verdoengos destacados de 68 clones de cacauero.31
- Tabela 7 - Correlação entre os níveis médios de infecção por *Phytophthora palmivora* em discos de folhas e em frutos verdoengos destacados de cacaueros e a infecção natural dos clones à campo.33

Tabela 8 - Índices médios de severidade (ID) da Podridão Parda em discos de folhas de cacauero em diferentes ensaios (E1 e E2), área da lesão (A) em frutos destacados e valores percentuais de infecção natural dos clones à campo.	35
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ativação e repicagem de isolados de *Phytophthora palmivora* em meio cenoura-ágar (CA) e meio seletivo (MS). Isolados de *P. palmivora* conservados pelo método Castellani (**A**); Transferência de discos de micélio contendo estruturas de *P. palmivora* do Castellani para placas de Petri contendo meio CA (**B e C**); Repicagem de placas (**D**); Placas repicadas mantidas sob iluminação constante por sete dias (**E**).19
- Figura 2 - Preparo do inóculo e ajuste da concentração da suspensão de zoósporos de *Phytophthora palmivora*. Adição de água gelada nas placas de Petri em meio cenoura-ágar contendo micélio e estruturas do patógeno (**A**); Observação, ao microscópio, da esporulação nas culturas (**B**); Contagem de zoósporos, ao microscópio, usando a câmara de Neubauer (**C e D**).20
- Figura 3 - Inoculação com mistura de isolados de *Phytophthora palmivora* em discos de folhas de clones de cacaueteiro. Corte dos discos com cortador semiautomático (**A**); pipeta semiautomática e mistura de suspensões de zoósporos de isolados do patógeno (**B**); Pipetagem e aplicação do inóculo nos discos (**C**).21
- Figura 4 - Escala ilustrativa de notas desenvolvida por Nyassé et al. (1995).22
- Figura 5 - Etapas da inoculação com mistura de isolados de *Phytophthora palmivora* em frutos verdeongos destacados de clones de cacaueteiro. Frutos em câmara úmida (**A**); Imersão dos discos de papel filtro na mistura de suspensões de zoósporos (**B**); Deposição dos discos em dois pontos da superfície do fruto (**C**); Avaliação da área da elipse das lesões nos dois pontos inoculados (**D, E e F**).23

**AVALIAÇÃO DE CLONES DE CACAUEIRO PARA RESISTÊNCIA A
Phytophthora palmivora POR INOCULAÇÃO EM DISCOS DE FOLHAS E
FRUTOS DESTACADOS E INFECÇÃO NATURAL A CAMPO**

RESUMO

Phytophthora palmivora é a mais importante espécie que causa a Podridão Parda do cacau, por ocorrer em todos os países produtores de cacau no mundo. No Brasil, ela é a espécie predominante nos cacauais da região Sul do estado da Bahia. A avaliação para resistência é sempre feita através de diversos métodos de inoculação artificial. No entanto, paira a dúvida se a seleção de genótipos utilizada dessa maneira corresponde à realidade do comportamento a campo. O objetivo deste trabalho foi testar 78 clones de cacauero quanto à avaliação da reação por inoculação com *Phytophthora palmivora* em discos de folhas e frutos destacados e comparar com as avaliações a campo da infecção natural por *Phytophthora*. Para isso, foram usados clones de cacauero do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do CEPEC/CEPLAC/Ilhéus-Bahia, Brasil (AMAZON2.1, AMAZON15.15, APA5, CAB4, CAB5003.23, CAB5046.1201, CAB5046.1403, CCN51, CEPEC38, CEPEC40, CEPEC42, CEPEC44, CEPEC75, CEPEC82, CEPEC84, CEPEC85, CEPEC89, CEPEC92, CEPEC93, CEPEC526, CEPEC1008, CHUAO120, CJ7, CJ10, CSUL4, CSUL5, EET62, EET272, EET390, EET392, ICS78, ICS95, ICS100, IMC2, IMC23, IMC51, MA12, MOCORONGO1, MOCORONGO2, MOQ417, MOQ647, NA33, NA312, OC77, PA15, PA30, PA44, PA51, PA70, PA88, PA120, PA148, PA150, PA169, PA285, PA294, RB31, RB32, RB33, RB39, RIM44, RIM117, SCA6, SIAL164, SIAL505, SIAL542, SIC19, SIC23, SIC842, SIC864, SIC891, SPA5, SPA12, TSA516, TSA644, TSA654, UF36, F667), que foram inoculados com suspensão de esporos (3×10^5 zoósporos/mL⁻¹) obtida da mistura das suspensões de sete isolados do patógeno. Os discos de folhas (8 repetições de 5 discos/bloco/clone) foram inoculados com 10 µL da mistura de suspensões, em dois ensaios (E1 e E2) e os frutos destacados foram inoculados em dois pontos opostos, com discos de papel filtro imersos na mistura de suspensões, em delineamento inteiramente casualizado, com número variável de repetições/clone. Os dados foram transformados para índice de severidade da doença (ID) em discos de folhas e área da lesão (A) em frutos destacados e correlacionados, por meio da correlação linear de Pearson, com a infecção em campo registrada pelo BAG/CEPEC/CEPLAC. Em muitos clones formaram-se lesões nos pontos inoculados com o patógeno, em todos os testes de inoculação, porém houve ampla variação nas médias tanto para o ID (discos de folhas) quanto para A (frutos destacados). Os índices de correlação foram significativos entre os dois testes realizados com discos de folhas (E1 e E2); entre E1 e frutos destacados; entre E2 e infecção em campo; e entre frutos destacados e a infecção em campo. O maior coeficiente de correlação foi entre frutos destacados e a infecção natural em campo. Existe, portanto, correlação entre inoculações artificiais com *P. palmivora* e infecção natural em campo.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Podridão Parda. Métodos de inoculação. Mistura de isolados. Correlação entre métodos.

EVALUATION OF COCOA CLONES FOR RESISTANCE TO *Phytophthora palmivora* BY INOCULATION IN LEAF DISKS AND DETACHED FRUIT AND NATURAL FIELD INFECTION

ABSTRACT

Phytophthora palmivora is the most important species that causes brown rot of cocoa because it occurs in all cocoa producing countries in the world. In Brazil, it is the predominant species in the cocoa plantations of the southern region of the state of Bahia. The evaluation for resistance is always done through several methods of artificial inoculation. However, the question remains whether the selection of genotypes used in this way corresponds to the reality of field behavior. The objective of this work has been to test 78 cocoa clones for the evaluation of the reaction by inoculation of *Phytophthora palmivora* on leaf disks and fruit and compare it with the field evaluations of the natural infection by *Phytophthora*. For this, cocoa clones have been used from the Germoplasma Active Bank (BAG) do CEPEC/CEPLAC/Ilhéus-Bahia, Brasil (AMAZON2.1, AMAZON15.15, APA5, CAB4, CAB5003.23, CAB5046.1201, CAB5046.1403, CCN51, CEPEC38, CEPEC40, CEPEC42, CEPEC44, CEPEC75, CEPEC82, CEPEC84, CEPEC85, CEPEC89, CEPEC92, CEPEC93, CEPEC526, CEPEC1008, CHUAO120, CJ7, CJ10, CSUL4, CSUL5, EET62, EET272, EET390, EET392, ICS78, ICS95, ICS100, IMC2, IMC23, IMC51, MA12, MOCORONGO1, MOCORONGO2, MOQ417, MOQ647, NA33, NA312, OC77, PA15, PA30, PA44, PA51, PA70, PA88, PA120, PA148, PA150, PA169, PA285, PA294, RB31, RB32, RB33, RB39, RIM44, RIM117, SCA6, SIAL164, SIAL505, SIAL542, SIC19, SIC23, SIC842, SIC864, SIC891, SPA5, SPA12, TSA516, TSA644, TSA654, UF36, F667), which have been inoculated with spore suspension (3×10^5 zoospores/mL⁻¹) obtained from the mixture of the suspensions of seven pathogen isolates. Leaf disks (8 replicates of 5 disks/block/clone) have been inoculated with 10 μ L of the suspension mixture in two trials (E1 and E2) and the detached fruits have been inoculated at two opposite points with filter paper disks immersed in mixture of suspensions in a completely randomized design with variable number of replicates/clone. The data have been transformed into disease severity index (ID) in leaf disks and lesion area (A) in detached and correlated fruits, using Pearson's linear correlation with field infection recorded by BAG/CEPEC/CEPLAC. In many clones lesions were formed at the sites inoculated with the pathogen in all inoculation tests, but there has been a wide variation in the means for both the ID (leaf disks) and A (detached fruits). Correlation indexes were significant between the two tests performed with leaf disks (E1 and E2); between E1 and fruits detached; between E2 and infection in the field; and between detached fruits and the infection in the field. The highest coefficient of correlation has been between detached fruits and the natural infection in the field. There is, therefore, correlation between artificial inoculations with *P. palmivora* and natural infection in the field.

Keywords: *Theobroma cacao*. Brown rot. Methods of inoculation. Mixture of isolates. Correlation between methods.

1 INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta pertencente à família Malvaceae e originária das regiões pluviais da América Tropical, tendo como centros de difusão e origem a América Central e o norte da América do Sul (WHITLOCK; BAYER; BAUM, 2001; SÁNCHEZ, 2011).

Até a década de 80, o Brasil ocupava o segundo lugar no ranking mundial de produção de amêndoas de cacau (HANADA, 2006). Atualmente, o país é o quinto maior produtor, com cerca de 200 mil toneladas de amêndoas produzidas em 2018, ficando atrás de Costa do Marfim, Camarões, Gana e Nigéria. A Bahia é o maior produtor nacional com 125,2 mil toneladas de amêndoas, apresentando um aumento de 26% em relação a 2017, e o estado do Pará produziu cerca de 73 mil toneladas, voltando a ser o segundo maior produtor do país (ICCO, 2018; CONAB, 2018; RAMOS, 2019).

A região Sul da Bahia é área tradicional de cultivo de cacau, entretanto, apesar da importância econômica da cultura para o estado, a ocorrência de doenças configura-se como um dos principais problemas para o aumento da produtividade nas plantações de cacau no Sul do estado. Essas enfermidades acarretam redução na produção e têm contribuído, entre outros fatores, para retardar a retomada do crescimento da cacauicultura na região (PAIM et al., 2006).

O gênero *Phytophthora* spp. pertence ao reino Straminipila e é patogênico a diversas espécies vegetais de importância econômica no Brasil (BEAKES; HONDA; THINES, 2014; LUZ et al., 2013). No cacauieiro, esse patógeno provoca a enfermidade conhecida como Podridão Parda dos frutos do cacauieiro (PP), podendo

infectar todas as partes da planta, sendo os maiores prejuízos o ataque aos frutos (LUZ; SILVA, 2001).

A Podridão Parda ou Podridão de *Phytophthora* é, em termos mundiais, a principal doença do cacaueteiro, ocorrendo em todos os países e regiões produtoras, causando perdas que se estimam entre 20 a 30% da produção (OLIVEIRA; LUZ, 2005; ERWIN; RIBEIRO, 1996), mas no estado da Bahia, da década de 80 até início dos anos da década de 90 foram registradas perdas de 70 a 80% da produção, em áreas foco da doença (BASTOS et al., 2016; OLIVEIRA; LUZ, 2012).

Os primeiros registros de ocorrência da doença em território nacional se deram em 1909, por meio dos relatos de Zehntner (1914) e Torrend (1917). A doença é causada por sete espécies de *Phytophthora* no mundo, sendo registrada, até o momento, quatro dessas espécies no Brasil e na Bahia (*P. citrophthora*, *P. capsici*, *P. heveae* e *P. palmivora*). Entre estas, a espécie *P. palmivora* tem predominado nos cacauais da região Sul da Bahia, nos últimos anos, sendo considerada como a espécie de maior importância (LUZ et al., 2019).

Os fungicidas cúpricos, principalmente, têm sido bastante utilizados em todo o mundo como a alternativa de controle que permite ação mais imediata e eficaz contra a disseminação da doença nas plantações (OLIVEIRA; LUZ, 2012; COULIBALY et al., 2018). No entanto, pensando na segurança ambiental e na diminuição dos custos de produção, a seleção genética de genótipos de cacaueteiro é a solução mais viável e econômica para o controle da Podridão Parda do cacaueteiro (SANTOS et al., 2009; BARRETO, 2014) dentro do pacote de manejo integrado. O alcance desta meta vem motivando os programas de melhoramento genético do cacaueteiro desde a década dos anos 50, do século XX.

A ocorrência de várias espécies de *Phytophthora* nos cacauais da Bahia é um entrave para a seleção de materiais resistentes à Podridão Parda do cacaueteiro no Brasil (LUZ et al., 1996). Além disso, Lessa (2017) comprovou a ampla diversidade na agressividade de isolados dentro da espécie *P. palmivora* aos genótipos SCA6 e SIC23, o que representa uma dificuldade a mais para a realização da seleção.

Além das observações de campo, o método mais usado nos primórdios dos programas de melhoramento genético, diferentes tipos de testes artificiais de inoculação têm sido adotados, com várias partes da planta, para avaliar a resistência a *Phytophthora* spp., podendo-se empregar mais de um desses testes para essa finalidade (NYASSÉ et al., 2002; BAHIA et al., 2015). Várias pesquisas já foram

realizadas para desenvolver e aperfeiçoar os métodos de avaliação de resistência, com inoculações em frutos ou em discos de folhas (SANTOS et al., 2011; BARRETO et al., 2015; NYASSÉ et al., 1995; LUZ et al., 1996). No entanto, existem poucos trabalhos buscando correlacionar os dados de infecção natural à campo com aqueles obtidos nos testes de inoculação artificial (TAHI et al., 2007), o que é sempre questionado, principalmente, pelos melhoristas do cacauero.

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) dispõe de clones provenientes de seleções realizadas no Brasil e em outros países produtores de cacau das Américas (PIRES, 2003), sendo importante fonte para pesquisar materiais genéticos resistentes a doenças e pragas, assim como para outros caracteres de interesse econômico. Avaliações foram feitas no BAG quanto à incidência natural de Podridão Parda (PIRES; LUZ; LOPES, 1997) e Vassoura de Bruxa (PIRES, 2003).

