

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO
VEGETAL**

FERNANDA SANTOS DA SILVA



**VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM
TRÊS AGROSSISTEMAS DA REGIÃO CACAUEIRA BAIANA**

**ILHÉUS - BAHIA
2009**

FERNANDA SANTOS DA SILVA

**VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM TRÊS
AGROSSISTEMAS DA REGIÃO CACAUEIRA BAIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Produção Vegetal, da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Área de Concentração: Proteção de Plantas.

Orientadora: Edna Dora Martins Newman Luz.

**ILHÉUS - BAHIA
2009**

FERNANDA SANTOS DA SILVA

**VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM TRÊS
AGROSSISTEMAS DA REGIÃO CACAUEIRA BAIANA**

Ilhéus, BA, 16/07/2009.

Edna Dora Martins Newman Luz.
CEPLAC/ CEPEC
(orientadora)

José Luiz Bezerra
UESC/ DCAA

Ronan Xavier Corrêa
UESC/ DCB

Wilson Reis Monteiro
CEPLAC/ CEPEC

DEDICATÓRIA

Aos trabalhadores e trabalhadoras rurais desta região que com suas mãos calejadas construíram fabulosa riqueza sem nunca ter usufruído dela.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade de realização dos cursos de Graduação e Pós-Graduação e por minha excelente formação acadêmica.

À FAPESB, pelo apoio financeiro ao projeto.

À CEPLAC e UESC, pela infra-estrutura laboratorial e disponibilização de mestres na orientação.

À Dra. Edna Dora Martins Newman Luz, pela orientação, carinho, paciência e inspiradora sabedoria, pelo apoio em todos os momentos, compreensão e confiança em minha competência.

À Dra. Karina Peres Gramacho, pela co-orientação, oportunidade, incentivo e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. José Luiz Bezerra, meu querido professor, pelas energias positivas transmitidas em seus ternos abraços.

Ao Lindolfo, pela presteza e fundamental ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. José Luis Pires, pela ajuda nas análises estatísticas.

À Dra. Stela, pela ajuda, gentileza e atenção.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Biotecnologia e Fitopatologia do CEPEC/CEPLAC, pelo companheirismo e pela amizade: Louise, Lívia, Sanlai, Chica, Dilton, Rogério, Leila, Nara, Wal, Éwerton, Seu Zé Reis, Seu Rubem, Joselito Verinha, Lurdinha, Gilmar, Orlando, Magui, Seu Justino, Seu Wilson, Seu Orlando e todos os trabalhadores de campo.

Aos meus pais, Cida e Gilson, que com muita dedicação, amor e empenho conseguiram possibilitar uma vida digna a minha família. A minha guerreira mãe que é meu alicerce e a fonte maior de inspiração de todas as minhas lutas.

Ao meu irmão Fabrício e às minhas irmãs, Fabiana e Franciely, que são meus eternos incentivadores e meus melhores amigos.

Ao meu amor, companheiro eterno em todos os momentos, Murilo, que com todo amor e dedicação me faz ver, a cada dia, as belezas da vida.

À minha filha Clarisse, que ainda não chegou ao mundo terreno, mas que desde o ventre me torna uma mulher completa e realizada.

À Minha amada sobrinha Letícia, que mostrou a nossa família a delícia do encantamento de uma criança.

À minha sogra e meu sogro, que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, orientando e dedicando todo o amor e carinho, fazendo com que eu me torne a cada dia uma pessoa melhor.

Aos meus cunhados e minha cunhada, que com muito amor me receberam em sua família.

À banca avaliadora que muito contribui para aprimoramento deste trabalho.

Aos meus companheiros e minhas companheiras do Partido dos Trabalhadores, que são meus parceiros e parceiras na luta por uma sociedade justa, fraterna e igual.

SUMÁRIO

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Resistência do cacau a vassoura-de-bruva.....	3
2.2. Caracterização do fitopatógeno.....	8
2.3. Interação planta-patógeno, variabilidade genética.....	11
2.4. Agrossistemas.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material genético.....	15
3.2. Obtenção e manutenção dos inóculos utilizados nestes experimentos.....	16
3.3. Preparo dos inóculos antecedendo à inoculação.....	17
3.4. Inoculação.....	17
3.5. Avaliação	18
3.6. Delineamento e análises dos dados.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

EXTRATO

SILVA, Fernanda Santos da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Julho de 2009. **VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE *Moniliophthora perniciosa* EM TRÊS AGROSSISTEMAS DA REGIÃO CACAUEIRA BAIANA.** Orientadora: Edna Dora Martins Newman Luz. Co-orientadora: Karina Peres Gramacho. Conselheiros: José Luiz Bezerra e Stela Dalva Vieira Midlej Silva.

A vassoura-de-bruxa causada pelo fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* é a doença mais devastadora do cacauero no Brasil. A alternativa mais viável e econômica para o controle da doença é a utilização de materiais genéticos resistentes e com alta produtividade, combinando várias fontes de resistência, pois os descendentes dos clones Scavinas vêm suplantando a resistência à vassoura-de-bruxa na região cacauera baiana. Por outro lado, o patógeno também vem passando por processos evolutivos de adaptação. Há, pois necessidade de se avaliar genótipos para resistência nos diferentes agrossistemas da região cacauera baiana. Esta pesquisa teve como objetivos 1) analisar a variabilidade patogênica de *M. perniciosa* na região cacauera baiana em nível de: i) agrossistema; ii) de município; iii) de genótipo; 2) avaliar a utilização de misturas de inóculo por agrossistema na seleção de material genético resistente. Progênies dos clones Sca 6 (resistente), ICS 1 e SIC 23 (suscetível) foram inoculadas com suspensões de 2×10^5 basidiósporos/mL, provenientes de vassouras secas de cacauero coletadas em nove municípios, Ilhéus, Floresta Azul e Jussari (agrossistema Almada); Ipiaú, Itagibá e Jitaúna (agrossistema Ipiaú), Camacan, Santa

Luzia e Pau Brasil (agrossistema Camacan), além das três misturas de inóculos dentro de cada agrossistema, totalizando 12 inóculos e a testemunha. O experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 13 com 4 repetições de 28 plantas cada. Sessenta dias após a inoculação os sintomas foram avaliados e duas variáveis SINT (incidência de doença) e ID (índice de doença) foram utilizadas para análise dos dados. Houve variabilidade patogênica entre os inóculos de *M. pernicioso* provenientes dos três agrossistemas, sendo o do agrossistema Ipiaú o mais agressivo. Dentre os inóculos testados (9 municípios) o de Ipiaú foi o que provocou mais infecção nas plântulas inoculadas. Observou-se também variabilidade no comportamento das progênies em relação aos inóculos de diferentes agrossistemas. A progênie ICS 1, demonstrou maior suscetibilidade em relação as progênies Sca 6 e SIC 23. Por enquanto não é possível recomendar o uso de misturas de inóculos, pois houve comportamento contrastante para os agrossistemas Almada e Ipiaú.

Palavras-chave: *Theobroma cacao* L., vassoura-de-bruxa; resistência; melhoramento genético.

ABSTRACT

SILVA, Fernanda Santos da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Julho de 2009. **PATAHOGENIC VARIABILITY OF *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* FROM TREE AGROECOLOGICAL ZONES OF THE CACAO GROWING REGION OF BAHIA.**

Advisor: Edna Dora Martins Newman Luz. Co- Advisor: Karina Peres Gramacho.

Committee: José Luiz Bezerra e Stela Dalva Vieira Midlej Silva.

Witches' broom disease of cacao, caused by *Moniliophthora perniciosa*, is one of the most important diseases of cacao in Brazil. The most feasible economic way to control is disease is the adoption of resistant and high productive genetic materials combining genes of several resistant sources, once the Scavina's descendent are loosen resistance in Bahia. To worse the situation, the pathogen has also been going trough a process of evolution toward the Scavinas. Therefore, there is a need to screen genotypes for disease resistance with inocula sources from several agroecological areas of the cacao growing region of Bahia. The objectives of this research were to 1) determine the pathogenic variability of *M. perniciosa* in the cacao growing areas of Bahia at the level of: (i) agroecological zone; (ii) counties; (iii) genotype; and 2) to evaluate the use of composite inocula per agroecological zone in screening for disease resistance. Progenies of the clones Sca 6 (resistant), ICS 1 and SIC 23 (susceptible) were inoculated with 2×10^5 basidiospores/mL. Inocula were derived from dry brooms collected in nine counties: Ilheus, Floresta Azul and Jussari (Almada agroecological zone); Ipiaú, Itagibá and Jitaúna (Ipiaú agroecological zone), Camacan, Santa Luzia and

Pau Brasil (Camacan agroecological zone), and three composite mixtures of individual inocula within an agroecological zone, totalizing 12 inocula, plus the control. The experiment was set as a completely randomized factorial 3 x 13 design with 4 replicates of 28 plants each. Sixty days after the inoculation day, plants were evaluated considering the variables SINT (disease incidence) and ID (disease index). There was pathogenic variability among inocula from the three agroecological zones, being inocula from Ipiau the most aggressive. Among the individual inocula (9 counties), the one from Ipiau induced more disease on inoculated seedlings. There was also variability in the disease response of progenies to inocula from different agroecological zones. The progeny ICS 1 was the most susceptible as compared to Sca 6 and SIC 23 progenies. It is not yet possible to recommend the use of inocula mixture to screen cacao genotypes for resistance to witches' broom disease because contradictory results were obtained for the inocula mixtures of Agroecological zones of Ipiau and Almada.

Key-words: *Theobroma cacao* L.; witches' broom disease; resistance, genetic breeding.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sintomas da doença vassoura-de-bruxa. (A) - Vassoura terminal; (B) - Vassoura axilar; (C) - Inchamento de caule; (D) - Vassoura seca.....**19**
- Figura 2.** Porcentagem média de sintoma de vassoura-de-bruxa (A) e valores médios do índice de doença (B) apresentado pelas plântulas de progênies de cacauero, inoculadas com basidiósporos obtidos de vassouras provenientes de três agrossistemas: Almada, Camacan e Ipiaú.....**23**
- Figura 3.** Porcentagem média de sintoma de vassoura-de-bruxa (A) e valores médios do índice de doença (B) apresentados pelas plântulas das três progênies dos clones de cacauero ICS 1, SIC 23 e Sca 6.....**25**
- Figura 4.** Efeito dos inóculos de *M. pernicioso* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de ICS 1 para as variáveis: (A) - porcentagem média de infecção (SINT) e (B) - Médias de índice de doença (ID).....**27**
- Figura 5.** Efeito dos inóculos de *M. pernicioso* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de Sca 6 para as variáveis: (A) - porcentagem média de infecção (SINT) e (B) - Médias de índice de doença (ID).....**28**

Figura 6. Efeito dos inóculos de *M. perniciosus* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de SIC 23 para as variáveis: (A) - porcentagem média de infecção (SINT) e (B) - Médias de índice de doença (ID).....**29**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise de variância dos dados para incidência (SINT) e severidade (ID) de doença.....**22**
- Tabela 2.** Porcentagens médias de infecção e médias do índice de doença provocados em plântulas de cacauero por inóculos provenientes de nove municípios da região cacauera.....**26**
- Tabela 3.** Inflência dos inóculos oriundos de diferentes municípios da região cacauera baiana na patogenicidade de *M. pernicioso* em três progênies de *Theobroma cacao* L.....**30**
- Tabela 4.** Porcentagem de sintomas e médias de índice de doença obtidas para as três progênies (ICS 1, Sca 6 e SIC 23) quando inoculadas por inóculos obtidos de cada município e da mistura de municípios por agrossistema.....**32**
- Tabela 5.** Valores da probabilidade (Teste F) para rejeição da hipótese de nulidade do contraste entre as médias das progênies por variável e por agrossistema e a média da mistura de cada agrossistema.**33**

1 INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.), causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), é atualmente a doença de maior impacto econômico no Brasil, sendo a principal causadora da redução da produtividade e da qualidade do produto, do aumento dos custos de produção, da quase total destruição da lavoura no estado da Bahia, de perdas ambientais e de uma vasta crise econômica que afetou não só a produção no estado da Bahia mas a produção brasileira de cacau, passando o país de exportador a importador do produto (LUZ et al., 1997).

A vassoura-de-bruxa provoca superbrotamento, hipertrofia nos ramos, frutos e almofadas florais, podendo, até, causar a morte da planta quando afetada por sucessivos ciclos do patógeno associados a fatores abióticos (ANDEBRHAN, 1984; QUEIROZ et al., 2003).

Diante disso, umas das alternativas mais recomendadas para se manejar a vassoura-de-bruxa é o emprego de variedades resistentes e com alta produtividade. Infelizmente a maioria das variedades de cacau usadas no Brasil e em outros países produtores, são baseadas em apenas uma fonte de resistência (Scavinas). Para contribuir no melhoramento do cacauero visando resistência à vassoura-de-bruxa, está se buscando incluir, nas áreas de cultivo, genótipos com fatores de resistência distintos dos até então utilizados (Scavinas) e a associação de genes de resistência de diferentes fontes para ampliar sua durabilidade, dificultando assim a evolução do patógeno.

Alguns dos clones descendentes dos Scavinas têm mostrado um significativo aumento na incidência da doença (PIRES, 2003; PAIM et al., 2006). Paim et al. (2006) detectaram um aumento no número de vassouras em descendentes de Scavina 6, ao longo de seis anos de avaliação no campo, sugerindo um processo de evolução do patógeno, sobre esses genótipos uma vez que descendentes dos clones CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) permaneceram com baixo nível de infecção.

O fungo, agente etiológico da VB, também vem passando por processos evolutivos de adaptação, sendo este, mais um fator para justificar estudos sobre a variabilidade patogênica. Através do uso de material genético oriundo de várias fontes de resistência pode-se interferir no ciclo evolutivo do fungo dificultando o aumento da frequência de tipos mais agressivos e conseqüentemente mais danosos a produção (GRAMACHO et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade patogênica de *M. pernicioso* na Região Sudeste da Bahia é necessário para subsidiar a seleção de materiais resistentes e técnicas de manejo biológico, químico ou cultural, além de estudos sobre a interação patógeno-hospedeiro. Conhecer mais profundamente o fitopatógeno e sua variabilidade genética e patogênica é essencial à recomendação de clones ou variedades com resistência durável, adequando e facilitando o emprego das técnicas de manejo integrado da doença para atribuir maior sustentabilidade à cultura na região.

Esta pesquisa teve como objetivos estudar: 1) a variabilidade patogênica de *M. pernicioso* na região cacauqueira baiana a nível de: i) agrossistema; ii) município; iii) genótipo; 2) avaliar a utilização de misturas de inóculo por agrossistema na seleção de matérias genéticas de cacauzeiro resistentes à vassoura-de-bruxa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resistência do cacau a vassoura-de-bruxa

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) pertence à ordem Malvales, família Malvaceae e gênero *Theobroma* (ALVERSON et al., 1999), é originário das florestas equatoriais das Américas Central e do Sul. Foi introduzido na Bahia em 1746 pelo colono francês Luís Frederico Warneaux, que plantou as sementes trazidas do Pará, no atual município de Canavieiras (VELLO; GARCIA, 1971).

O cacauero é ameaçado por diversas enfermidades fungicas, sendo a vassoura-de-bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), a doença de maior impacto atualmente e, portanto, a mais preocupante no Brasil.

A doença foi mencionada oficialmente em 1904 (Went, 1904) que relatou sua ocorrência, em 1895, no Suriname. No entanto o seu agente etiológico só foi descrito por Stahel em 1915. No Estado da Bahia foi constatada em 1989, tendo sido introduzida possivelmente por intervenção humana (PEREIRA et al., 1989, ROCHA et al., 1993; ANDEBRHAN et al., 1999), sendo atribuída a ela a devastação da lavoura cacauera no Sul da Bahia no final do século passado. A vassoura-de-bruxa que já era um dos maiores entraves ao desenvolvimento do cultivo do cacauero na América do Sul, incluindo a região amazônica brasileira, ao ser introduzida na Bahia, causou sérios prejuízos à cacauicultura do estado, que utilizava, principalmente, variedades altamente suscetíveis (PEREIRA et al., 1989).

Atualmente essa doença é um ponto de estrangulamento para implantação de novas áreas de cultivo e para a competitividade da cacauicultura nacional no mercado internacional (SILVA, 1997).

Uma das conseqüências da doença para a sociedade regional foi o elevado índice de desemprego e êxodo rural, que afetou todos os segmentos da cadeia produtiva do cacau, particularmente os trabalhadores rurais e os pequenos produtores.

O fitopatógeno contribuiu também para grande índice de desmatamento na região com a eliminação em várias propriedades dos remanescentes da Mata Atlântica, sendo o cultivo de cacau substituído pela atividade madeireira que foi estimulada como alternativa para a então desempregada população de trabalhadores rurais, e como fonte de renda para os proprietários da terra, que antes eram cacauicultores (LUZ et al., 2006).