Visando esclarecer as dúvidas sobre a eficiência da seleção por métodos artificiais, objetivou-se, com este estudo, comparar as reações de 78 clones de cacauero quanto à resistência a *Phytophthora palmivora*, através de inoculações utilizando mistura de suspensões de zoósporos de sete isolados, em discos de folhas e frutos destacados, e analisar a correlação destes testes com os dados de infecção natural nesses clones em campo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cacau (Theobroma cacao L.)

Segundo Bartley (2005), o cacau ocorre espontaneamente do Sul do México até a Bolívia e às margens da Floresta Amazônica, onde predominam temperatura e umidade elevadas, típicas de regiões tropicais. É um dos cultivos perenes mais importantes no mundo, sendo seu fruto, o cacau, utilizado quase que exclusivamente para a fabricação de chocolate. A maioria das variedades de cacau pertence aos grupos Criollo, Forasteiro e Trinitário, que se diferenciam em função de fatores morfológicos, genéticos e origem geográfica (ALMEIDA; VALLE, 2007).

É uma planta umbrófila de porte arbóreo, perene, atingindo em torno de 5 metros de altura em condição de cultivo, podendo chegar, porém, a 20 metros em condição silvestre. É classificado como uma planta cauliflora, pois as almofadas florais são formadas ao longo do tronco e das ramificações secundárias e terciárias mais desenvolvidas (MONTEIRO; AHNERT, 2012).

A capacidade produtiva em plantas de valor comercial está relacionada não apenas aos fatores endógenos, que podem influenciar no processo da floração, mas também ao potencial genético e ao caráter de compatibilidade sexual das plantas. Vários fatores influenciam a produção do cacau, tais como: fatores ambientais (solo e clima), genéticos (precocidade, produtividade e qualidade), agrônômicos, incidência de doenças e pragas e o manejo do cultivo (GODOY et al., 2009; MÜLLER; VALLE, 2012).

Os frutos da espécie *Theobroma cacao* são drupas pentaloculares apresentando entre 10 e 32 cm de comprimento, contendo entre 20 e 60 sementes por fruto. Para o bom crescimento dos frutos, a espécie possui uma ecologia vegetal exigente que necessita de alta umidade tanto do ar quanto do solo, temperaturas médias anuais entre 25°C e 27°C, não suportando temperaturas inferiores a 15°C (BARRETO, 2014; ROCHA, 2008).

Essa espécie é cultivada em vários estados brasileiros como Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Amazonas, Rondônia, São Paulo e Bahia, sendo este último o maior produtor nacional. A região Sul da Bahia, compreendendo 70 municípios, teve a cacauicultura como principal atividade agrícola e econômica durante décadas (OKABE et al., 2004), permanecendo, ainda hoje, apesar das crises pelas quais tem passado (GUEDES, 2017).

O cacau trouxe muita prosperidade, riqueza e desenvolvimento para a população da região Sul da Bahia, onde o cultivo adaptou-se perfeitamente às condições climáticas e à vegetação típica da região. Crescendo sobre os remanescentes da Mata Atlântica, ajudando a preservar a biodiversidade e o sistema agroflorestal, com o plantio do cacau sob a mata raleada (sistema conhecido como cabruca), que contribuiu não apenas para o enriquecimento de muitos cacauicultores como também para a preservação de corredores ecológicos (SANCHES, 2011).

A produção de cacau na Bahia surgiu por volta do século XVIII como alternativa para a economia canavieira que se encontrava em crise, mas somente em 1890 o Estado passou a ocupar lugar de destaque no mercado mundial do cacau, através das exportações (SERRA; MARINHO, 2010). Com o estabelecimento e o desenvolvimento da atividade cacauífera na região Sul do estado, a partir do final do século XIX e início do século XX, milhares de pessoas chegavam, anualmente, de várias partes do país, atraídas pela fama de riqueza atribuída à “árvore dos frutos de ouro” e, muitas delas, em busca de oportunidade de emprego nas lavouras de cacau (ROCHA, 2008).

Na década de 80, a cacauicultura era a base da economia da região, quando a produção atingiu aproximadamente 400.000 toneladas de amêndoas de cacau, registradas em 1986 (OLIVEIRA; LUZ, 2012; ANDEBRHAN et al., 1999). A esta época, a área cultivada era superior a 700 mil hectares (SANTOS et al, 2015; SOUZA; DIAS, 2001).

Atualmente, estima-se que existem cerca de 500.000 hectares plantados com cacauzeiros (SODRÉ et al., 2012), que são a principal fonte de renda para muitos agricultores, especialmente aqueles de agricultura familiar que se dedicam à produção de cacau orgânico (GUEDES, 2017).

O Sul da Bahia teve suas lavouras de cacau drasticamente diminuídas dos anos de 1990 até os dias atuais, em função de uma série de fatores que envolveram condições climáticas desfavoráveis, baixos preços do produto no mercado internacional, aumento da oferta do produto pelos países africanos e à chegada da Vassoura de Bruxa aos cacauais do estado (LUZ, et al., 2013), cuja descoberta na região acarretou um desastre de consequências econômicas e sociais para a região cacauzeira (LUZ et al., 1997). Não menos importante que a VB, a Podridão Parda dos frutos do cacauzeiro também provocou danos significativos na produção de cacau, sendo essas duas doenças consideradas como os principais entraves para a cacauicultura na região (OLIVEIRA; LUZ, 2012).

2.2 Doenças do Cacauzeiro

As doenças do cacauzeiro são causadas por oomicetos, fungos, vírus e nematoides. Três delas, causadas por um oomiceto e por dois fungos, são responsáveis por perdas de até 40% da produção anual, em termos mundiais: a Podridão Parda, causada por *Phytophthora* spp.; a Vassoura de Bruxa, causada por *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, 2005; e a Monilíase, causada por *Moniliophthora roreri* (Cif.) HC Evans et al., 1987 (EVANS, 2007; OLIVEIRA; LUZ, 2005; BARRETO, 2014).

Além dessas três doenças, que, por sua importância e pelos danos causados à produção do cacau, têm repercussão mundial, no Brasil já foram registradas outras doenças de menor impacto, mas que nem por isso deixam de ser importantes para o cacauzeiro, como a Murcha de *Ceratocystis* ou Mal do Facão, causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. & T.C. Harr.; a Murcha de *Verticillium*, causada por *Verticillium dahliae* Kleb. E o mal-rosado, causada por *Erythricium salmonicolor* (Berk. e Br.) (OLIVEIRA; LUZ, 2005, 2012). Vários outros tipos de podridão em frutos são assinaladas na região cacauzeira da Bahia, causadas por diversos outros fungos, mas não apresentam grandes riscos à cultura, nas condições atuais.

Atualmente, a Vassoura de Bruxa é a doença responsável por maiores danos à cacauicultura baiana, pois desde a sua introdução (PEREIRA, 1988) disseminou-se rapidamente na região, acarretando perdas de até 75% da produção nacional, levando o Brasil a importar cacau de outros países produtores.

A Podridão Parda foi, durante muitos anos, a principal doença na Bahia, causando perdas anuais estimadas em 30% da produção (MEDEIROS, 1977). Com o surgimento da VB em 1989, a Podridão Parda foi tratada como uma doença menos importante, em consequência das condições ambientais desfavoráveis e dos graves problemas econômicos acarretados pela agressividade da VB (OLIVEIRA; LUZ, 2005), no entanto, continuou causando perdas nos cacauais, embora em dimensões bem menores. Danos sempre crescentes têm sido verificados na região, causados por *Phytophthora* spp., segundo os dados do Centro de Pesquisas do Cacau, registrados anualmente para a previsão de safra, principalmente nos anos em que as chuvas são mais regulares (LUZ et al., 2013). A fase de permanência da doença nas raízes do cacaueteiro (LUZ; MITCHELL, 1990a, 1990b) é fundamental para atravessar os períodos de estiagem, assim como os casqueiros que, deixados amontoados nas lavouras, são uma das principais fontes de inóculo da doença (LUZ; SILVA, 2001). A ocorrência de diversas espécies causando a Podridão Parda e o cancro do cacaueteiro é também um fato muito importante, pois os desequilíbrios na população da espécie dominante podem acarretar maiores perdas para a cultura (LUZ et al, 2018).

É preocupante para a região a Monilíase, causada por *Moniliophthora roreri* (BAILEY et al., 2018), praga quarentenária A1, que representa uma séria ameaça para a cultura do cacau no Brasil. Atualmente, a doença se encontra restrita aos países sul-americanos e da América Central. Já ocorre em quase todos os países produtores de cacau do continente Americano e tem se expandido no Peru, avizinhandose da fronteira brasileira na região Norte do País, onde ainda existem plantas de cacau nativas e há também cultivos, especialmente no estado de Rondônia (OLIVEIRA; LUZ, 2012; PHILLIPS-MORA et al., 2015).

2.2.1 Podridão Parda

A Podridão Parda ou Podridão de *Phytophthora* é uma doença causada por espécies do gênero *Phytophthora* spp., cuja ocorrência é verificada em praticamente

todos os países produtores de cacau do mundo, ocorrendo nas Américas, na África, na Ásia e na Oceania (LUZ, 1989; HELLIWELL et al., 2016). Sendo a doença conhecida no Brasil desde 1905, ela ocorre em todos os estados produtores de cacau do país (BASTOS et al., 2016).

Sua ocorrência no estado da Bahia é conhecida desde 1927, sendo sua primeira epidemia, no cacauzeiro, registrada em Trinidad, no ano de 1727 (OLIVEIRA; LUZ, 2005; RORER, 1910; BARRETO et al., 2015). No entanto, as investigações científicas sobre a doença só tiveram início em 1898, quando Butler, através de seus estudos, demonstrou, pela primeira vez, que *Phytophthora* spp. era o agente causal da podridão de frutos do cacauzeiro e, posteriormente, do cancro da requeima dos ramos, e da murcha de chupões (LUZ; SILVA, 2001).

Phytophthora faberi Maub. (Maublanc, 1909) foi descrita, inicialmente como sendo o agente causal da Podridão Parda no cacauzeiro. Anos mais tarde, em 1979, o agente causal foi reclassificado como *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler, sendo esta espécie, então, considerada como o único causador da Podridão Parda na cultura do cacau (LUZ; SILVA, 2001).

Atualmente, sabe-se que sete espécies do patógeno estão relacionadas com a etiologia da doença na cultura nos países produtores de cacau: *P. capsici* Leonian, *P. citrophthora* RE Smith e E.H. Smith, *P. heveae* Thompson, *P. katsurae* Ko e Chang, *P. megakarya* Brasier e Griffin, *P. megasperma* Dreschler e *P. palmivora* (Butler) Butler (BARRETO, 2014; LUZ; SILVA, 2001; LUZ et al., 2003). As espécies *P. palmivora* e *P. capsici* têm distribuição pantropical, o que as torna os principais patógenos do cacauzeiro. É estimado que a perda anual causada por estas espécies esteja entre 15 e 30% da produção mundial (OLIVEIRA; LUZ, 2005; NYASSÉ et al., 1995).

Segundo Luz & Matsuoka (2001), *P. palmivora* (sinônimo *P. faberi*) foi a segunda espécie do gênero *Phytophthora* a ser registrada no nosso país, causando danos ao cacauzeiro em 1909. A primeira teria sido *P. infestans*, na cultura da batata, em 1898. Como pode-se observar, já naquela época das visitas dos primeiros naturalistas à região, *Phytophthora* era notado nos cacauais da Bahia.

Entre as sete espécies do patógeno que atacam o cacauzeiro, até o momento quatro foram constatadas no Brasil causando a Podridão Parda: *P. heveae*, *P. palmivora*, *Phytophthora citrophthora* e *P. capsici*, formando o complexo Podridão Parda. Dessas quatro espécies, *P. citrophthora* é a mais virulenta seguida por *P.*

palmivora e *P. capsici* (OLIVEIRA; LUZ, 2005; LAWRENCE; LUZ; RESNIK, 1982; LUZ; SILVA, 2001). *Phytophthora palmivora* é a espécie mais distribuída no mundo. No Brasil, sua ocorrência aumentou significativamente nos últimos anos, apresentando-se como predominante nos cacauais da região Sul da Bahia, ultimamente, sendo considerada como a espécie de maior importância (LUZ et al, 2019).

Não apenas os frutos do cacauero como também outras partes da planta (almofadas florais, folhas, ramos, chupões, raízes, caule e plântulas) são infectadas por *Phytophthora*, sendo o maior prejuízo causado quando ocorre infecção nos frutos (produto comercial). As infecções nas almofadas florais ocorrem depois que o oomiceto coloniza completamente o fruto, formando um cancro na almofada floral, onde permanece e infecta os frutos que serão formados nessas almofadas, se repetindo na próxima safra e nas posteriores (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Nos frutos, a infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento e a colonização interna da casca e das sementes é relativamente lenta. Sendo assim, há um maior aproveitamento das sementes nos frutos em que a infecção ocorre tardiamente, próximo à colheita (OKAISADOR, 1974; BARRETO, 2014). Os sintomas podem ser vistos 30 horas após a infecção (LAWRENCE; LUZ, 1983) com o surgimento de pequenas manchas cloróticas, circulares e, após poucos dias de infecção, essas manchas se tornam castanho-escuro e se alongam rapidamente formando lesões coalescentes de coloração marrom cor de chocolate, podendo atingir totalmente a superfície do fruto de 10 a 14 dias, a depender do genótipo de cacauero, da espécie de *Phytophthora* envolvida e do local de incidência (OLIVEIRA; LUZ, 2005; LUZ; SILVA, 2001; CAMPELO; LUZ, 1981). Os frutos se tornam pretos e mumificados apresentando cheiro característico de peixe e, quando em estágio avançado de infecção, *Phytophthora* spp. invadem o tecido interno dos frutos causando descoloração e deformação das amêndoas que ficam inviáveis para a indústria do chocolate e de cosméticos (LUZ; SILVA, 2001; BOWERS et al., 2001). Em condições favoráveis, de três a cinco dias após o aparecimento dos primeiros sintomas, surge, a partir do centro das lesões, uma cobertura rala, pulverulenta e esbranquiçada, formada pelo micélio e por esporângios de *Phytophthora* spp. (LUZ; SILVA, 2001; OLIVERA; LUZ, 2005).