O fungo infecta vários tecidos meristemáticos da planta (caules, almofadas florais, flores e frutos), causando uma gama de sintomas, que varia de acordo com o órgão infectado e o seu estágio de desenvolvimento (SILVA et al., 2003), podendo até provocar a morte da planta, quando afetada por sucessivos surtos do patógeno associados a fatores abióticos (ANDEBRHAN, 1984; QUEIROZ et al., 2003). O crescimento hipertrófico dos meristemas vegetativos infectados, que se denominam “vassouras”, representa o sintoma mais característico da doença. As infecções nos frutos podem levar a grandes perdas na produção.

Diante dos impactos econômicos, sociais e ambientais causados pela vassoura-de-bruxa, se fez necessária à implementação de medidas eficientes para o controle da doença. O emprego de variedades resistentes e de alta produtividade, desenvolvidas em programas de melhoramento genético do cacauéiro é a alternativa mais recomendada para se manejar a vassoura-de-bruxa (PINTO; PIRES, 1998). Essa medida de controle é fundamental haja vista os controles químico e cultural terem se mostrado onerosos e ineficazes quando não executados rigorosamente de acordo com as recomendações técnicas da pesquisa, em se tratando de lavouras formadas por variedades de alta suscetibilidade e de baixa produtividade (PINTO; PIRES, 1998).

Uma das dificuldades encontradas no melhoramento genético do cacauéiro é a limitada fonte de resistência conhecida até o início das pesquisas com a doença na

Bahia. Os clones e cultivares conhecidos como resistentes eram quase todos descendentes do clone Scavina-6 (Sca 6), que foi selecionado no Peru e vem sendo utilizado como fonte de resistência à vassoura-de-bruxa desde 1940. No entanto, este clone, havia apresentado quebra de resistência à vassoura-de-bruxa em algumas regiões. Wheeler e Mepsted (1988) relatam a suplantação de resistência no Equador. Andebrhan et al. (1998) constataram quebra da resistência em Rondônia, na Amazônia. Em meados da primeira década deste século, descendentes deste clone, também começaram a apresentar susceptibilidade na Bahia, o que justifica a busca de novas fontes de resistência (PAIM et al., 2006).

Com o desenvolvimento de novos clones e variedades com resistência à vassoura-de-bruxa, há necessidade de avaliar os genótipos selecionados para resistência nos diferentes agrossistemas e determinar se isto também pode interferir na população do patógeno. Segundo Silva e Leite (1988) a região cacaueteira baiana é composta de doze agrossistemas (Almada, Ipiaú, Camacan, Valença, Canavieiras, Itamaraju, Ibicuí, Jiquiriça, Itagimirim, Porto Seguro, Caravelas e Medeiros Neto), além de outros dois: a zona do recôncavo, uma área relativamente mais recente de implantação do cacau, com características distintas dos solos das áreas tradicionais do Sul da Bahia e o vale do rio doce, um agrossistema considerado atípico para cacau, em razão do seu elevado déficit hídrico e temperatura relativamente baixa no inverno, resultando em uma lavoura de baixa produtividade. Mais recentemente o cacaueteiro começou a ser plantado no semi-árido baiano, que representa um novo pólo cacaueteiro na Bahia.

Aliado ao controle genético, na implementação do manejo integrado da doença, incluem-se o controle químico; o controle cultural, com uso de podas fitossanitárias e o controle biológico (OLIVEIRA; LUZ, 2005). A remoção de todos os tecidos infectados, recomendada por Sthael desde 1915, ainda é uma prática bastante adotada com o objetivo de reduzir a fonte de inóculo, dando ao material removido manejo adequado, através da queima, cobertura com folhas, e/ou aplicação de cal, com o objetivo de apressar a decomposição e de evitar a esporulação do fungo (LUZ et al., 2006) visando diminuir os danos causados por *M. perniciosus*. Contudo, a eficiência dessa prática depende de vários fatores, principalmente, do nível de infecção da planta (BASTOS,

1996). A poda só é efetiva quando realizada regularmente de forma extensiva. Segundo Luz et al. (1997) o número e a época de remoções são determinados em função das condições climáticas de cada região. Na Bahia, são necessárias pelo menos quatro remoções ao ano, realizadas normalmente, nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro. Embora seja eficaz em reduzir a fonte de inóculo, ocorre infecções em áreas onde foi realizado o controle cultural que são provenientes das fontes não removidas, como por exemplo, frutos mumificados ou vassouras que ficam no solo. Estas, na Bahia, em condições favoráveis, podem esporular ativamente (LUZ et al., 2006). Deve-se levar em consideração também a contribuição para a infecção nas áreas com remoção periódica de vassouras, do inóculo proveniente de outras áreas, onde o controle não foi feito. Isso tudo, torna menos eficiente o controle cultural, sendo necessária a aplicação de fungicida para minimizar as perdas (ANDEBRHAN; BASTOS, 1985; OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Desde 1915, foi recomendado por Sthael o uso do controle químico associado ao controle cultural. No entanto, o controle químico com fungicidas a base de cobre não protege os tecidos em crescimento ativo (OLIVEIRA, 2004a) e as aplicações visam principalmente proteger os frutos, mas necessitam ser realizadas na época certa e obedecendo rigorosamente doses, intervalos e a forma de aplicação adequada, evitando os períodos com chuvas intensas que podem facilmente lavar os fungicidas protetores. Em diversas pesquisas realizadas na região cacauieira da Bahia, constatou-se que o fungicida sistêmico tebuconazole (OLIVEIRA, 2004a) e outros do grupo estrubilurinas (OLIVEIRA, 2004b), com destaque para a azoxystrobina, apresentaram os melhores resultados para o controle da vassoura-de-bruxa tanto em viveiros quanto em campo (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Alternativamente, o controle biológico por meio de microorganismos antagônicos a *M. pernicioso* tem sido bastante utilizado, recebendo destaque o Tricovab, produto desenvolvido pela CEPLAC e formulado a partir do fungo *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schultheiss (COSTA; BASTOS, 2000), que parasita *M. pernicioso* impedindo a produção de basidiomas (BASTOS, 2000). Os dois fungos também competem no substrato por nutriente e espaço (BASTOS, 2000; HOYOS, 2008). Na Bahia, Bezerra et al. (2003), descobriram a existência do teleomorfo de *Trichoderma*

stromaticum - *Hypocrea stromatica*, sugerindo a possibilidade de recombinação sexual o que favorece a variabilidade genética da espécie. Souza et al., (2006) demonstraram que existem dois grupos genéticos distintos de *T. stromaticum*, conhecidos como grupo I e II, tendo Carvalho (2006), comprovado que não há diferença no comportamento biológico dos isolados dos grupos genéticos I e II. O controle biológico com *Trichoderma stromaticum* é hoje uma alternativa viável dentro do manejo integrado da vassoura-de-bruxa.

Hoje, compreende-se que a forma mais eficiente e econômica de controle da vassoura-de-bruxa é aliar o uso de material resistente a outros métodos de controle, químico, biológico e cultural, no chamado programa de manejo integrado da doença. Quanto ao controle genético, foram distribuídos aos produtores 39 Clones de cacaueteiro com níveis diferentes de resistência à doença, sendo 20 clones auto-compatíveis e 19 auto-incompatíveis. Este material genético foi sendo liberado gradativamente, conforme relação abaixo:

1995 – TSH 516, 565, 1188, EET 397 e Cepec 42;

1998 – TSA 654, 656, 792 e TSH 774;

2001 – Cepec 2001 (VB – 900);

2002 – Cepec 2002 (VB-1151), 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 e 2011;

2003 – CCN 10, 51, CP 06, 38, 39, 40, 49, 53, PH 16, VB 276, 515, 679

2004 – RVID 08, Lcteen 37A, SJ 02, e PS 13.19

2006 – Ipiranga 1, CCN 16 e PH 09

No entanto, o programa de melhoramento genético do cacaueteiro segue em busca de obter o maior número possível de fontes de resistência a VB para combinar através de cruzamentos em primeira e segunda geração, gerando material genético com genes de resistência de varias fontes que apresentam uma resistência mais estável, durável e efetiva, dificultando o aumento da população e a evolução do fungo sobre tais materiais (PINTO; PIRES, 1998; PIRES, 2003).

Diversos trabalhos já foram também realizados visando associar marcadores moleculares para acelerar o processo de melhoramento para resistência. Dantas Neto et al. (2005) realizou estudos em plantas com oito anos de idade, visando identificar

genes de resistência e (Quantitative trait loci) QTLs, dissimilares dos encontrados no clone Scavina-6, em populações derivadas do cruzamento entre os clones SIC-864 e CCN-51. Faleiro et al (2006), Santos et al (2007) identificaram novos QTL relacionados a resistência à vassoura-de-bruxa.

Populações estão sendo desenvolvidas e testadas gerando a possibilidade de futuros materiais a serem distribuídos que apresentem além do caráter resistência, genes para outras características agronomicamente desejáveis (MONTEIRO et al, 2006). Através de técnicas de RAPD ("random amplified polymorphic DNA"), Yamada et al. (2002) demonstraram diversidade genética em estudo com 27 acessos de cacauero da série Cepec. Leal et al. (2008) utilizando também técnicas de RAPD encontrou elevada diversidade genética entre as seleções de cacaueros em 17 fazendas de sete municípios do Sul da Bahia. Paim et al. (2006) demonstraram o alto nível de resistência de progênies da série CAB (Cacau da Amazônia Brasileira) na Bahia e que estas são distintas geneticamente de Sca 6 (PAIM, 2005). Portanto, há variabilidade de resistência à vassoura-de-bruxa tanto nos materiais de BAG como nas plantações de cacau no Sul da Bahia.

2.2. Caracterização do fitopatógeno

O agente causador da vassoura-de-bruxa do cacauero foi classificado inicialmente por Stahel (1915) como *Marasmius perniciosus*. Em 1942, foi transferido para o gênero *Crinipellis* por Singer e, na revisão da sistemática do fungo, foi mantido o binômio *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (SINGER, 1942). Por fim, em 2005, foi transferido para o gênero *Moniliophthora* por Aime e Phillips-Mora (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005) com base em características moleculares.

O fungo *M. perniciosa* pertence à classe dos Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Marasmiaceae (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), que é constituída de espécies com basidiomas pileados, lignícolas ou habitantes da serrapilheira, os quais são capazes de recuperarem sua morfologia após o secamento quando são umedecidos (ALEXOPOULOS et al., 1996; EVANS, 1980).

Este fungo, o principal patógeno do cacau na Bahia atualmente, é capaz de colonizar, além do cacau, várias outras plantas hospedeiras, onde pode se adaptar às novas condições, contribuindo, dessa forma, para o aumento da variabilidade genética desse microrganismo (LUZ et al., 2006).

Os basidiósporos se constituem as únicas estruturas, encontradas em condições de campo, capazes de infectar o cacau (PURDY; SCHMIDT, 1996) e são produzidos na superfície de lamelas situadas na parte inferior (himenóforo) do píleo ou chapéu dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, de onde são liberados ativamente (ejetados). Os basidiocarpos apresentam tonalidades avermelhadas a purpúreas, cujo píleo varia 5 - 30 mm de diâmetro radialmente sulcados, convexos a deprimidos no centro; himenóforo esbranquiçado com cerca de 15 lamelas correspondentes aos sulcos do píleo; o estipe é oco de cor branco cremoso e mede de 5 a 10 mm de altura, sua base é engrossada e de coloração parda. Os basídios produzem quatro basidiósporos uninucleados e o himênio é típico da família Marasmiaceae (SINGER, 1942; BAKER; HOLLIDAY, 1957; HOLLIDAY, 1970). Após a liberação, que ocorre geralmente entre as 18:00 e 6:00 hs, os basidiósporos são levados pelas correntes aéreas (disseminação) necessitando serem depositados rapidamente sobre os locais (pontos de infecção) do hospedeiro. Nestes locais, germinam e penetram. Isto tem que ocorrer rapidamente após a liberação, uma vez que, em uma hora de exposição ao ar livre, submetidos à radiação solar e dessecação perdem a viabilidade. Por outro lado, o micélio saprotrófico do fungo pode sobreviver por vários anos, no interior dos tecidos infectados como vassouras vegetativas, frutos e folhas, que ao serem transportados indevidamente, quando expostos aos efeitos alternados de chuva e sol, podem produzir basidiomas favorecendo a infecção pelo fungo (BASTOS, 1990; NIELLA et al., 1999). *Moniliophthora perniciosa* possui quatro biótipos, sendo o biótipo C específico para o cacau, possuindo dois patótipos (A e B). O A está presente na Bolívia, Colômbia e Equador, este é considerado mais virulento e o B, com uma menor virulência está presente no Brasil, Trindade-Tobago e Venezuela (MOTILAL et. al., 2003).

O *M. perniciosa* é um fungo hemibiotrófico com dois tipos de micélio: em tecidos verdes, o micélio é espesso com 5-8µm, biotrófico ou parasítico e sem a formação de

grampos de conexão, crescendo intercelularmente, enquanto que em tecidos secos (vassouras secas), o micélio é saprotrófico ou necrotrófico, cresce inter e intracelularmente, sendo menos espesso (1,5-5 μ m), apresentando grampos de conexão (EVANS; BASTOS, 1979; EVANS., 1980).

Quando da descarga dos basidiomas, a quantidade de basidiósporos no ar cai sensivelmente a distâncias superiores a 300 m da fonte de inóculo, embora possa ocorrer alguma deposição de esporos e infecções em plantas situadas a alguns quilômetros da fonte de inóculo quando as condições atmosféricas são favoráveis à disseminação (LUZ et al., 1997). No entanto, próximo a fonte, o risco de infecção é grande, principalmente se houver tecidos em desenvolvimento na planta, o que normalmente se dá (LUZ et al., 2006).

Para que haja infecção é preciso que os basidiósporos sejam depositados sobre regiões meristemáticas (gemas vegetativas, florais e/ou frutos em formação até os 3 meses de idade), onde penetram diretamente ou através dos estômatos. Nas gemas dormentes a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos cancrios ou pontos necróticos que entram em atividade quando a planta reinicia a brotação. Essas infecções têm importância epidemiológica, pois permitem a sobrevivência do fungo entre os períodos sucessivos de crescimento (lançamentos foliares) e de frutificação (safras) da planta. Nos tecidos infectados ocorre uma intensa multiplicação (hipertrofia) que dura algumas semanas e, em seguida as células morrem ocorrendo a necrose generalizada dos tecidos (SILVA et al., 2002). Nos tecidos necrosados (frutos e vassouras secas), após um período de dormência durante o qual o micélio saprotrófico cresce e acumula energia, se dá o aparecimento dos basidiomas ou frutificações do patógeno. Este ciclo de basidioma a basidioma ocorre uma vez por ano na Amazônia, mas, na Bahia pode ocorrer até duas vezes: uma na safra temporã (1º semestre) e outro na safra principal (2º semestre) (LUZ et al., 2006). A vassoura-de-bruxa é uma doença monocíclica, pois os tecidos infectados não produzem esporos capazes de iniciar novas infecções na mesma estação (safra). Embora esporos possam estar sendo liberados durante toda a estação (LUZ et al., 1994), estes provêm de basidiomas desenvolvidos em tecidos infectados em estações anteriores (LUZ et al., 2006). Os períodos de duração das diferentes fases do ciclo vital de *M. pernicioso* foram

estudados na Bahia por LUZ et al. (1994), sendo período de incubação (4 semanas em média), período entre o aparecimento de vassouras verdes e o seu secamento (7,5 semanas em média), período de dormência das vassouras secas (13 semanas, a depender do tamanho e localização da vassoura), período de produção de basidiomas em frutos mumificado (24 meses); e período de liberação de esporos (na Bahia ocorre o ano todo, com picos maiores nos meses mais frios). Um basidioma se mantém ativo durante cinco dias em média, liberando milhões de esporos nas primeiras horas do dia durante sua vida útil (LUZ et al., 1997).

2.3. Interação planta-patógeno, variabilidade genética

Estudar a interação planta-patógeno em qualquer patossistema tem grande importância para o entendimento dos processos básicos desencadeados, provendo subsídios para o manejo das enfermidades (AGRIOS, 1997).

A interação patógeno x hospedeiro é determinada geneticamente por meio dos mecanismos de ataque do patógeno e de defesa da planta. Porém, algumas alterações podem ocorrer nesta interação devido a fatores ambientais (BOCCHESI et al., 2003). Para colonizar com sucesso um hospedeiro, o patógeno deve desenvolver a habilidade de superar as barreiras de defesa elaboradas pela planta para prevenir a infecção. Este processo de co-evolução é extremamente dinâmico e tem resultado na utilização de estratégias de infecção altamente sofisticadas e específicas (LEACH et al., 2001, OKU, 1992).