Segundo Oliveira & Luz (2005), quando as folhas são infectadas, os primeiros sintomas aparecem 24 h após a infecção, na forma de pontos escuros que crescem

em condições de umidade, atingindo as nervuras que se tornam escuras e necróticas, sendo mais suscetíveis as folhas jovens, suculentas e os ramos novos. A infecção por *Phytophthora* spp. nos ramos e chupões da planta causa uma lesão escura e tombamento dos mesmos. Quando ocorre no tronco do cacauero é denominada cancro, cujos sintomas são manchas circulares, com margens difusas e coloração roxa a preta e, em estágio avançado de infecção, pode ser observado um fluido avermelhado exsudando de rachaduras sobre a casca (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

A progressão da incidência da Podridão Parda na cacauicultura pode ser dividida em horizontal, que ocorre no início da disseminação da doença nos cacauais, sendo observados poucos frutos infectados próximos ao solo; e vertical, que ocorre dias depois da disseminação horizontal com a proliferação da doença na própria planta e aumento progressivo por toda a área de cultivo (MEDEIROS; MELO; SANTANA, 1969; WARD; GRIFFIN, 1981). O solo tem sido considerado como o principal reservatório de inóculo e a propagação do oomiceto nos cacauais ocorre pelos tratos culturais da lavoura e, principalmente, por meio de casqueiros contaminados nas áreas de coleta e quebra dos frutos, pois representam fonte potencial de inóculo e, conseqüentemente, riscos de surtos epidêmicos de Podridão Parda, através das cascas de frutos infectados pelo patógeno. A chuva é um fator que influencia tanto na dispersão do inóculo de *Phytophthora* como também na infecção do hospedeiro. Baixa temperatura e alta umidade são condições ideais tanto para a germinação e liberação dos zoósporos (esporos assexuais) como na sua disseminação pela área de cultivo de cacau (LUZ; MATSUOKA, 2001; SANTOS et al., 2015), pois são os fatores climáticos que contribuem com o progresso e a severidade da doença (OLIVEIRA; LUZ, 2005; WARD; GRIFFIN, 1981).

O método de controle da Podridão Parda ainda mais utilizado é a aplicação de fungicidas, principalmente óxido cuproso, hidróxido de cobre e oxiclreto de cobre, porém outras medidas podem ser adotadas (SANTOS et al., 2009). De acordo com Hanada (2006), o controle biológico é uma importante alternativa no manejo da doença, em particular com a utilização de fungos endofíticos, aqueles que vivem no interior da planta. No entanto, devido à existência de poucas pesquisas acerca do assunto, voltadas para o controle biológico de *Phytophthora* em cacauero, esse método requer mais estudos para que se consiga indicar agentes eficientes no controle da Podridão Parda.

A forma de controle mais indicada é a seleção genética de indivíduos resistentes, mostrando-se como uma alternativa técnica e economicamente viável para os produtores no controle da doença (NYASSÉ et al., 2002; BAHIA et al., 2015; Barreto et al., 2015). Porém, há diversos entraves que dificultam a seleção de genótipos resistentes, entre eles estão: a natureza perene do cacaueteiro, o longo período de tempo necessário para a avaliação da resistência dos genótipos em frutos e a complexidade da Podridão Parda (OLIVEIRA; LUZ, 2012), devido à existência de várias espécies de *Phytophthora* que provocam a doença.

2.3 O gênero *Phytophthora* e a espécie *P. palmivora* (E. J. Butler) E. J. Butler

Phytophthora é um gênero fitopatogênico pertencente ao Reino Straminipila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales e Família Peronosporaceae (BEAKES; HONDA, THINES, 2014). Houve uma alteração na classificação taxonômica do patógeno causador da Podridão Parda dos frutos do cacaueteiro, assim como dos oomicotas em geral, deixando de ser classificados como fungos (Reino Fungi) e passando para os Reinos Protista, Cromista e, posteriormente, Straminipila (LUZ; MATSUOKA, 2001). Esse gênero infecta várias espécies de importância econômica, entre as quais pode-se citar, por exemplo, o abacaxi (*Ananas comosus* L. (Merrill)), pimentão (*Capsicum annuum* L.), citros (*Citrus* spp.), pupunha (*Bactris gasipaes* (Kunth)), mamão (*Carica papaya* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e coco (*Cocos nucifera* L.) (LUZ et al., 2001; SANTOS, 2010; ERWIN; RIBEIRO, 1996; SANTOS et al., 2014).

Os representantes desse gênero possuem características que os diferenciam dos organismos pertencentes ao Reino Fungi, chamados de fungos verdadeiros, sendo as principais diferenças: a composição da parede celular, formada por celulose e β -glucanas, a presença de centríolos na célula, micélio diploide na maior parte do ciclo de vida, produção de esporos biflagelados com mastigonemas (pêlos) em um dos flagelos, diferenças na sequência de DNA (SCHUMANN; D'ARCY, 2006; ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; LESSA, 2017).

As espécies de *Phytophthora* se caracterizam por apresentar micélio cenocítico, típico dos oomicetos, e diferentes propágulos como esporângios (corpos de frutificação), clamidósporos e zoósporos (esporos assexuais) e oósporos

(esporos sexuais), sendo classificadas, quanto à sexualidade, em homotáticas ou heterotáticas. Essas estruturas são essenciais na identificação de espécies do gênero. Os diferentes propágulos têm funções específicas no ciclo de vida destes patógenos, bem como na epidemiologia das doenças por eles causadas (LUZ; SILVA, 2001).

Os oósporos, quando ocorrem, e, principalmente, os clamidósporos, são os esporos responsáveis pela sobrevivência do patógeno, atuando como fonte de inóculo primário de infecção, podendo ser encontrados no solo ou em restos culturais (LUTZ; MENGE, 1991; SOUZA, 2018). De acordo com Graham e Timmer (1992), os esporângios e zoósporos (dotados de flagelos que conferem mobilidade) são os principais responsáveis por infectar a planta e pelo rápido desenvolvimento da Podridão Parda. Os zoósporos são capazes de germinar em água livre e causar a infecção no hospedeiro quando são atraídos por exsudados das raízes e radículas da planta, enquanto que os esporângios resultam também da germinação dos oósporos e clamidósporos.

O ciclo biológico de *Phytophthora* spp. compreende duas fases: uma fase somática (assexual) e uma fase sexual. Durante a fase somática, os esporângios ou esporocistos são formados a partir de um talo micelial e, em condições favoráveis, podem germinar, ou ocorrer a formação de clamidósporos. Na fase sexuada, o cruzamento entre dois talos miceliais induz a formação de órgãos sexuais masculinos (anterídios) e femininos (oogônios); estes formarão o zigoto dando origem ao oósporo que, quando germinado, dará origem a um novo talo micelial ou formará um esporângio (BLAHA, 1995). Várias condições ambientais podem influenciar na esporulação de *Phytophthora* spp., tais como: temperatura, luz, umidade, pH, aeração, nutrientes e interação com outros organismos (LAWRENCE; LUZ, RESNIK, 1982). As espécies desse gênero se caracterizam, também, por serem fitopatógenos polípagos e cosmopolitas, não sendo comum espécies hospedeiro-específicas (MEDEIROS, 1977; LUZ; MATSUOKA, 2001).

Phytophthora palmivora é originária provavelmente da América do Sul ou América Central e foi disseminada em plantas infectadas, pelo homem, para o resto do mundo (ZENTMYER, 1988). Esta espécie encontra-se amplamente distribuída, ocorrendo tanto em áreas tropicais como subtropicais do mundo, causando infecção em mais de 166 espécies vegetais (LUZ, 2006), sendo a segunda espécie de *Phytophthora* com maior número de hospedeiros já assinalados no Brasil,

apresentando patogenicidade a diversas culturas de importância econômica para o país, a exemplo do coqueiro, a seringueira, o mamoeiro, a pimenteira-do-reino, cacaueteiro, entre outras frutíferas e olerícolas, bem como a várias espécies de plantas ornamentais (SANTOS et al., 2013).

Foram catalogadas até o momento, cerca de 24 espécies de *Phytophthora* no Brasil, mas ainda é incerto o número de espécies válidas (MAIA et al., 2010; 2015).

A diversidade nas populações de *Phytophthora* spp. tem sido alvo de investigações, principalmente após a descoberta das ferramentas moleculares. Recentemente, Cerqueira (2014) estudou o comportamento de mais de 300 isolados de *P. capsici* oriundos de seringueira quanto a variações fisiológicas e moleculares, enquanto Lessa (2017) estudou a variabilidade na agressividade de 100 isolados de *P. palmivora* obtidos de cacaueteiro, demonstrando que há isolados mais e menos agressivos, o que tem implicações na seleção para resistência à doença.

2.4 Resistência de plantas a doença

O uso da resistência genética para controlar doenças em plantas representa um dos mais relevantes avanços tecnológicos da agricultura moderna. Na natureza, as plantas estão expostas ao ataque de microrganismos patogênicos, porém, a resistência genética mostra-se como regra, enquanto a suscetibilidade representa a exceção (MICHEREFF, 2014; PASCHOLATI; LEITE, 1994). A diferença entre resistência e suscetibilidade se dá pela capacidade que a planta possui de reconhecer o patógeno invasor e, assim, ativar seus mecanismos de defesa de maneira rápida e eficiente. Os diferentes tipos de mecanismos de defesa de uma planta (estruturais e bioquímicos) são controlados por genes e dependem da expressão dos mesmos após o contato patógeno-hospedeiro (ARAÚJO; MENEZES, 2009; PASCHOLATI; LEITE, 1995; SOUZA, 2018).

Em acordo com Barreto (2014) e Santos et al. (2007), para se identificar novas fontes de resistência e genes de interesse agrônômico é necessária a seleção e cruzamento entre genótipos contrastantes para o caráter resistência e para outras características agrônômicas. Portanto, o melhoramento genético do cacaueteiro tem recebido atenção especial da comunidade científica e cacauicultora de vários países do mundo, buscando selecionar genótipos que apresentem baixa susceptibilidade às

doenças como a Podridão Parda e a Vassoura de Bruxa de forma prioritária (LOPES et al., 2011; BARRETO et al., 2015).

Luz et al. (1996) testaram 88 genótipos através de inoculação em frutos não destacados, a campo, e somente os cultivares PA 30 e PA 150 apresentaram simultânea resistência à *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*.

Testes de avaliação de resistência de cacauzeiros à Podridão Parda têm sido realizados na região Sul da Bahia desde os anos da década de 1980. Entretanto, em função da variabilidade na agressividade das diferentes espécies de *Phytophthora* spp., nas diversas áreas de cultivo do cacauzeiro, e da frequência com que essas espécies ocorrem (OLIVEIRA; LUZ, 2005), o desafio para os programas de melhoramento genético continua. Com o desenvolvimento de novos genótipos com tolerância e/ou resistência à Vassoura de Bruxa, os esforços têm se multiplicado para verificar se esses materiais genéticos também são resistentes a Podridão Parda, especialmente à espécie *P. palmivora*.

2.4.1. Métodos de avaliação de resistência do cacauzeiro a *Phytophthora palmivora*

Em busca de materiais resistentes que contribuam com os programas de melhoramento, têm-se adotado diferentes metodologias para caracterizar a reação de genótipos de cacauzeiros a *Phytophthora* spp., como testes de inoculação em discos de folhas (NYASSÉ et al., 1995) e em frutos destacados e frutos não destacados (IWARO et al., 2000; IWARO; SREENIVASSAN; UMAHARAN, 1997; SANTOS, 2009; LAWRENCE, 1978).

Os primeiros testes de inoculação utilizando discos de folhas foram realizados por Nyassé et al. (1995). Esse teste permite uma avaliação rápida do nível de resistência, mas a repetibilidade e a aplicabilidade desse método são discutidas por alguns autores (SANTOS, 2009).

A utilização de folhas do cacauzeiro para avaliação precoce de resistência se justifica pelo fato de que folhas jovens podem ser atacadas naturalmente por *Phytophthora*, especialmente por *P. palmivora*, e que a estrutura histológica da face abaxial da folha é similar à camada superficial de frutos e às folhas no estágio intermediário de maturação (VAN DER VOSSSEN, 1997; NYASSÉ, 1995; BARRETO, 2014; THÉVENIN et al., 2004). A idade da folha apresenta influência na expressão

da sensibilidade à doença, sendo os resultados mais evidentes quando o inóculo é aplicado na face abaxial (NYASSÉ et al., 1999).

A resistência do cacauzeiro a *Phytophthora* spp. já foi testada por alguns autores em frutos não destacados, em sementes pré-germinadas e em caules de plantas jovens (BAHIA, 2007; LAWRENCE & LUZ, 1985; LUZ et al., 1995). O método de frutos destacados tem sido estudado por alguns autores (LAWRENCE, 1978; TAHI et al., 2006, 2007; IWARO; SREENIVASSAN; UMAHARAN, 1997; SANTOS, 2009). Para alguns pesquisadores, a avaliação da infecção em frutos de cacauzeiro não destacados, à campo, é o método mais adequado, porém difícil de ser realizado, pois as plantas seminais começam a produzir somente a partir do 4º ou 5º ano após o plantio e ainda há o risco de contaminação em outros frutos no campo, apesar das precauções tomadas (LUZ et al., 1996; LAWRENCE, 1978).

O índice de severidade da doença em discos foliares e a área da lesão em frutos têm sido usados de forma eficiente em alguns estudos para avaliar a resistência em diversas culturas (SANTOS et al., 2011; CERQUEIRA-SILVA et al., 2008) e, mais recentemente, para doenças do cacauzeiro (SANTOS, 2009; BAHIA, 2007; SANTOS et al., 2011).