Cerca de 300.000 espécies de plantas são atacadas por fungos patogênicos (KNOGGE, 1996). A evolução destes fungos para adquirir um alto grau de especificidade voltada ao ataque de uma única espécie ou para infectar uma ampla gama de espécies vegetais pode refletir os diferentes níveis de especialização observados nas interações plantas-fungos existentes. Assim, os patógenos possuem graus variáveis de especificidade para diferentes espécies de plantas. O conhecimento da variabilidade genética de um fitopatógeno é de grande importância para estudos

relacionados tanto à patogenicidade como ao melhoramento genético do cacauero visando a resistência à vassoura-de-bruxa.

Pesquisas estão sendo realizadas visando selecionar e desenvolver variedades que comportam um número maior de genes ligados à resistência visando obter uma resistência mais estável, durável e efetiva, o que deverá dificultar o aumento de população especializada no fungo e conseqüentemente a sua evolução sobre tais materiais (PINTO; PIRES, 1998). A comprovação da existência de variabilidade na população do fungo é muito importante para o programa de melhoramento.

Wheler e Mepsted (1988) demonstraram evidências experimentais da existência de variabilidade genética em *C. pernicioso* do cacauero, proveniente de diferentes países e determinaram a ocorrência de dois grupos de patótipos: o grupo de isolados do Equador, Colômbia e Bolívia e o grupo do Brasil, Venezuela e Trinidad-Tobago. Variabilidade genética de isolados de *M. pernicioso* no Brasil foi observada em cacaueros de várias regiões da Amazônia Brasileira por Andebrhan e Almeida (1984), que identificaram em Rondônia, dois grupos de patótipos: o grupo de isolados de Ouro-Preto d'Oeste e Jaru e o grupo de Cacoal e Ariquemes. No Pará não foram encontradas diferenças entre os isolados testados.

Em pesquisas realizadas na CEPLAC-Cepec utilizando marcadores de DNA, observou-se que isolados do fungo em descendentes de Scavina diferiam geneticamente daqueles amostrados em genótipos suscetíveis. Os isolados do fungo obtidos de outros genótipos resistentes (CCN 10, MOQ 216, Playa Alta 4) também foram diferentes daqueles obtidos dos genótipos suscetíveis (PIRES, 2003).

Foram observadas diferenças genéticas em *M. pernicioso* nas seguintes condições: i) entre países e entre regiões dentro de países; ii) entre municípios dentro da região cacauera da Bahia; iii) entre fazendas de um mesmo município; iv) entre partes de uma mesma planta (frutos, almofadas, gemas vegetativas) e v) entre anos de observação de um mesmo grupo de plantas vi) e entre genótipos de cacauero (MOREIRA, 2006; GRAMACHO et al., 2002; GRAMACHO et al., 2005; GRAMACHO et al., 2005b; PLOETZ et al., 2005; BRAZ et al., 2008., JUCA, 2009).

Embora se saiba que existe variabilidade do patógeno na região (GRAMACHO et al., 2008), não é possível ainda distinguir se as populações do fungo se distribuem nos

diferentes agrossistemas ou se acham localizadas em função de variações climáticas ou do material genético cultivado. O conhecimento desta variabilidade e da sua implicação na patogenicidade é fundamental para o programa de melhoramento genético.

Nas coleções de germoplasma e em estudos comparativos entre progênes de materiais selecionados na Amazônia brasileira, foram observados genótipos com níveis de resistência significativamente superiores ao de Scavina 6 e descendentes, ou que não tiveram alteração comportamental com a mudança dos tipos predominantes do patógeno (PIRES, 2003; PAIM et al., 2006). Esses genótipos portam diferentes genes de resistência.

2.4. Agrossistemas

Segundo Silva e Leite (1988), dentre os 14 agrossistemas que compõem a região cacauera da Bahia, Almada, Ipiaú e Camacã se constituem em agrossistemas cacaueros por excelência, em razão do percentual de produção e de áreas plantadas com cacau.

O agrossistema **Almada** é considerado o principal agrossistema cacauero, abrangendo 12 municípios: Ilhéus, Itabuna, Uruçuca, Itajuípe, Coaraci, Lomanto Júnior, Almadina, Juçari, Itapé, Buerarema, Ibicaraí e Floresta Azul. Esta unidade abrange a superfície de 1.853,0 Km² ou 185.300 ha. As condições edafoclimáticas deste agrossistema são excepcionais para o cultivo do cacau. O clima é do tipo *Af* de Köppen, quente e úmido e sem estação seca. A média de precipitação anual é superior a 1.300 mm/ano.

O agrossistema **Ipiaú** abrange 13 municípios: Ipiaú, Gandú, Itamari, Jitauna, Aiquara, Ibirataia, Barra do Rocha, Ubatã, Ibirapitanga, Gongogí, Aureliano Leal, Itagiba e Jequié, totalizando 1.792,0 Km² ou 1.792 ha. Grande parte está compreendida numa faixa climática de transição onde predomina o tipo Am, caracterizado por uma precipitação média anual variável de 1.100 mm a 1.200 mm e

por não apresentar estação seca definida. Possui duas situações contrastantes: grandes plantações de cacau em Ipiau/Ibirataia e pequenas lavouras em Itamariti.

O agrossistema **Camacan** compreende cinco municípios: Camacan, Santa Luzia, Arataca, Mascote e Pau Brasil, todos eles com tradição no plantio de cacau, abrangendo 1.074,5 Km² ou 1.074,5 ha. Existem zonas predominantemente de relevo montanhoso, com altitudes médias variáveis de 100 a mais de 400 m, com solos providos de “matações”.

O estudo do comportamento de inóculo proveniente de municípios integrantes destes três agrossistemas em relação a progênie de três clones de cacauzeiro foi o objetivo do presente estudo, visando observar se existe variabilidade do patógeno em relação à localização geográfica dentro da região cacauzeira baiana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia Molecular, nas casas de vegetação e em outras dependências da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) na sede da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Ilhéus, BA.

3.1. Material genético

Progênes de três clones de cacaueiros (ICS 1, SIC 23 e Sca 6) provenientes das introduções do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), em Ilhéus, BA, foram testadas quanto a resistência à vassoura-de-bruxa, no período 2008 a 2009.

As progênes dos clones ICS 1 e SIC 23 foram incluídas como padrões de suscetibilidade e as do clone Sca 6, como padrão de resistência.

As sementes obtidas de frutos de polinização livre do BAG/CEPEC foram pré-germinadas por 48 horas em serragem esterilizada umedecida. Após esse período, foram plantadas em tubetes plásticos contendo aproximadamente 300g de terriço esterilizado com brometo de metila. As plântulas foram mantidas em condições de casa de vegetação, com irrigação por 15 minutos, três vezes ao dia (às 8, 12 e 16h), por três a quatro semanas, antecedendo a inoculação.

3.2. Obtenção e manutenção dos inóculos utilizados nestes experimentos

Foram utilizados nove inóculos de *M. perniciosa*, provenientes de vassouras secas de cacauzeiros coletadas em três agrossistemas da região cacauzeira baiana (Almada, Camacan e Ipiaú). No agrossistema Almada, as coletas foram realizadas nos municípios de Ilhéus, Floresta Azul e Jussari; no agrossistema Camacan, nos municípios de Camacan, Santa Luzia e Pau Brasil; no agrossistema Ipiaú, os municípios foram: Ipiaú, Jitaúna e Itagibá.

Os inóculos foram obtidos a partir de vassouras coletadas em cada localidade que foram trazidas para o laboratório, desinfestadas com lavagens rápidas em hipoclorito de sódio a 0,1% e penduradas em arames esticados horizontalmente sob um telado (vassoureiro), e então submetidas a um regime diário de 8 h de molhamento e 16 h de secamento.

Após o período de dormência das vassouras, teve início a produção de basidiomas. Os basidiomas maduros foram retirados das vassouras, lavados seqüencialmente em água destilada, em solução de estreptomicina a 1%, e mais duas vezes em água destilada. Em seguida, foram secados em folhas de papel absorvente. Dos basidiomas enxutos, retirou-se os píleos, com auxílio de escalpelo e pinça, em seguida, os píleos foram fixados com vaselina pastosa (Silinol SG) em tampas de vidro, com o himênio voltado para baixo, sobre um béquer contendo uma solução de glicerina a 16%, e sob agitação constante, de modo que, ao serem liberados, os basidiósporos caíam sobre a solução. A coleta de basidiósporos foi feita por um período de 20 h. Os cálculos das concentrações de basidiósporos nas suspensões obtidas foram realizados através de um contador de esporos ou células (Coulter counter). As suspensões de basidiósporos foram então estocadas em nitrogênio líquido, acondicionadas em tubos criogênicos de 2 mL, até o momento de serem utilizadas, conforme metodologia descrita por Dickstein et al. (1987).

Antes de estocar, uma alíquota de 25 µL de cada uma das suspensões de basidiósporo obtidas foi retirada e espalhada com bastão de vidro sobre a superfície do meio ágar-água a 2%, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, para avaliar a germinação dos espóros. Decorridas seis horas de incubação a 25°C, as placas foram

retiradas e procedeu-se a leitura da percentagem de basidiósporos germinados no momento da estocagem com auxílio de um microscópio ótico procedia-se à leitura e determinava-se a porcentagem de basidiósporos germinados tanto no momento da estocagem como também vinte e quatro horas antes da inoculação, uma nova alíquota de 25 mL foi coletada das suspensões estocadas, procedendo-se igualmente o teste de germinação e determinação da variabilidade do inóculo.

3.3. Preparo dos inóculos para a inoculação

No dia da inoculação os inóculos foram retirados do nitrogênio líquido e diluídos glicerol na quantidade descrita por Dickstein et al (1987) A concentração dos inóculos foi ajustada para 2×10^5 basidiósporos/mL. Somente suspensões de inóculo que apresentaram acima de 80% de germinação foram usadas para inoculação. Além dos nove inóculos, anteriormente relacionados mais outros três foram utilizados, sendo estes oriundos da mistura daqueles obtidos dentro de cada agrossistema, ou seja, uma mistura do Almada (mistura A), uma do Ipiaú (mistura B) e uma do Camacan (mistura C). Assim sendo, doze inóculos foram utilizados para inoculação das plântulas das três progênies. Estas misturas consistiram de partes iguais de 5 mL dos inóculos de cada município, e foram realizadas no momento da inoculação e bem homogeneizadas. Assim, 112 plântulas de cada progênie foram inoculadas para cada um dos treze tratamentos, ou seja, doze inóculos mais o tratamento testemunha (não inoculado).

3.4. Inoculação

Um dia antes da inoculação, as plântulas de cacauero mantidas em casa de vegetação tiveram o tamanho das folhas reduzidas em 2/3, para acelerar o crescimento apical e então, foram levadas para casa-de-vegetação climatizada. As plântulas de cada tratamento foram inoculadas com uma gota de 20 μ L da suspensão do inóculo específico, na concentração de 2×10^5 basidiósporos/mL, depositada na gema apical das

plântulas. As plântulas utilizadas como testemunhas receberam em lugar da suspensão de inoculo apenas uma gota de agar-água a 0,2%. Após a inoculação, todas as plântulas permaneceram por 24 h em câmara úmida, com temperatura em torno de 25°C e UR de 100%, sendo então transferidas para a casa de vegetação climatizada onde lá permaneceram por 30 dias, submetidas à irrigação diária por um período de 20 minutos às 9:00 e às 14:00h e nebulização às 12:00h. Após os 30 dias da inoculação foram transferidas para casa-de-vegetação sob as condições normais do ambiente.

3.5. Avaliação

Foram avaliados nas progênies os sintomas apresentados pelas plantas individualmente aos 30 e 60 dias, após a inoculação, observando-se o tipo de vassoura formada, a quantidade de vassouras axilares, o diâmetro e a altura das vassouras quando o sintoma principal era vassoura terminal. Para análise dos dados, duas variáveis foram utilizadas:

SINT= percentagem de plantas apresentando qualquer sintoma da doença, seja, vassouras terminais, axilares, cotiledonares e secas, intumescimento do caule, do hipocótilo, dos pecíolos e dos pulvinos, cancro, superbrotamento ou hipertrofia (Figura 1).

ID= índice de doença, calculado pela seguinte fórmula: $ID = VT + VA + (0,5 * CVT) + NVA$, em que: VT= número de vassouras terminais; VA= número de vassouras axilares; CVT= comprimento da vassoura terminal; NVA= número de vassouras axilares maiores que 1cm.

A variável SINT é, portanto, considerada uma variável discreta binária, em que os valores 0 e 1 representam ausência e presença de sintomas, respectivamente. Os dados foram analisados considerando presença e ausência de sintomas como medida de incidência a doença (SINT) e a variável ID como medida de severidade da doença.



Figura 1: Sintomas da doença vassoura-de-bruxa. A - Vassoura terminal; B - Vassoura axilar; C - Inchamento de caule; D - Vassoura seca.

3.6. Delineamento e análises dos dados

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 28 plântulas cada, totalizando 112 plântulas por progênie, por tratamento (12 inóculos + o tratamento testemunha) em esquema fatorial (3 x 13) – totalizando 4.368 plântulas por experimento (1456 plântulas de cada genótipo). Foram realizados dois experimentos, um em 18/06/2008 e outro em 20/12/2008, ambos conduzidos em igualdade de condições.

Os procedimentos estatísticos, incluindo as análises de variância, foram realizados com o programa SAS (1988).

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando modelo linear considerando todos os fatores como fixos, em esquema hierárquico ou aninhado ("nested") (NETER *et al.*, 1990). Sendo os inóculos aninhados dentro do município de origem. O objetivo foi estimar os componentes de variância (quais) e verificar se a interação inóculo (município) x progênie era significativa. Para tal, ajustou-se o modelo $Y_{ijk(SINT, ID)} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)}(\alpha) + e_{ijk}$ (μ = média geral, α_i = efeito de agrossistema, $\beta_{j(i)}$ = efeito de inóculos aninhados dentro de agrossistema e e_{ijk} = erro experimental), com o procedimento PROC GLM, opção ANOVA, do programa SAS.

Os contrastes entre as médias das misturas de inóculo e a média aritmética dos inóculos por agrossistema e por progênie foram avaliados pelo Teste F.

4. RESULTADOS

Os resultados foram analisados considerando a presença de qualquer sintoma da doença como variável de incidência (SINT) e o índice de doença (ID) como de severidade. Como não houve efeito significativo para experimento, considerando as duas épocas em que o experimento foi repetido, os dados foram analisados em conjunto.

Na análise de variância (ANOVA), foram encontrados valores de F significativos para: (i) progênies em relação à incidência e severidade da vassoura-de-bruxa; (ii) os inóculos de diferentes agrossistemas utilizados; e (iii) entre inóculos dentro de cada agrossistema (Tabela 1). Observou-se também efeito significativo da interação entre progênies e agrossistemas. Resultados similares foram obtidos para as duas variáveis SINT e ID.

Tabela 1. Análise de variância dos dados para incidência (SINT) e severidade (ID) de doença.

Fatores	SINT				ID			
	GL*	SQM	F	P>F	GL*	SQM	F	P>F
agro	2	0,70	19,9	<.0001	2	8,03	21,24	<0.0001
ino (agro)	6	0,22	6,16	<.0001	6	2,16	5,71	<0.0001
prog	2	1,00	28,21	<.0001	2	4,04	10,68	<0.0001
agro*prog	4	0,28	7,91	<.0001	4	1,76	4,66	0,0013
ino*prog (agro)	12	0,04	1,13	0,3352	12	0,39	1,03	0,4212

agro= agrossistema de origem do inóculo= Almada, Camacan e Ipiaú; ino= inóculos oriundos dos diferentes municípios pertencentes aos agrossistemas= Ilhéus, Floresta Azul, Jussari, Camacan, Santa Luzia, Pau Brasil, Ipiaú, Jitaúna, Itagibá; prog= progênies com diferentes níveis de suscetibilidade= Sca 6 considerada resistente, ICS 1 e SIC 23 consideradas suscetíveis. SINT= porcentagem de plantas com Sintomas de vassoura-de-bruxa nas progênies inoculadas; ID = índice de doença de vassoura-de-bruxa. calculada pela seguinte formula: $ID = VT + VA (0,5 * CVT) + NVA$; VT= número de vassoura terminal; VA= número de vassoura axilar; CVT= comprimento da vassoura terminal; NVA= número de vassouras axilares maiores que 1cm.