Deste modo, o trabalho aqui apresentado representa mais uma contribuição para o estudo da resistência à Podridão Parda em cacauzeiro, especialmente em relação a *Phytophthora palmivora*, atualmente o principal agente causal da doença nos cacauais baianos, por tentar esclarecer a relação existente nas respostas da planta à infecção causada naturalmente e aquelas obtidas através de inoculações artificiais, além de testar a resistência em clones de importância para o Programa de Melhoramento Genético do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Genético Vegetal

Foram estudados 78 clones de cacauzeiro (Tabela 1), incluindo duas testemunhas: SCA 6 - considerado padrão de resistência a *Phytophthora* spp. e SIC 23 - considerado padrão de susceptibilidade (LUZ et al., 1996).

Esses clones se encontram implantados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG), na Estação Experimental Arnaldo Medeiros (ESARM) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), no município de Ilhéus, na região Sul do estado da Bahia. Constituem importante base de estudos do Programa de Melhoramento Genético do Cacauzeiro, sendo representativos de parte da diversidade genética da espécie existente no BAG do CEPEC (PIRES, 2003).

3.2 Preparo do inóculo

Foram utilizados sete isolados de *Phytophthora palmivora* obtidos de frutos de cacau coletados em diversos municípios da região cacaueira do estado da Bahia, em diferentes épocas de coleta (Tabela 2), provenientes da Coleção de *Phytophthora* Arnaldo Medeiros do CEPEC/CEPLAC/Ilhéus-BA.

Esses isolados encontravam-se conservados em água destilada esterilizada, pelo Método Castellani. Foram ativados (Figura 1) sendo transferidos, em discos de meio de cultura cenoura-ágar (CA) de 55 mm contendo micélio e estruturas do patógeno, para placas de Petri contendo CA que foram mantidas incubadas à temperatura de 25°C sob iluminação constante por sete dias (LUZ; SILVA, 2001).

Tabela 1 - Clones de cacaueteiro avaliados quanto à resistência a *Phytophthora palmivora*.

Clone	País de origem	Clone	País de origem
AMAZON2.1	Peru	MOQ417	Equador
AMAZON15.15	Peru	MOQ647	Equador
APA5	Colômbia	NA33	Peru
CAB4	Brasil	NA312	Peru
CAB5003.23	Brasil	OC77	Venezuela
CAB5046.1201	Brasil	PA15	Peru
CAB5046.1403	Brasil	PA30	Peru
CCN51	Equador	PA44	Peru
CEPEC38	Brasil	PA51	Peru
CEPEC40	Brasil	PA70	Peru
CEPEC42	Brasil	PA88	Peru
CEPEC44	Brasil	PA120	Peru
CEPEC75	Brasil	PA148	Peru
CEPEC82	Brasil	PA150	Peru
CEPEC84	Brasil	PA169	Peru
CEPEC85	Brasil	PA285	Peru
CEPEC89	Brasil	PA294	Peru
CEPEC92	Brasil	RB31	Brasil
CEPEC93	Brasil	RB32	Brasil
CEPEC526	Brasil	RB33	Brasil
CEPEC1008	Brasil	RB39	Brasil
CHUAO120	Venezuela	RIM44	México
CJ7	Brasil	RIM117	México
CJ10	Brasil	SCA6 ^{*(t)}	Peru
CSUL4	Brasil	SIAL164	Brasil
CSUL5	Brasil	SIAL505	Brasil
EET62	Equador	SIAL542	Brasil
EET272	Equador	SIC19	Brasil
EET390	Equador	SIC23 ^{*(t)}	Brasil
EET392	Equador	SIC842	Brasil
ICS78	Trinidade e Tobago	SIC864	Brasil
ICS95	Trinidade e Tobago	SIC891	Brasil
ICS100	Trinidade e Tobago	SPA5	Colômbia
IMC2	Peru	SPA12	Colômbia
IMC23	Peru	TSA516	Trinidade e Tobago
IMC51	Peru	TSA644	Trinidade e Tobago
MA12	Brasil	TSA654	Trinidade e Tobago
MOCORONGO1	Brasil	UF36	Costa Rica
MOCORONGO2	Brasil	UF667	Costa Rica

^{*(t)} = testemunha

Após esse período, foi feita a transferência dos isolados para placas contendo meio seletivo (MS) PARPH (KANMWISCHER; MITCHELL, 1978) que foram incubadas à temperatura de 25°C no escuro por cinco dias. Posteriormente, procedeu-se a repicagem das colônias do MS para placas com CA e incubadas nas mesmas condições anteriormente mencionadas.

Tabela 2 - Isolados de *Phytophthora palmivora* provenientes de diferentes regiões produtoras de cacau no Sul da Bahia - Brasil.

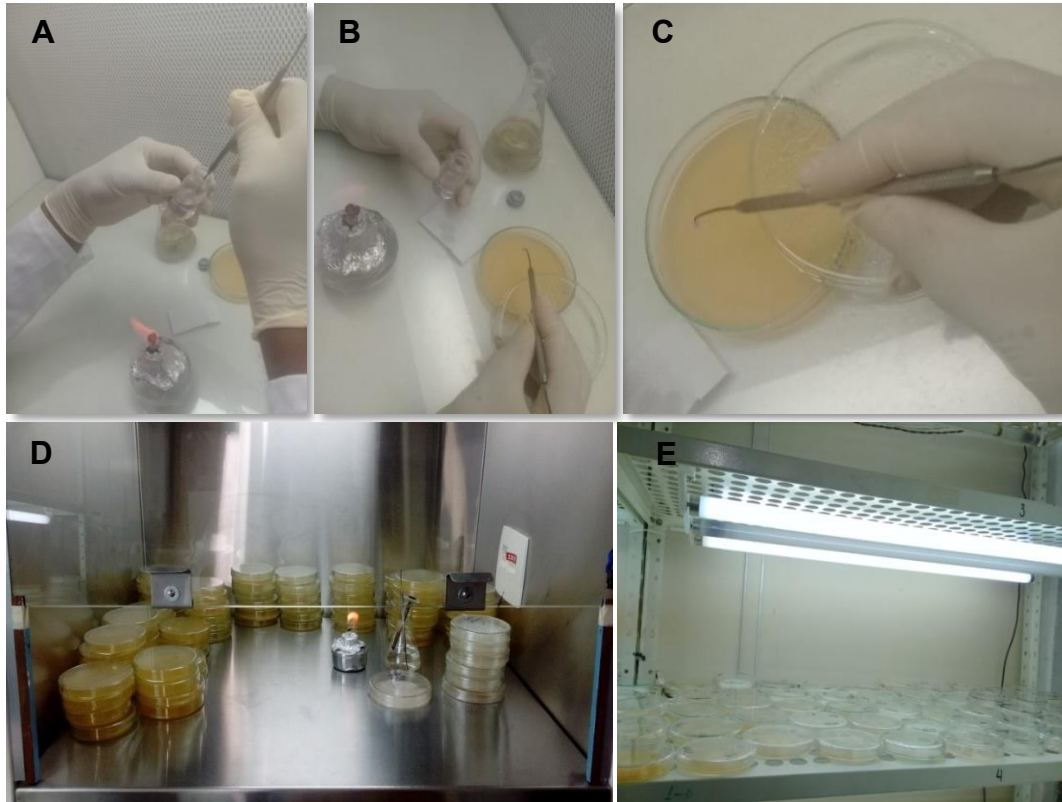
Nº de registro do isolado	Local de origem	Ano de coleta
1733	São Francisco do Conde	2010
1913	Belmonte	2010
1985	Ilhéus	2010
1735	Camacã	2012
1744	Uruçuca	2012
1845	Mutuípe	2012
1878	Una	2012

Para a produção do inóculo, foram usadas 10 placas de Petri para cada isolado, crescidas em CA. Em seguida, foram colocados 10 mL⁻¹ de água estéril gelada em cada placa, transferindo-as para geladeira a 4°C, onde permaneceram por 20 minutos (LUZ et al., 2008).

Após este período, as placas foram colocadas à temperatura ambiente por mais 25 minutos. Esse procedimento de choque térmico foi realizado para acelerar a liberação dos zoósporos. Posteriormente à obtenção da suspensão, foi retirada uma alíquota de aproximadamente 1 mL⁻¹ da mesma e adicionada uma gota de FAA (Formol; Álcool; Ácido Acético Glacial) para imobilizar os zoósporos liberados, permitindo, assim, a sua contagem.

As suspensões obtidas com as colônias de cada isolado foram ajustadas para 3,0x10⁵ zoósporos/mL⁻¹, com o auxílio da Câmara de Neubauer (Figura 2), e posteriormente misturadas em proporções iguais, obtendo-se a mistura de isolados na mesma concentração.

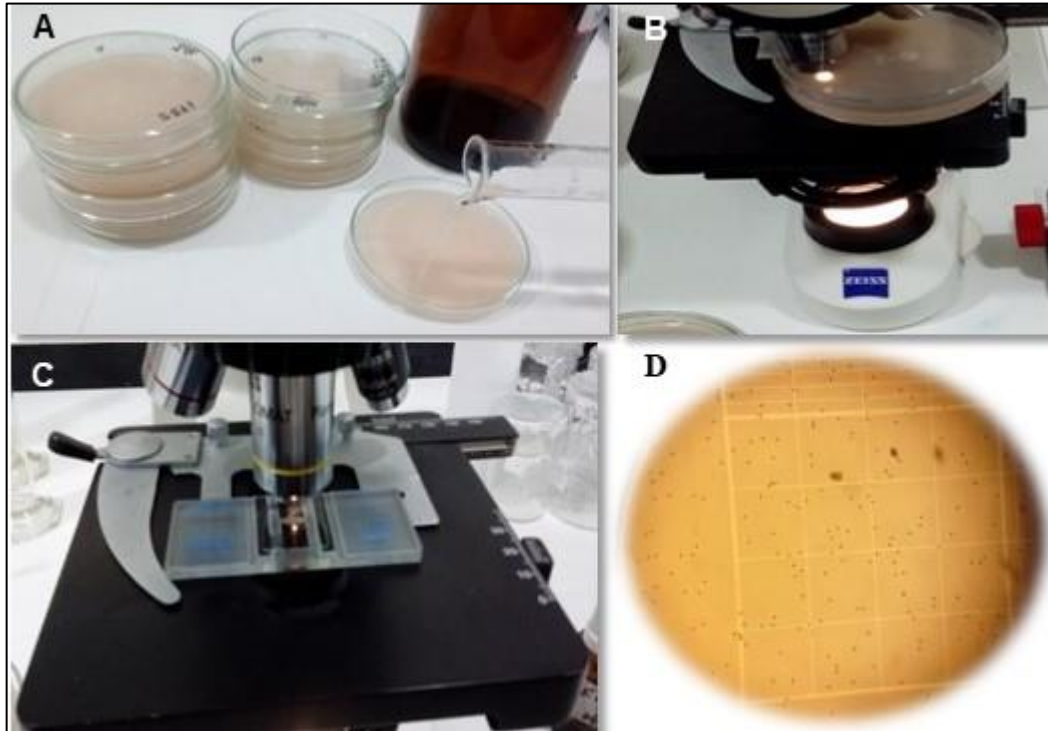
Figura 1 - Ativação e repicagem de isolados de *Phytophthora palmivora* em meio cenoura-ágar (CA) e meio seletivo (MS). Isolados de *P. palmivora* conservados pelo método Castellani (A); Transferência de discos de micélio contendo estruturas de *P. palmivora* do Castellani para placas de Petri contendo meio CA (B e C); Repicagem de placas (D); Placas repicadas mantidas sob iluminação constante por sete dias (E).



3.3 Inoculação em discos de folhas

Os experimentos foram realizados no Laboratório de *Phytophthora* (Phytolab) da Seção de Fitopatologia do CEPEC/CEPLAC, sob condições controladas, sendo utilizado o delineamento em blocos casualizados, com 8 blocos constituídos de caixas plásticas contendo 5 discos de cada clone. Foram realizados dois ensaios (E1 e E2) em períodos diferentes, nos meses de novembro de 2017 (E1) e junho de 2018 (E2), sendo avaliados, portanto, 40 discos de cada clone em cada um dos experimentos.

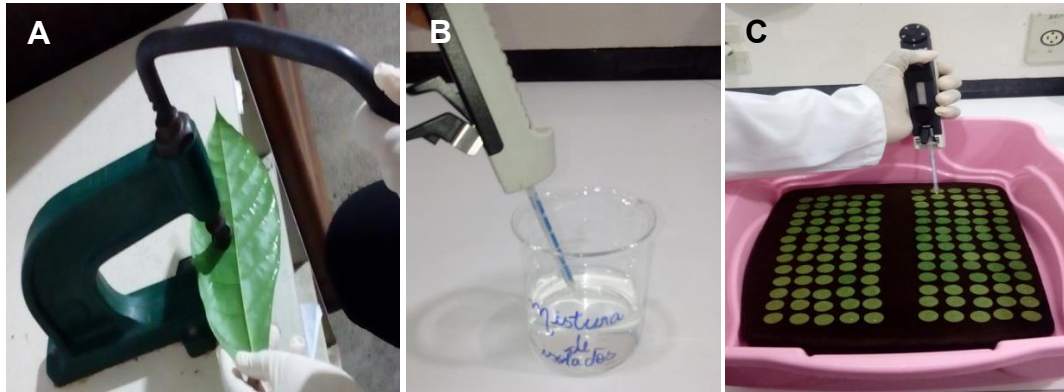
Figura 2 - Preparo do inóculo e ajuste da concentração da suspensão de zoósporos de *Phytophthora palmivora*. Adição de água gelada nas placas de Petri em meio cenoura-ágar contendo micélio e estruturas do patógeno (A); Observação, ao microscópio, da esporulação nas culturas (B); Contagem de zoósporos, ao microscópio, usando a câmara de Neubauer (C e D).