O agrossistema Ipiaú foi o que apresentou maior índice de doença e severidade, o efeito de agrossistema pode ser observado na (Figura 2). As médias de porcentagem de sintomas por agrossistemas variaram de 17% em Camacan a 37% em Ipiaú (Figura 2A) e o índice médio de doença variou de 0,46, em Camacan, a 1,05 em Ipiaú (Figura 2B). O inóculo obtido do agrossistema Ipiaú foi mais agressivo que os dos demais agrossistemas, diferindo estatisticamente dos mesmos. Entretanto não houve diferença significativa entre as médias dos inóculos provenientes dos agrossistemas Almada e Camacan para ambas as variáveis. Portanto, houve diferença tanto na incidência como na severidade dos inóculos de *M. perniciosa* provenientes de diferentes agrossistemas.

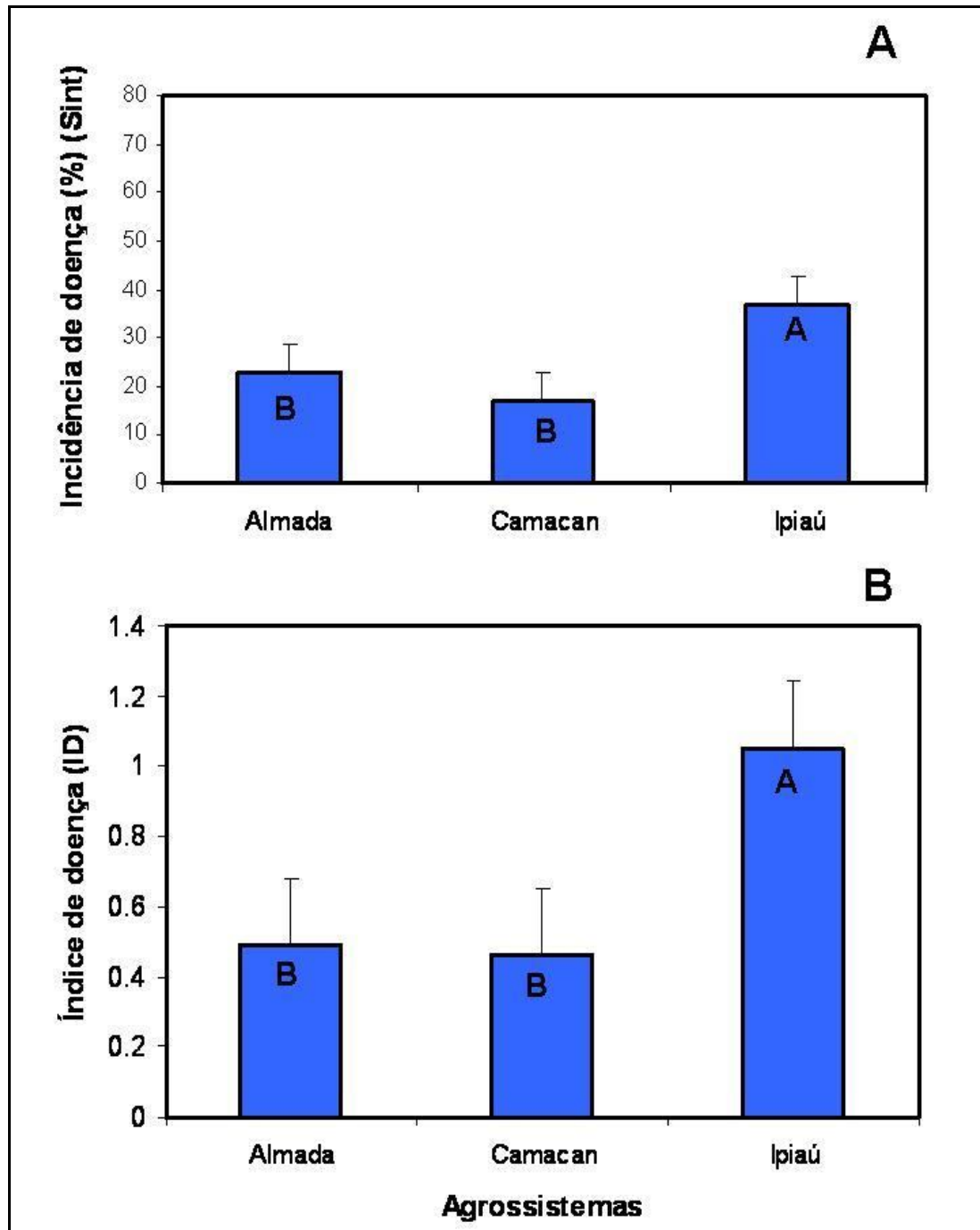


Figura 2. Porcentagem média de incidência de vassoura-de-bruxa (A) e valores médios do índice de doença (B) apresentado pelas plântulas de progênes de cacauero inoculadas com basidiósporos obtidos de vassouras provenientes de três agrossistemas, Almada, Camacan e Ipiáú.

Para o efeito de inóculo, ou seja, da variação entre os municípios de onde as vassouras foram obtidas, sem diferenciar progênies, observou-se variação no comportamento dos mesmos com as médias de incidência de doença variando de 11% (Pau Brasil) a 51% (Ipiaú) e o índice de doença de 0,28 (Pau Brasil) a 1,54 (Ipiaú) (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagens médias de infecção e médias do índice de doença provocados em plântulas de cacaueteiro por inóculos provenientes de nove municípios da região cacaueteira.

Municípios (Inóculos)	SINT (%)	ID
Ipiaú	51 A	1,54 A
Itagibá	35 AB	0,96 B
Ilhéus	30 BC	0,67 BC
Santa Luzia	25 BCD	0,69 BC
Jitaúna	24 BCD	0,66 BC
Jussari	22 BCD	0,37 C
Floresta Azul	18 BCD	0,41 BC
Camacan	17CD	0,42 BC
Pau Brasil	11 D	0,28 C

Médias seguidas pela mesma letra em colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

O inóculo proveniente de Ipiaú causou maior incidência e severidade de vassoura-de-bruxa, seguido do inóculo de Itagibá, ambos pertencentes ao agrossistema Ipiaú. Podemos considerar também um segundo grupo formado pelos isolados de Ilhéus, Floresta Azul, Jussari, Jitaúna e Santa Luzia, cujas porcentagens de plantas com sintomas variaram de 18 a 30%. Os inóculos de Camacan e Pau Brasil ocasionaram as menores porcentagens de plantas com sintomas, que oscilaram entre 17% (Camacan) e 11% (Pau Brasil). Para a variável índice de doença o grupo intermediário foi formado pelos inóculos provenientes de cinco municípios: Ilhéus, Floresta Azul, Jitaúna, Camacan e Santa Luzia, com as médias de ID variando de 0,41 (Floresta Azul) a 0,69 (Santa Luzia). O grupo com menores valores médios de ID foi formado por inóculos de Pau Brasil (0,28) e Jussari (0,37). De modo geral, considerando os resultados obtidos para as duas variáveis, pode-se observar que o inóculo de Ipiaú foi o mais agressivo e o de Pau Brasil o menos agressivo.

Analisando em seguida o efeito de progênies e comparando as médias obtidas para cada uma delas pelo teste de Tukey ($P > 0,001$) foi possível a distinção entre as mesmas. Para a variável SINT formaram-se dois grupos: o grupo 1, com maior porcentagem de sintomas, incluiu a progênie ICS1 (39% de sintomas) e o grupo 2, formado pelas progênies Sca 6 e SIC 23 com médias de incidência de doença de 16 e 22%, respectivamente (Figura 3A). Para a variável ID, três grupos foram formados. No grupo 1 ficou a progênie de ICS 1, no grupo 2, a de SIC 23, que se comportou de maneira intermediária, não diferindo nem de ICS 1 nem de Sca 6 e, no terceiro grupo, a progênie Sca 6 com os mais baixos valores de ID. Esta variável, portanto, diferenciou melhor as progênies, justamente por ser usada como medida de severidade (Figura 3B).