Para tal, foram coletadas em campo, para cada um dos experimentos, 40 folhas saudáveis de cada clone, em estágio intermediário de maturação, no início da manhã, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados por clone e conduzidas ao Phytholab, onde foram higienizadas. Com um cortador semiautomático, de cada folha foi retirado um disco de 1,5 cm de diâmetro do limbo foliar (Figura 3), desprezando as nervuras, obtendo-se um total de 40 discos de diferentes folhas para cada clone, em cada ensaio.

Os discos foram arrumados com a parte abaxial para cima, em caixas contendo espuma esterilizada umedecida com água estéril formando uma câmara úmida, para manter a umidade relativa próxima a 100% no interior das caixas e proporcionar condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Uma alíquota de 10 μL ($0,01 \text{ mL}^{-1}$) da suspensão de zoósporos na concentração 3×10^5 zoósporos/ mL^{-1} foi colocada no centro de cada disco de folha. As caixas foram devidamente fechadas e incubadas a 25°C , no escuro.

Figura 3 - Inoculação com mistura de isolados de *Phytophthora palmivora* em discos de folhas de clones de cacaueteiro. Corte dos discos com cortador semiautomático (A); pipeta semiautomática e mistura de suspensões de zoósporos de isolados do patógeno (B); Pipetagem e aplicação do inóculo nos discos (C).



A avaliação individual dos discos foliares, em cada ensaio, foi feita aos sete (7) dias após a inoculação. Os discos foram avaliados com base na escala de notas desenvolvida por Nyassé et al. (1995), onde as notas variam de 0 – 5, que correspondem a: 0 – sem sintoma; 1 – pequenos pontos cloróticos; 2 – pontos cloróticos conectando-se entre si; 3 – pontos necróticos coalescentes; 4 – lesão marrom em expansão; 5 – lesão necrótica grande (Figura 4).









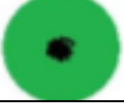

Com os valores da escala de notas atribuídos para cada disco de cada clone, foi calculado o índice de severidade da doença (ID) para cada clone, de acordo com o índice de McKinney (1923), através da expressão:

$$ID\% = \left(\frac{\Sigma (\text{grau da escala} \times \text{frequência})}{(\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})} \right) \times 100$$

onde ID% = índice de severidade da doença, variando de 0 a 100.

As médias de severidade da doença (ID) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O ID foi utilizado para discriminar os clones em quatro classes de reação à Podridão Parda: resistente (R), moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS) e suscetível (S).

Figura 4 - Escala ilustrativa de notas desenvolvida por Nyassé et al. (1995).

0	Sem sintomas;		0	
1	Pequenos pontos cloróticos;		1	
2	Pontos cloróticos conectando-se entre si;		2	
3	Pontos necróticos coalescentes;		3	
4	Lesão marrom em expansão;		4	
5	Lesão necrótica grande.		5	

3.4 Inoculação em frutos verdoengos destacados

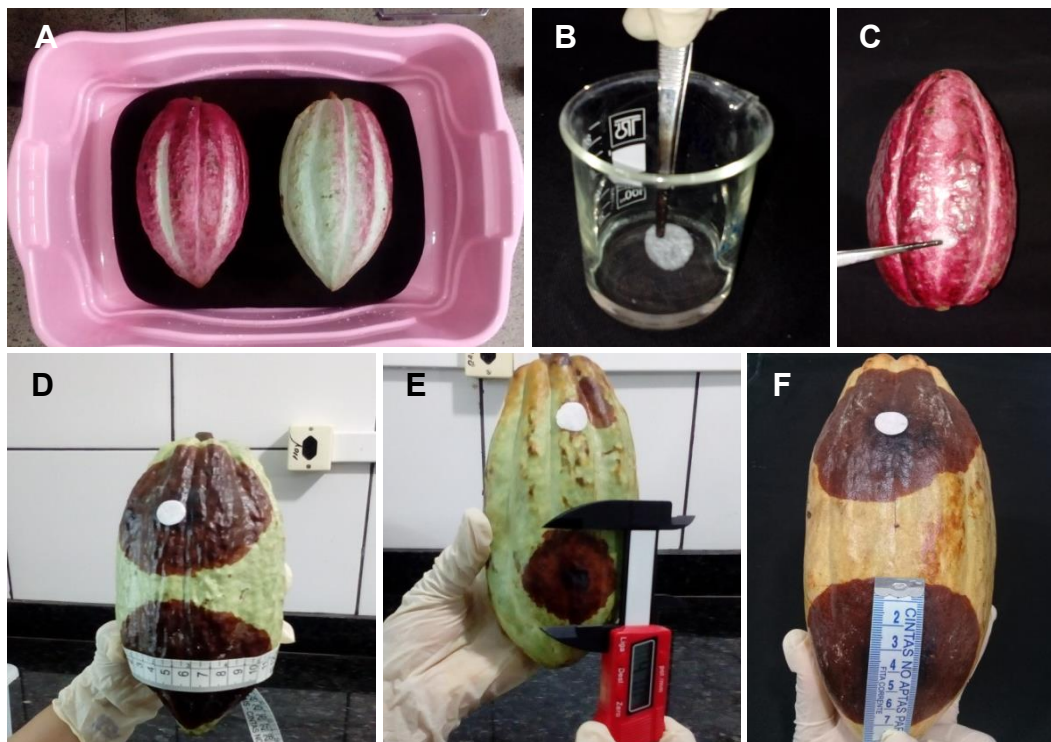
Para o teste com frutos, foram coletados frutos verdoengos destacados de 68 dos 78 clones de cacauero selecionados para estudo, não sendo possível avaliar por este método os clones CAB5046.1201, CEPEC85, CJ7, CJ10, ICS78, IMC23, PA88, RB32, RIM44 e TSA644, devido à indisponibilidade de frutos no período de realização dos testes (entre junho e julho de 2018).

Frutos apresentando entre quatro e cinco meses de idade foram coletados pela manhã e encaminhados ao Phytolab, onde foram primeiramente lavados em água corrente e depois enxugados com papel toalha esterilizado. Posteriormente, esses frutos foram acomodados sobre placas de Petri, em caixas plásticas (Figura 5), nas mesmas condições descritas para o experimento anterior.

As inoculações foram realizadas com número variável de frutos por clone, colocando-se, com uma pinça esterilizada, dois discos de papel filtro com 1,5 cm de diâmetro, previamente esterilizados em estufa a 120°C por 4 horas e que haviam sido imersos na mistura de suspensões de zoósporos na concentração de 3×10^5

zoósporos/mL⁻¹ (obtida conforme descrito no item anterior). Os discos de papel filtro foram colocados em pontos perpendicularmente opostos em cada lado do fruto sem ferimentos.

Figura 5 - Etapas da inoculação com mistura de isolados de *Phytophthora palmivora* em frutos verdeongos destacados de clones de cacaueteiro. Frutos em câmara úmida (A); Imersão dos discos de papel filtro na mistura de suspensões de zoósporos (B); Deposição dos discos em dois pontos da superfície do fruto (C); Avaliação da área da elipse das lesões nos dois pontos inoculados (D, E e F).



A avaliação das lesões formadas nos frutos inoculados dos clones testados foi feita aos nove dias após a inoculação, sendo mensurados, com fita métrica ou paquímetro, o comprimento e a largura de cada uma das lesões em cada fruto. Estas medidas foram utilizadas para calcular a área da elipse para cada lesão formada, sendo esta igual a: $A(\text{cm}^2) = \pi(L/2)(E/2)$, em que L = comprimento longitudinal da lesão; e E = comprimento equatorial da lesão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 Infecção natural dos clones em campo

Foram utilizados dados de Pires, Luz & Lopes (1997), onde a avaliação da infecção natural dos clones em campo por *Phytophthora* spp. foi realizada durante o estado produtivo das plantas, sendo avaliados todos os frutos colhidos em cinco plantas tomadas ao acaso, entre as dez plantas que representam cada clone na coleção de germoplasma do CEPEC, por um período de quatro anos. Esses dados do acervo de avaliação do Banco de Germoplasma do CEPEC, cedidos pelo Dr. José Luis Pires, foram correlacionados com aqueles obtidos nos testes de inoculação realizados em laboratório no presente estudo, com discos de folhas e frutos verdoengos destacados (itens 3.3 e 3.4).

3.6 Análise estatística

Os dados de cada teste realizado em laboratório foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do sistema estatístico intitulado "Statistical Analysis Sistem" (SAS, 1990), através do procedimento "General Linear Models Procedure" (PROC GLM).

As comparações entre as médias obtidas nos dois experimentos com discos de folhas, no experimento com frutos destacados e os valores de infecção natural em campo foram feitas por meio da análise de correlação linear (PEARSON, 1994) aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Severidade da doença (ID) em discos de folhas

A análise de variância com base nos dados de severidade da doença (ID) obtidos pelo teste de discos de folhas mostrou que houve diferença entre as reações dos clones ao patógeno em cada um dos dois ensaios (E1 e E2), com $p < 0.0001$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) entre os níveis de severidade obtidos para os 78 clones de cacauero pela avaliação dos sintomas aos sete dias após a inoculação em discos de folhas com suspensão de *Phytophthora palmivora* (3×10^5 zoósporos/mL⁻¹).

Ensaio (E)	Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
E1	Clones	77	3388.094.359	44001.225	10.52	<0.0001
	Resíduo	546	2283.680.000	4186.524		
E2	Clones	77	185546.480.000	24110.130	5.61	<0.0001
	Resíduo	546	2345.760.000	4296.264		

Para classificar os clones quanto à resistência ou susceptibilidade a *P. palmivora* nos dois ensaios, hierarquizou-se os clones avaliados pelas médias da menor para a maior, dividindo-se os 78 clones em três (3) terços, sendo o terço intermediário subdividido em dois (aproximadamente 13 clones cada). Aos clones colocados no terço superior foi atribuída a classificação de suscetíveis (S) e ao terço inferior resistentes (R). Quanto ao terço médio, os 13 primeiros clones foram considerados moderadamente suscetíveis (MS) e os outros 13 como moderadamente resistentes (MR). Quando as médias eram iguais mais clones foram alocados como moderadamente suscetíveis (MS).

No ensaio 1, houve diferenças significativas entre as médias de ID dos clones (Tabela 4) com a diferença mínima significativa (DMS = 4.31) para o teste Tukey a 5% de probabilidade, indicando que estes reagem de forma diferente a *P. palmivora*. Santos et al. (2011) em estudos realizados com outros materiais genéticos de cacauero também observaram comportamento diferente entre clones na reação à inoculação em discos de folhas com *P. palmivora*. Os clones que, neste ensaio, apresentaram os melhores resultados para resistência à Podridão Parda foram PA285 (média 0.20), SCA6 (média 0.70), PA169 e APA5 (média 1.60, ambos), CHUAO120 (média 1.70), AMAZON2.1 (média 1.90), CEPEC42 (média 2.00) e MOCORONGO1 (média 2.10) com as menores médias de índice de severidade (ID), sendo classificados como resistentes; e os clones que apresentaram as maiores médias foram SIC23 (média 13.00), CEPEC44 (média 11.90), OC77 (média 10.60), CEPEC82 (média 9.60) e CCN51 (média 8.80), classificados como suscetíveis.

No E2, os clones também mostraram diferenças nas reações ao patógeno, em relação às médias de severidade das lesões apresentadas nos discos inoculados (DMS 4.37). Os clones PA285 (média 0.30), MOQ647 (média 0.90), IMC23 e SCA6 (média 1.00, ambos), PA44 e PA294 (média 1.40, ambos) foram os que, na hierarquia das médias de todos os clones avaliados, apresentaram as menores médias de ID; e os clones que obtiveram as médias mais altas de ID foram SIC23 (9.50), CEPEC1008 (8.70), ICS95 (7.20) e EET62 (7.10).

As análises mostraram que houve interação significativa clone x ensaio nos dois testes com discos de folhas. A reação média (ID) dos clones no E1 foi 4.96 e no E2 foi 3.99. No ensaio 1 o ID variou de 0.20 a 13.00, enquanto no ensaio 2 houve variação de 0.30 a 9.50, em ambos os ensaios para os clones PA285 e SIC23, respectivamente.

Vinte e quatro dos 78 clones apresentaram IDs divergentes nos testes realizados em E1 e E2, havendo, porém, similaridade para 46 clones nos dois ensaios. Alguns clones se mostraram mais suscetíveis a *Phytophthora palmivora* em um ensaio do que no outro, a exemplo dos clones CEPEC44 (11.90 e 3.70 nos ensaios 1 e 2, respectivamente), CEPEC82 (9.60 no E1 e 3.40 no E2) e CEPEC1008 (4.30 no E1 e 8.70 no E 2), CCN51 (8.80 e 2.00) e EET62 (3.90 e 7.10), IMC23 (7.00 e 1.00) e PA169 (1.60 e 6.10), apresentando susceptibilidade em um ensaio e moderada resistência ou resistência no outro.

Tabela 4 - Índices de severidade da doença (ID) em discos de folhas de cacaueteiro inoculados com *Phytophthora palmivora* e classificação dos 78 clones avaliados quanto à resistência à Podridão Parda, em cada um dos ensaios realizados (E1 e E2).

(Continua...)

Clone	ID (E1)	Classe	Clone	ID (E2)	Classe
SIC23	13.00	S	SIC23	9.50	S
CEPEC44	11.90	S	CEPEC1008	8.70	S
OC77	10.60	S	ICS95	7.20	S
CEPEC82	9.60	S	EET62	7.10	S
CCN51	8.80	S	SPA12	6.50	S
SIC19	8.00	S	NA33	6.30	S
AMAZON15.15	7.80	S	TSA516	6.20	S
CJ10	7.80	S	PA169	6.10	S
TSA644	7.80	S	PA15	5.70	S
IMC2	7.80	S	CAB5046.1201	5.70	S
CEPEC40	7.30	S	PA150	5.60	S
IMC51	7.20	S	CSUL5	5.60	S
IMC23	7.00	S	RB33	5.60	S
RB32	7.00	S	ICS100	5.60	S
ICS100	7.00	S	EET392	5.30	S
TSA516	6.80	S	SIAL505	5.30	S
NA33	6.80	S	TSA644	5.30	S
UF667	6.50	S	OC77	5.10	S
MA12	6.50	S	CAB5046.1403	5.10	S
CAB5046.1201	6.40	S	CAB5003.23	5.00	S
CEPEC84	6.30	S	SIC19	4.90	S
ICS78	6.20	S	CEPEC526	4.90	S
SIAL542	6.00	S	SIAL164	4.90	S
ICS95	5.80	S	RIM117	4.80	S
CEPEC75	5.60	S	EET390	4.80	S
CEPEC93	5.60	S	RB32	4.80	S
RIM117	5.40	MS	CAB4	4.70	MS
SPA12	5.30	MS	RIM44	4.60	MS
CSUL5	5.20	MS	SPA5	4.50	MS
PA120	5.10	MS	SIC891	4.50	MS
SPA5	4.90	MS	CEPEC75	4.50	MS
UF36	4.90	MS	ICS78	4.40	MS
CEPEC38	4.80	MS	CEPEC93	4.40	MS
MOQ417	4.70	MS	CEPEC84	4.40	MS
CAB5003.23	4.70	MS	RB39	4.40	MS
CEPEC526	4.60	MS	CJ7	4.10	MS
RB39	4.50	MS	CEPEC89	4.00	MS
PA148	4.50	MS	MA12	4.00	MS
SIC891	4.50	MS	CEPEC40	4.00	MS
PA44	4.50	MR	MOCORONGO2	4.00	MS

Tabela 4 - Índices de severidade da doença (ID) em discos de folhas de cacauete inoculados com *Phytophthora palmivora* e classificação dos 78 clones avaliados quanto à resistência à Podridão Parda, em cada um dos ensaios realizados (E1 e E2).

(...Conclusão)

Clone	ID (E1)	Classe	Clone	ID (E2)	Classe
PA15	4.40	MR	APA5	4.00	MS
CEPEC85	4.40	MR	UF667	3.80	MR
CEPEC1008	4.30	MR	EET272	3.70	MR
NA312	4.20	MR	SIAL542	3.70	MR
PA150	4.10	MR	CEPEC44	3.70	MR
PA51	4.10	MR	MOCORONGO1	3.70	MR
EET272	4.10	MR	NA312	3.60	MR
TSA654	4.10	MR	UF36	3.60	MR
RB31	4.00	MR	CEPEC92	3.50	MR
CAB4	4.00	MR	CSUL4	3.50	MR
EET392	3.90	MR	SIC842	3.50	MR
EET62	3.90	MR	CJ10	3.50	MR
PA70	3.80	R	CEPEC82	3.40	R
SIAL164	3.80	R	TSA654	3.40	R
CEPEC89	3.80	R	IMC2	3.30	R
CEPEC92	3.80	R	CEPEC38	3.10	R
RIM44	3.70	R	PA51	3.00	R
SIC864	3.70	R	CEPEC42	3.00	R
PA88	3.60	R	SIC864	2.90	R
PA30	3.60	R	PA148	2.80	R
SIAL505	3.40	R	RB31	2.60	R
RB33	3.30	R	MOQ417	2.60	R
SIC842	3.30	R	CHUAO120	2.60	R
CAB5046.1403	3.10	R	AMAZON15.15	2.40	R
PA294	3.10	R	IMC51	2.10	R
CSUL4	3.10	R	CEPEC85	2.10	R
CJ7	3.00	R	CCN51	2.00	R
MOQ647	3.00	R	PA120	1.80	R
EET390	2.90	R	PA88	1.80	R
MOCORONGO2	2.60	R	AMAZON2.1	1.80	R
MOCORONGO1	2.10	R	PA70	1.70	R
CEPEC42	2.00	R	PA30	1.70	R
AMAZON2.1	1.90	R	PA294	1.40	R
CHUAO120	1.70	R	PA44	1.40	R
APA5	1.60	R	SCA6	1.00	R
PA169	1.60	R	IMC23	1.00	R
SCA6	0.70	R	MOQ647	0.90	R
PA285	0.20	R	PA285	0.30	R

DMS: 4.31*

DMS: 4.37*

(*) DMS calculado pelo teste tukey a 5% de probabilidade

Houve consistência nas reações dos clones testados, pertencentes às séries SIC e SIAL, utilizados neste estudo, tidos como suscetíveis; e na série PA, mostrando graus de resistência para a maioria dos clones testados nos dois ensaios de inoculação em discos de folhas, o que também ocorreu em estudos realizados por Pires, Luz & Lopes (1997) com frutos infectados em campo e Luz et al. (1996), através de inoculação artificial, em frutos não destacados.

Os sintomas e o desenvolvimento da Podridão Parda dependem do genótipo de cacau e da espécie de *Phytophthora* spp. envolvida no processo de infecção da planta (BARRETO et al., 2018). Os clones até então tidos como padrão de resistência (SCA6) e susceptibilidade (SIC23) aqui se comportaram como tal, nos dois ensaios. O SIC23 apresentou os maiores índices de severidade e o SCA6 ficou entre os que obtiveram os menores valores de ID. Estes clones são rotineiramente utilizados como padrões em testes de laboratório, casa de vegetação e campo, tanto para discos de folhas, plântulas ou frutos (LUZ et al., 1996; SANTOS et al., 2009, 2010; Bahia et al., 2015; Lessa, 2017).

Variações entre testes com disco de folhas utilizando os mesmos clones também foram anteriormente observadas por Nyassé et al. (2002), por Luz et al. (2006) e Santos et al. (2009). Isto levou Santos et al. (2011) à pesquisa com a utilização de discos de uma única folha por clone e discos obtidos de várias folhas e esses autores concluíram não haver diferença para a utilização de uma ou de várias folhas. No presente estudo, optou-se por retirar um único disco de cada folha por clone, considerando as 10 plantas existentes no BAG, mesmo assim, encontrou-se grande variação, embora os testes tenham sido realizados em épocas diferentes.

4.2 Área da lesão em frutos destacados

Para as inoculações com *P. palmivora* em frutos verdoengos destacados, a análise de variância com base na área da lesão (A) mostrou que houve variação entre as médias dos clones testados ($p < 0.0001$) (Tabela 5).

Os valores de A apresentaram variação entre zero (PA30) e 155,60 cm² (RIM117) (Tabela 6), a média de área da lesão para os clones testados foi de 44,2 cm². Os frutos do clone PA30 inoculados não desenvolveram lesão; em alguns clones não houve formação de lesões em todos os frutos inoculados ou estas ocorreram apenas em um dos pontos inoculados do mesmo fruto. As lesões

causadas em alguns clones tiveram valores médios muito altos, acima de 100 cm² (RIM117, UF667, UF36 e IMC51) e outros com valores inferiores a 10 cm² (APA5, CEPEC89, CEPEC92, CEPEC93, CEPEC526, PA30, PA285, PA294, SCA6 e TSA516). Estes últimos clones, entretanto, não diferiram de uma série de outros clones. Alguns dos melhores clones para o teste de frutos destacados também estão entre os melhores para o teste de discos de folhas (PA285, SCA6, PA30, APA5 e PA294). Entre os que apresentaram susceptibilidade, tanto nos ensaios com discos foliares como no teste com frutos destacados, encontram-se SIC19 e 23, ICS100 e NA33.

Os testes de inoculação tanto em frutos como em folhas estão sendo utilizados como métodos de rotina para identificar materiais resistentes à Podridão Parda (TAHI et al., 2007).

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) entre as médias obtidas pela avaliação da área da lesão em frutos destacados de clones de cacauero aos nove dias após a inoculação com suspensão de *Phytophthora palmivora* (3×10^5 zoósporos/mL⁻¹).

Causa de variação	GL	SQ	QM	F	Pr > F
Clones	67	1361.877.767	20326.534	6.26	<0.0001
Resíduo	1310	4250.436.600	3244.608		
Total	1377	5612.314.367			

Comparando-se esta metodologia de frutos destacados com a de discos foliares, foram observadas discrepâncias e semelhanças nas reações dos clones às inoculações nos dois órgãos do cacauero. Entre essas divergências, observou-se, por exemplo, que o clone AMAZON2.1 se mostrou resistente no teste de folhas e suscetível no teste de frutos destacados; CEPEC89 foi resistente em E1 e moderadamente suscetível em E2 para os discos foliares e resistente ao teste de frutos em comparação com os outros clones testados; CEPEC92 mostrou-se como resistente (E1) e moderadamente resistente (E2) nos ensaios com discos foliares e resistente no teste de frutos destacados e CEPEC526 foi suscetível nos discos foliares e resistente no teste de frutos. Também entre os clones considerados suscetíveis em frutos, com as maiores lesões, houve variação no comportamento em relação à resistência aos diferentes ensaios com discos de folhas e frutos

destacados; um exemplo é o clone IMC51, que foi suscetível em E1, suscetível em frutos destacados e resistente para E2.

Tabela 6 - Áreas médias de lesões (A) causadas por *Phytophthora palmivora* em frutos verdoengos destacados de 68 clones de cacauero.

Clone	A (cm²)	Clone	A (cm²)
RIM 117	155.60	CEPEC75	36.40
UF667	146.10	PA120	35.78
UF36	123.35	MOQ417	35.41
IMC51	121.20	MA12	34.51
SIC864	85.68	EET272	34.04
AMAZON2.1	81.38	MOQ647	32.60
SIC842	80.05	TSA654	32.53
SPA12	78.21	CAB5046.1403	32.37
CEPEC44	71.88	SIAL164	31.97
CHUAO120	69.70	MOCORONGO2	30.94
SPA5	69.43	CSUL4	30.53
SIC23	68.97	ICS95	27.59
SIAL505	68.26	RB39	26.87
NA312	63.31	PA51	26.69
PA150	62.80	CEPEC42	25.94
NA33	62.43	RB33	24.17
MOCORONGO1	60.65	CEPEC84	24.11
SIAL542	58.88	AMAZON15.15	22.35
SIC19	57.87	IMC2	21.76
SIC891	57.82	EET390	18.47
ICS100	55.26	PA169	17.17
EET62	53.75	EET392	16.98
CEPEC38	53.68	CCN51	15.46
CEPEC1008	51.81	CAB4	10.40
CSUL5	50.27	APA5	9.94
CAB5003.23	49.48	PA294	9.49
CEPEC82	49.09	PA285	7.30
PA15	48.48	CEPEC93	4.47
CEPEC40	47.74	CEPEC89	3.88
RB31	45.27	CEPEC526	3.37
PA148	44.92	CEPEC92	2.23
PA70	42.57	TSA516	0.73
PA44	40.73	SCA6	0.28
OC77	40.32	PA30	0.00

DMS: 78.06

É importante ressaltar que, assim como nos testes de discos de folhas, os representantes das séries SIC e SIAL também, de modo geral, estão entre os mais suscetíveis. Os padrões utilizados nos experimentos, no presente estudo, se comportaram como tal (SCA6 - resistente e SIC23 - suscetível), sendo possível

diferenciar, através da metodologia de frutos destacados, materiais suscetíveis e resistentes a *P. palmivora*. Alguns clones testados se mostraram até mais suscetíveis que o padrão (SIC23), embora não diferindo estatisticamente dele.

As inoculações em frutos não destacados, considerado o melhor método de avaliação de resistência a *Phytophthora* spp. em cacaueteiro (LAWRENCE, 1978; LUZ et al., 1996), tem sua utilização prejudicada pelo risco de levar infecção ao campo, principalmente por se tratar de um BAG. Variações já foram constatadas quanto à reação dos clones inoculados em frutos destacados e não destacados (LAWRENCE, 1978). No entanto, Iwaro et al. (1997) usaram rotineiramente inoculações em frutos destacados para avaliar resistência a *P. palmivora* em Trindade Tobago, para evitar este risco.

4.3 Correlação entre os testes de discos de folhas e frutos destacados e infecção natural a campo

Os dados de correlação linear de Pearson mostram uma relação significativa a 1% de probabilidade ($r = 0.3640$) entre os ensaios 1 e 2 realizados com discos de folhas de cacaueteiro inoculados com *P. palmivora* (Tabela 7). A correlação entre o E1 da inoculação em discos de folha com a inoculação em frutos verdoengos destacados (área da lesão) foi significativa a 5% de probabilidade, embora com baixo valor ($r = 0.2502$).

Comparando-se ainda o primeiro ensaio com o percentual de infecção no campo, não houve correlação significativa entre os dados ($r = 0.08082$). Já para o E2 não houve correlação entre as respostas dos clones ao patógeno inoculado em discos de folhas com as áreas de lesão obtidas nos frutos destacados, mas a correlação foi significativa com a infecção natural de frutos no campo ($r = 0.2950$) a 5% de probabilidade.

Bahia et al. (2015) destacaram que pequenas variações podem ocorrer nos resultados quando se avalia diferentes métodos de inoculação, o que já havia sido pontuado em estudos anteriores de comparação entre métodos de inoculação (LAWRENCE, 1978; CILAS; DESPRÉAUX, 2004).

Tabela 7 - Correlação entre os níveis médios de infecção por *Phytophthora palmivora* em discos de folhas e em frutos verdoengos destacados de cacauzeiros e a infecção natural dos clones em campo.

Correlação	Discos de folhas		Frutos destacados	Infecção em campo
	Ensaio 1	Ensaio 2		
Discos de folhas (Ensaio 1)	1.0	0.36402 0.0014**	0.25028 0.0461*	0.08082 0.4967
Discos de folhas (Ensaio 2)	0.36402 0.0014**	1.0	0.11.086 0.3831	0.29508 0.0113*
Área da lesão (fruto)	0.25028 0.0461*	0.11086 0.3831	1.0	0.37771 0.0023**
Infecção em campo	0.8082 0.4967	0.29508 0.0113*	0.37771 0.0023**	1.0

** p = 0.01 = 1% de probabilidade; * p = 0.05 = 5% de probabilidade.

As inoculações em frutos destacados (área da lesão) correlacionaram-se positivamente tanto com E1 nos testes em discos de folhas quanto com os percentuais de frutos infectados registrados a campo para os clones testados, a 1% e a 5% de probabilidade, respectivamente. Há correlação positiva entre a sensibilidade de frutos e folhas de cacauzeiro a *P. palmivora*, quando estas partes da planta são inoculadas com suspensões calibradas de zoósporos. Isto já havia sido evidenciado também por Nyassé et al. (2002). No presente estudo, o método de frutos destacados mostrou-se correlacionado positivamente com o percentual de infecção natural por *Phytophthora* registrado para os clones em campo, tendo apresentado o maior valor de correlação ($r = 0.3777$) a 1% entre todos os fatores correlacionados. Tahi et al. (2007) também encontraram correlação significativa entre os dados de infecção natural em campo e os testes de discos de folhas, de frutos destacados e frutos não destacados, e ressaltam que, em seu estudo, o maior coeficiente de correlação foi entre frutos destacados e infecção em campo, corroborando o que foi observado no presente estudo.

Discrepâncias encontradas nas reações de clones ao patógeno, entre os dois ensaios de inoculação em discos de folhas e entre estes e a inoculação em frutos

verdoengos destacados dos mesmos clones de cacaueteiro, resultaram em que as correlações entre eles foram baixas, embora os mesmos isolados tenham sido usados em todas as inoculações. Com os dados de campo, apenas não houve correlação com o ensaio 1 de inoculações em folhas (Tabela 8).

Os dados de campo mostraram ampla variação no comportamento dos clones selecionados para os testes de inoculação artificial, com variação de 0.51 (PA120) a 57% de frutos infectados (ICS78).

Alguns exemplos de clones que mostraram relações similares entre os testes realizados com órgãos destacados do cacaueteiro em laboratório e as avaliações de campo incluem os clones APA5, PA30, PA285, PA294 e SCA6 como resistentes; e os clones RIM 117, UF667, SIC19 e SIC23, que apresentaram susceptibilidade ao patógeno. A resistência existente no clone PA30 e a susceptibilidade de SIC19 e SIC23 a *Phytophthora* spp. já havia sido assinalada por Luz et al. (1996), testando frutos não destacados à campo.

O comportamento de alguns clones nos diferentes testes e na avaliação em campo chamou atenção. AMAZON2.1 apresentou resultados similares entre os dois ensaios de discos e a infecção em campo, mas a inoculação em frutos destacados destoou completamente das demais; CAB5046.1201 mostrou suscetibilidade tanto em folhas como na infecção em campo; CEPEC40 foi suscetível em E1, medianamente suscetível em E2 de discos folha e em frutos destacados obteve média superior à média do experimento, mas apresentou alta resistência à campo; CHUAO120 foi resistente nos dois ensaios de discos de folha, mas suscetível em fruto destacado e na infecção à campo; MOCORONGO1 foi resistente em E1 e moderadamente resistente em E2 de folha, suscetível em fruto destacado e resistente no campo. O clone NA33 foi suscetível nos testes de folhas e de frutos destacados, mas mostrou resistência em campo; e CEPEC89 foi considerado resistente em E1 e em frutos destacados, moderadamente resistente em E2 e resistente à inoculação em frutos destacados e à campo.

Tabela 8 - Índices médios de severidade (ID) da Podridão Parda em discos de folhas de cacaueteiro em diferentes ensaios (E1 e E2), área da lesão (A) em frutos destacados e valores percentuais de infecção natural dos clones em campo.

(Continua...)

Clone	ID		A (cm ²)	Infecção em campo (%)
	E1	E2		
AMAZON2.1	1.90	1.80	81.32	2.61
APA5	1.60	4.00	9.94	7.52
CAB4	4.00	4.70	10.40	3.43
CAB5003.23	4.70	5.00	49.48	1.15
CAB5046.120	6.40	5.70	-	47.01
CAB5046.140	3.10	5.10	32.37	46.51
CCN51	8.80	2.00	15.46	32.11
CEPEC38	4.80	3.10	53.68	16.66
CEPEC40	7.30	4.00	47.73	1.09
CEPEC42	2.00	3.00	25.93	11.22
CEPEC75	5.60	4.50	36.40	1.64
CEPEC84	6.30	4.40	24.10	2.52
CEPEC85	4.40	2.10	-	3.01
CEPEC89	3.80	4.00	3.88	4.72
CEPEC92	3.80	3.50	2.22	9.40
CEPEC93	5.60	4.40	4.47	0.66
CEPEC526	4.60	4.90	3.37	-
CEPEC1008	4.30	8.70	51.80	22.71
CHUAO120	1.70	2.60	69.69	41.61
CJ7	3.00	4.10	-	2.57
CJ10	7.80	3.50	-	1.58
CSUL4	3.10	3.50	30.52	7.54
CSUL5	5.20	5.60	50.27	29.23
EET62	3.90	7.10	53.74	14.18
EET272	4.10	3.70	34.03	2.71
EET390	2.90	4.80	18.47	3.34
EET392	3.90	5.30	16.97	18.67
ICS78	6.20	4.40	-	57.00
ICS95	5.80	7.20	27.58	18.09
ICS100	7.00	5.60	55.25	27.35
IMC2	7.80	3.30	21.75	8.11
IMC23	7.00	1.00	-	3.49
IMC51	7.20	2.10	121.20	0.98
MA12	6.50	4.00	34.50	6.13
MOCORONGO1	2.10	3.70	60.65	7.27
MOCORONGO2	2.60	4.00	30.94	5.76

Tabela 8 - Índices médios de severidade (ID) da Podridão Parda em discos de folhas de cacauero em diferentes ensaios (E1 e E2), área da lesão (A) em frutos destacados e valores percentuais de infecção natural dos clones em campo.

(...Conclusão)

Clone	ID		A (cm ²)	Infecção em campo (%)
	E1	E2		
MOQ417	4.70	2.60	35.40	0.59
MOQ647	3.00	0.90	32.59	0.61
NA33	6.80	6.30	62.43	3.37
NA312	4.20	3.60	63.31	14.35
PA15	4.40	5.70	48.47	21.10
PA30	3.60	1.70	0.00	10.32
PA44	4.50	1.40	40.72	3.41
PA51	4.10	3.00	26.68	1.96
PA70	3.80	1.70	42.57	3.39
PA88	3.60	1.80	-	4.32
PA120	5.10	1.80	35.77	0.51
PA148	4.50	2.80	44.91	14.51
PA150	4.10	5.60	62.80	17.34
PA169	1.60	6.10	17.17	5.14
PA285	0.20	0.30	7.30	8.34
PA294	3.10	1.40	9.49	5.14
RB31	4.00	2.60	45.26	3.71
RB32	7.00	4.80	-	3.99
RB33	3.30	5.60	24.17	3.14
RB39	4.50	4.40	26.86	10.77
RIM44	3.70	4.60	-	43.08
RIM117	5.40	4.80	155.60	48.13
SCA6	0.70	1.00	0.28	10.73
SIAL164	3.80	4.90	31.97	22.49
SIAL505	3.40	5.30	68.25	52.96
SIAL542	6.00	3.70	58.87	17.63
SIC19	8.00	4.90	57.87	21.77
SIC23	13.00	9.50	68.96	23.42
SIC842	3.30	3.50	80.04	27.48
SIC864	3.70	2.90	85.68	29.28
SIC891	4.50	4.50	57.82	30.16
SPA5	4.90	4.50	69.43	21.66
SPA12	5.30	6.50	78.21	6.62
TSA516	6.80	6.20	0.72	13.87
TS4644	7.80	5.30	-	3.38
TSA654	4.10	3.40	32.52	2.96
UF36	4.90	3.60	123.34	0.72
UF667	6.50	3.80	146.09	29.10

(-) Não foram obtidos dados

O fato de existir a correlação entre os testes com órgãos destacados do cacauero e as avaliações a campo demonstra que estes testes podem ser usados como avaliação preliminar ou precoce, uma vez que a tomada de dados no campo requer maior tempo e ocorrência de condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno para que haja infecção, o que nem todos os anos ocorre, uma vez que os déficits de pluviosidade afetam diretamente o comportamento de *Phytophthora* spp. (ROCHA; MACHADO, 1972). Ressalta-se que, em campo, podem ocorrer, também, além de *P. palmivora*, outras espécies como *P. citrophthora* e *P. capsici* e as reações dos clones podem variar de espécie para espécie do patógeno (LUZ et al., 1996; LAWRENCE; LUZ; RESNIK, 1982; BARRETO et al., 2015).

Este estudo é o primeiro a utilizar mistura de suspensões de zoósporos de *P. palmivora* para selecionar clones de cacauero resistentes a esta espécie. Os resultados apresentados fornecem informações importantes sobre materiais selecionados como resistentes a esta espécie, que é o principal agente causal da Podridão Parda tanto no Brasil como mundialmente, podendo ainda servir como base para pesquisas futuras na busca por materiais genéticos padrões de excelência na resistência à Podridão Parda do cacauero.

5 CONCLUSÕES

Há razoável confiabilidade nos testes de inoculação em discos de folhas e em frutos destacados, em consequência de haver correlação entre os dois métodos testados e também com os dados de infecção natural dos clones em campo.

A metodologia de inoculação em discos foliares tem certa eficiência na seleção de materiais resistentes, podendo ser utilizada para seleção precoce. Ressalta-se, no entanto, a necessidade do uso de um grande número de repetições para que se obtenham resultados mais confiáveis.

O método de inoculação em frutos destacados, quando estes estão disponíveis, reflete melhor a infecção natural em campo. Para selecionar materiais resistentes à campo é necessário se trabalhar com ensaios adequadamente estabelecidos com tomada de dados e identificação das espécies de *Phytophthora* que ocorrem na área.

Os clones APA5, PA30, PA285, PA294 e SCA6 apresentaram resistência a *Phytophthora palmivora*. Já os clones CAB5046.1403, RIM117, SIC19 e SIC23 foram os que apresentaram maior susceptibilidade ao patógeno, em todas as condições testadas e avaliadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory mycology. New York, John Wiley e Sons, **Inc.**, 4^a ed., p. 869, 1996.

ALMEIDA; A. A.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Braz. J. Plant Physiol.**, 19(4):425-448, 2007.

ANDEBRHAN, T. et al. Molecular fingerprinting suggest two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipelis pernicioso*) of the *Theobroma cacao* in Bahia, Brasil. **EUR. J. Planta Pathol.** 1055:167-175. 1999.

BAHIA, R. C. S. et al. Resistance to Black Pod Disease in a Segregating Cacao Tree Population. **Tropical Plant Pathology** 40: 13–18, 2015.

BAILEY, B. A. et al. *Moniliophthora roreri* causal agent of cacao frosty pod rot. **Molecular Plant Pathology** 19 (7), 1580–1594, 2018.

BARRETO, M. A. et al. QTL mapping and identification of corresponding genomic regions for black pod disease resistance to three *Phytophthora* species in *Theobroma cacao* L. **Euphytica** 214 (10):1-16, 2018.

BARRETO, M. A. et al. Detection of genetic resistance to cocoa black pod disease caused by three *Phytophthora* species. **Euphytica** 206(3): 677-687, 2015.

BARRETO, M. A. **Caracterização da resistência a phytophthora e mapeamento de QTL para resistência à Podridão Parda e à Vassoura de Bruxa do cacauero.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia. Campinas-SP. 2014.

BARTLEY, B. G. D. The genetic diversity of cacao and its utilization. **CABI Publishing. Wallingford, UK.** 341p. 2005.

BASTOS, C. N. et al. Doenças do cacauero. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds). **Manual de Fitopatologia:**

doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres Ltda. Vol. 2. 5^o Ed., Ouro Fino – MG, p. 175-181, 2016.

BLAHA, G.; LOTODE, R. Un critere primordial de selection du cacaoyer au Cameroun: la resistance a la pourriture brune des cabosses. Variations des reactions a la maladie en liaison avec les dones ecologiques et l'etat physiologique des fruits. **Café Cacao Thé** 20 (2): 97-116. 1976.

BEAKES, G. W.; HONDA, D.; THINES, M. Systematics of the Staminiplila: Labirynthulomycota, Hyphochytriomycota and Oomycota. In: MCLAUGHLIN, D. S. SPATAFORA, J. W. (eds). **The Mycota VIII**, part A. Springer-Verlag, Berlin, p. 39-97, 2014.

BOWERS, J. H. et al. The impact of plant diseases on world chocolate production. Online. **Plant Health Prog.** 2001.

CAMPELO, A. M. F. L; LUZ, E. D. M. N.. Virulência de *Phytophthora* spp. em frutos destacados de cacau da cultivar comum. In: XIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1981, Porto Alegre. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 6. p. 587-587, 1981.

CILAS, C.; DESPREAUX, D. **Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases**. CIRAD, p.77–102. 2004.

CERQUEIRA, A. O. **Caracterização, distribuição e genética populacional de *Phytophthora capsici* em *Hevea brasiliensis* na Bahia, Brasil**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2014.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Detection of a resistance gradient to *Passion fruit woodiness virus* and selection of 'yellow' passion fruit plants under field conditions. **Genetics and Molecular Research** 7: 1209-1216. 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Cacau amêndoa – análise mensal. Novembro, 2018. Disponível em < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-cacau> >. Acesso em Janeiro de 2019.

COULIBALY K. et al. Molecular Identification of *Phytophthora palmivora* in the Cocoa Tree Orchard of Côte d'Ivoire and Assessment of the Quantitative Component of Pathogenicity. **International Journal of Sciences** 7: 7-15, 2018.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L.: um novo cenário. In: DIAS LAS (ed.). **Melhoramento genético do cacaueiro**. Funape, Viçosa, p. 81–127. 2001.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. (eds) *Phytophthora* diseases worldwide. **St. Paul: APS Press**, p. 562, 1996.

EVANS, H. C. Cacao Diseases - The Trilogy Revisited. **Phytopathology**, 97, 1640–1643. 2007.

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacauero com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 29 (3): 303-306, 2004.

GODOY, P. R. E. et al. Performance polínica em cacaueros (*Theobroma cacao* L.) autocompatíveis e autoincompatíveis. **Revista Brasil. Bot.**, v.32, n.3, p.617-620, jul.-set. 2009.

GUEDES, M. Cacau da Bahia: 70% da produção nacional. Secretaria especial de Agricultura Familiar e do Desenvolvimento Agrário. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/sitemda/noticias/cacau-da-bahia-70-da-produ%C3%A7%C3%A3o-nacional>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2019.

GRAHAM, J. H.; TIMMER, L. W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U S.; MUKHOPADHY, A. N. (Ed.). **Plant diseases of international importance: diseases of fruit crops**. Englewood Cliffs: PrenticeHall, v. 3, p. 250-269. 1992.

HANADA, E. R. **Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da Podridão Parda dos frutos de cacauero com fungos endofíticos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas - Manaus, 2006.

HELLIWELL, E. E. et al. Enhanced resistance in *Theobroma cacao* against oomycete and fungal pathogens by secretion of phosphatidylinositol-3-phosphate-binding proteins. **Plant Biotechnology Journal**, 14, pp. 875–886. 2016.

ICCO – International Cocoa Organization. Production QBCS XLIV No. 3. Disponível em <https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html> Acesso em 15 de janeiro de 2019.

IWARO, A. D. et al. Rapid screening for *Phytophthora* pod rot resistance by means of detached pod inoculation. In: ESKES, A. B.; ENGELS, J. M. M.; LASS, R. A. (eds.) **Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project Workshop**. IPIGRI, Montpellier, p. 109-113. 2000.

IWARO, A. D.; SREENIVASSAN, T. N.; UMAHARAN, P. *Phytophthora* resistance in cacao (*Theobroma cacao*): influence of pod morphological characteristics. **Plant Pathology** 46: 557–565, 1997.

KANNWISCHER, M. E.; MITCHELL, D. J. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. **Phytopathology**, v. 68, p. 1760–1765, 1978.

LAWRENCE, J. S.; LUZ, E. D. M. N.; RESNIK, F. C. Z. The relative virulence of *Phytophthora palmivora* and *P. capsici* on cacao in Bahia, Brasil. In: **Conferencia Internacional de Investigacions en Cacao**, 8ª, 57 Catagena, Colombia, 1981. Actas. Lagos, Nigeria, Cocoa Producers' Alliance, p. 395-400, 1982.

LAWRENCE, J. S. Evaluation of methods for assessing resistance of cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivars and hybrids to *P. palmivora* (Butler) Butler. Ilhéus, BA: CEPLAC/CEPEC. n. 62, 47p, 1978.

LESSA, I. Z. V. **Morfologia e agressividade de isolados de *Phytophthora palmivora* de cacaueteiro no estado da Bahia.** 2017. p.63. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2017.

LOPES, U. V. et al. Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results, **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S1: 73-81. 2011.

LUZ, E. D. M. N. et al. Influência do sistema de cultivo na biogeografia das espécies de *Phytophthora* patogênicas ao cacaueteiro na Bahia, Brasil. **No prelo.** Agrotropica. 2019.

LUZ, E. D. M.; et al. *Phytophthora* spp. do cacaueteiro na Bahia - um estudo de prevalência. In: **46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Ouro Preto-MG, 2013.

LUZ, E. D. M. N.; et al. **Glossário Ilustrado de *Phytophthora***: Técnicas especiais para estudos de oomicetos. Itabuna, BR: FAPESB, 204p, 2008.

LUZ, E. D. M. N. O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 3 (suplementos): 80-81, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; O gênero *Phytophthora* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3 (suplementos), p. 80-81. 2006.

LUZ, E. D. M. N. et al. Aumento da frequência de ocorrência de *Phytophthora citrophthora* em cacaueteiros no sul da Bahia. **Fitopatologia Brasileira** 28:214-215. 2003.

LUZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Org.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil.** 1ed. v. 1, Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 1-22, 2001.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacaueteiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Org.) **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Campinas: Livraria e Editora Rural, p. 175-265, 2001.

LUZ, E. D. M. N. et al. Selection of cacao genotypes resistant to *Phytophthora capsici*, *P. palmivora* and *P. citrophthora* in Bahia, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 21: 71-79, 1996.

LUTZ, A., MENGE, J.A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora nicotianae* that occur in irrigated citrus groves. **Plant Disease.**, v.75, p.173-9, 1991.

LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. Densidade de inóculo de *Phytophthora* spp. no solo e infecção de raízes do cacauzeiro. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 1995a (Informe de Pesquisa 1987/1990). 1990a.

LUZ, E. D. M. N.; MITCHELL, D. J. . Patogenicidade de *Phytophthora* spp. a raízes, caules, folhas e frutos de *Theobroma cacao*.. Ilhéus: Ceplac/Cepec, 1995b (Informe de Pesquisa 1987/1990). 1990b.

LUZ, E. D. M. N. **The roles of five species of *Phytophthora* in infection and disease of roots, stems, and pods of *Theobroma cacao***. 1989. 183p. Tese de Doutorado em Fitopatologia (University of Florida), Flórida, 1989.

MAIA, L. C., CARVALHO Jr., A. A. (Coords.). Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* (Online), v. 66, p. 1-13, 2015.

MAIA, L.C.; CARVALHO Jr., A.A. (Coords.). Lista de espécies: fungos. In: Forzza, R.C. (Org.) et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. p. 90-261, 2010.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research** 26:195-217, 1923.

MEDEIROS, A. G. **Sporulation of *Phitophthora palmivora* (Butl.) Butl. in relation to epidemiology and chemical control of black pod disease**. Tese de Doutorado. Universidade da Califórnia, Riverside, 220p, 1977.

MEDEIROS, A. G.; MELO, J. W.; SANTANA, J. B. Incidência e disseminação da Podridão Parda em cacauzeiros na Bahia. In Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. **Informe Técnico**. pp. 68-69. 1969.

MENDES, M. A. S. et al. Fungos em plantas no Brasil. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 569p. 1998.

MICHEREFF, S. **Controle genético de doenças de plantas**. 2014. Disponível em < <https://www.researchgate.net/publication/242580646> **CONTROLE GENETICO DE DOENCAS DE PLANTAS** > Acesso em 04 de dezembro de 2018.

MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Melhoramento genético do cacauzeiro. In: VALLE, R. R. **Ciência, tecnologia e manejo do cacauzeiro**. 2ª Ed. Brasília-DF, p.11-29. 2012.

MÜLLER, M.V.; VALLE, R.R. Ecofisiologia do cultivo do cacauzeiro. In: VALLE, R. R. **Ciência, tecnologia e manejo do cacauzeiro**. 2ª Ed. Brasília-DF, p.11-29. 2012.

NYASSÉ, S. C.; DESPRÉAUX, D.; CILAS, C. Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa (*Theobroma cacao* L.) diallel mating design. **Euphytica** 123: 395–399, 2002.

NYASSÉ, S. C. et al. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. **Crop Protection** 14: 657-663, 1995.

OKABE, E. T. et al. Desempenho de clones de cacaueteiro em Ouro preto do Oeste, Rondônia, Brasil. **Biosci. J.**, v. 20, n. 3, p. 133-143, Sept./Dec, 2004.

OKAISADOR, E. K. Phytophthora pod rot infections from soil. In: GREGORY, P.H. (Ed.). **Phytophthora disease of cocoa**. Longman Group Limited. Londres, p.161-169,1974.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Principais doenças do cacaueteiro e seu manejo. In: VALLE, R. R. **CIÊNCIA, tecnologia e manejo do cacaueteiro**. 2ª Ed. Brasília-DF, p. 187-275, 2012.

_____. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Centro de Pesquisas do Cacau. Cap. III. P. 34-45, Ilhéus-BA, 2005.

PAIM, M. C. A. et al. Pathogenicity of *Phytophthora* species to *Anthurium andraeanum* in Brazil. **Australasian Plant Pathology** 35, 275–277, 2006.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 417-453. 1995.

_____. Mecanismos de resistência às doenças. In: WILMAR, C. L. (Org.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo fundo, RS: v. 2, p.1-51, 1994.

PEARSON, K.; FISHER, R. I. HENRY, F. “Karl Pearson and RA Fisher on Statistical Tests: A 1935 Exchange from Nature”. **The American Statistician** 48(1): 2-11, 1994.

PHILLIPS-MORA, W. et al. First report of frosty pod rot caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Bolivia. **New Disease Reports** 31, 29. 2015.

PEREIRA, J. L. M. 1988. **Alternative strategies for the chemical control of *Phytophthora* pod rot of cocoa in Bahia, Brazil**. PhD. Thesis. Long Ashton, Bristol, United Kingdom, University of Bristol. 220p.

PIRES, J. L. **Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueteiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. 2003.

PIRES, J. L.; LUZ, E. D. M. N.; LOPES, U. V. Resistência em campo de clones de cacaueteiro à podridão-parda, causada por *Phytophthora* spp. na Bahia, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 22(3): 375-380, 1997.

RAMOS, C. S. Produção e preços do cacau aumentaram no país em 2018. **Valor Econômico**. Disponível em: <<https://www.valor.com.br/agro/6053819/producao-e-precos-do-cacau-aumentaram-no-pais-em-2018>>. Acesso em 13 de janeiro de 2019.

ROCHA, L. B. A região cacauzeira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa: saga, percepção, representação. **Editus**, Ilhéus-Bahia, 255p. 2008.

ROCHA, H. M.; MACHADO, A. D. Fatores ambientais associados com a podridão-parda do cacauzeiro. *Revista Theobroma (Brasil)* 2:26-34. 1972.

RORER, J. B. Enfermedades y plagas del cacao em el Ecuador y metodos modernos apropiados al cultivo del cacao. **Agricultural Society of Ecuador**, Guayaquil. 1918.

RORER, J. B. The relation of black rot of cacao pods the canker of cacao três. Trinidad and Tobago Department of Agriculture, **Bulletin** nº 9. 38p. 1910.

SÁNCHEZ, S. E. M. Cacau e graviola: descrição e danos das principais pragas-de-insetos. Editora da UESC, Ilhéus: **Editus**, 147p, 2011.

SANTOS, A. A. **Diversidade genética e resistência a podridão parda e vassoura-de-bruxa em cultivares locais de cacau na Bahia**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 66p. 2015.

SANTOS, A. F.; LUZ, E. D. M. N.; REIS, A. "Phytophthora spp.: Distribuição e Associação com Espécies Florestais." Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, 47.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MOFO BRANCO, 2014, Londrina. Desafios futuros: anais. Londrina: SBF, 2014.

SANTOS, E. S. L. et al. Resistance gradient of black pod disease in cocoa and selection by leaf disk assay. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 11: 297-303, 2011.

SANTOS, M. V. O. **Identificação de *Phytophthora* spp. e de agentes de biocontrole em diversos cultivos no Sul da Bahia**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 91p. 2010.

SANTOS, E. S. L. et al. Identificação de resistência genética do cacauzeiro à Podridão Parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44(4): 413-416, 2009.

SANTOS, E. S. L. **Caracterização do gradiente de resistência de Genótipos de cacauzeiro (F2 SCA6 X ICS1) à podridão-parda por meio de avaliações fitopatométricas, genéticas e moleculares**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 89p. 2009.

SANTOS, R. M. F. et al. Marcadores microsatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 8, p. 1137-1142, 2007.

SAS. User's guide: statistics version. Cary: SAS Institute. p. 846. 1990.

SCHUMANN, G. L.; D'ARCY, C. J. Essential Plant Pathology. **APS Press, St. Paul, MN**. Chapter 4, "What are the causes of plant diseases? Nematodes", p. 67-84, 2006.

SERRA, M.; MARINHO, L. P. Crescimento x desenvolvimento regional endógeno: uma análise da região cacauera baiana, 1960-1980. RDE - **Revista de Desenvolvimento Econômico**, v. 9, n. 15, 2010.

SILVA, E. D. V. M.; et al.. Resistência de progênies de cacauero à murcha-de-Ceratocystis. **Tropical Plant Pathology**, vol. 37(3):191-195, 2012.

SODRÉ, G. A. et al. Extrato da casca do fruto do cacauero como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauero. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 881-887, Setembro, 2012.

SOUZA, U. **Resistência a *Phytophthora citrophthora* em citros: testes de métodos de inoculação e avaliação de porta-enxertos e combinações copas/porta-enxertos**. Dissertação de Mestrado (Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, 2018.

SOUZA, C. A. S; DIAS, L. A. S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: Folha de Viçosa. p.1-47. 2001.

TAHI, G. M. et al. Blackwell Publishing Ltd Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: the effect of light intensity and time of day of leaf collection. **Plant Pathology** 56: 219–226, 2007.

TAHI, G. M. et al. Foliar resistance of cação (*Theobroma cacao* to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. **Plant Pathology** 55: 776-782. 2006.

THEVENIN, J. M. et al. Planting material screening by controlled inoculation. In: CILAS, C.; DESPREAUX, D. (Eds.). Improvement of cocoa tree resistance to *Phytophthora* diseases. **CIRAD**, p.77-102, 2004.

TORREND, C. Les maladies du cacaoyer de L'Etat de Bahia. **Brotéria Série Botânica** (Portugal), 15: 107-127. 1917.

VAN DER VOSSSEN, H. A. M. Strategies of variety improvement in cocoa with emphasis on durable disease resistance. **An external review prepared for INGENIC**. p. 32, 1997.

WARD, M. R.; GRIFFIN, M. J. Soil phase of Cocoa *Phytophthora*. In: GREGORY, P. H.; MADDISON, A.C. (ed) **Epidemiology of *Phytophthora* on cocoa in Nigeria**. Kew, England, Commonwealth Mycological Institute. 1981.

WHITLOCK, B. A.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae (“Sterculiaceae” or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. **Systematic Botany** 26: 420–37, 2001.

ZENTMYER, G. A. Origin and distribution of four species of *Phytophthora*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 91, p. 367-378, 1988.

ZEHNTNER, L. Le cacaoyer dans L’Etat de Bahia. Berlim, Verlag. 118p. 1914.