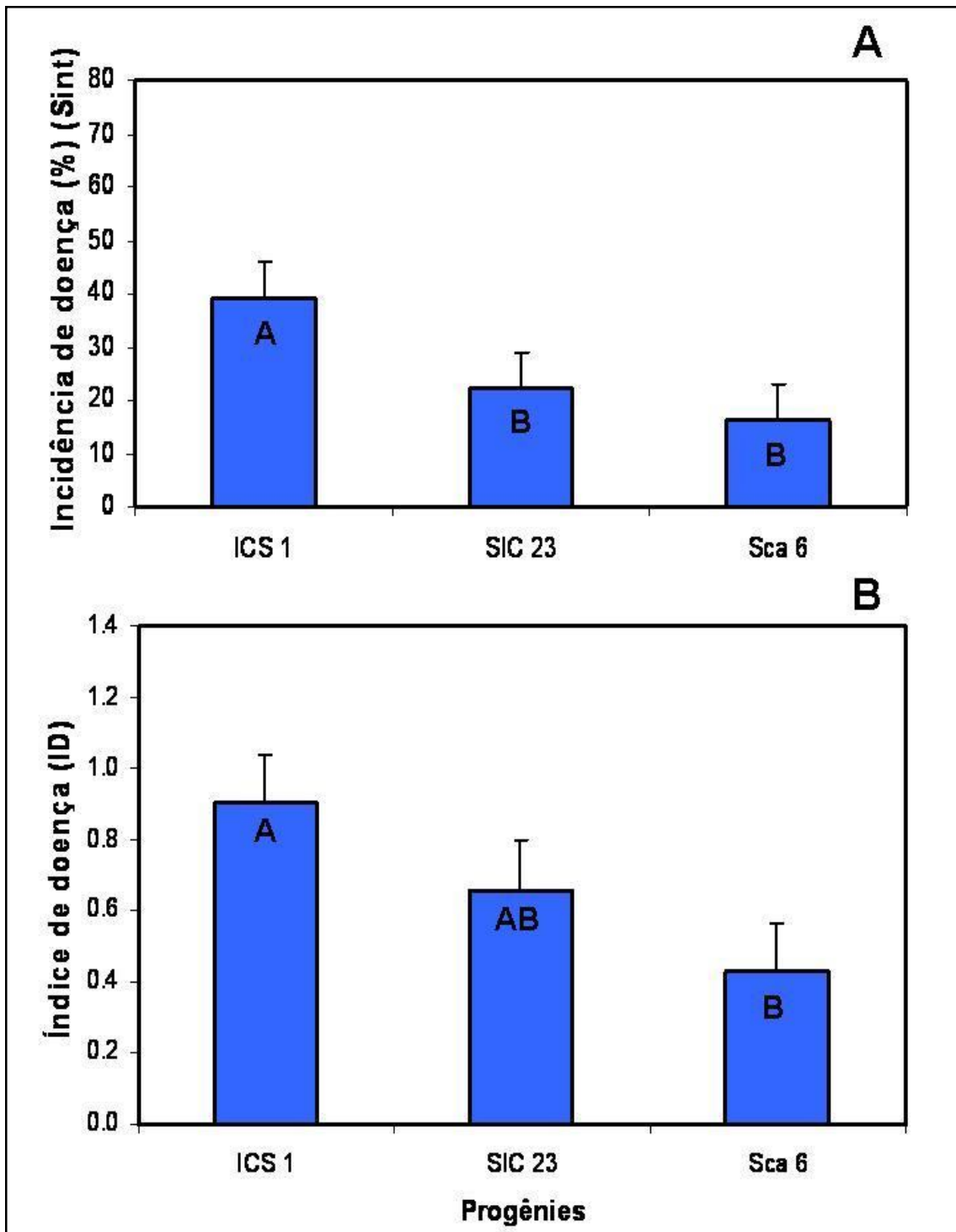


Figura 3. Porcentagem média de incidência de vassoura-de-bruxa (A) e valores médios do índice de doença (B) apresentados pelas plântulas das progênies dos clones de cacauero ICS 1, SIC 23 e Sca 6.

Considerando a interação progênie x agrossistema, observou-se que os inóculos dos agrossistemas Almada e Ipiaú foram significativamente mais patogênicos à

progênie ICS 1 do que o inóculo de Camacan, de acordo com as duas variáveis analisadas (Figura 4).

Com relação à progênie de Sca 6, o inóculo de Ipiaú causou maior porcentagem de infecção (22%) e mais alto índice de doença (0,65) do que o inóculo do agrossistema Almada que apresentou (11%) de infecção e (0,20) índice de doença, no entanto, não diferiu significativamente do de Camacan com (15%) de infecção e (0,44) índice de doença, que também não diferiu, em relação as duas variáveis, do inóculo do agrossistema Almada (Figura 5).

Para a progênie de SIC 23, o inóculo de Ipiaú foi o que apresentou as médias mais altas para SINT e ID, diferindo estatisticamente dos inóculos dos demais agrossistemas que tiveram comportamento semelhante (Figura 6). É importante ressaltar neste conjunto de dados (Figuras 4, 5 e 6) que o inóculo de Ipiaú foi o mais agressivo a todas as progênies.

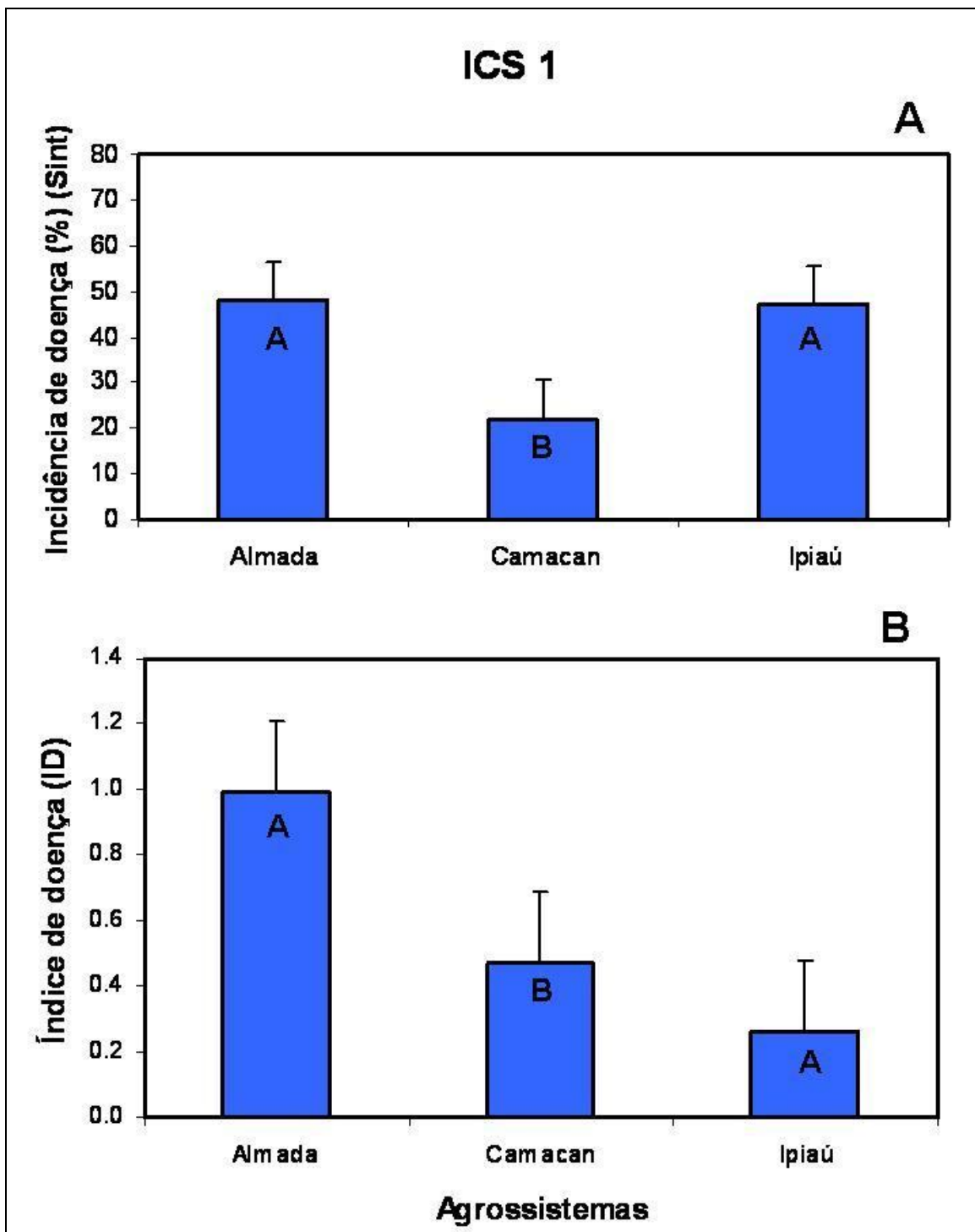


Figura 4. Efeito dos inóculos de *M. pernicioso* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de ICS 1 para as variáveis: A- porcentagem média de infecção (SINT) e B- médias de índice de doença (ID).

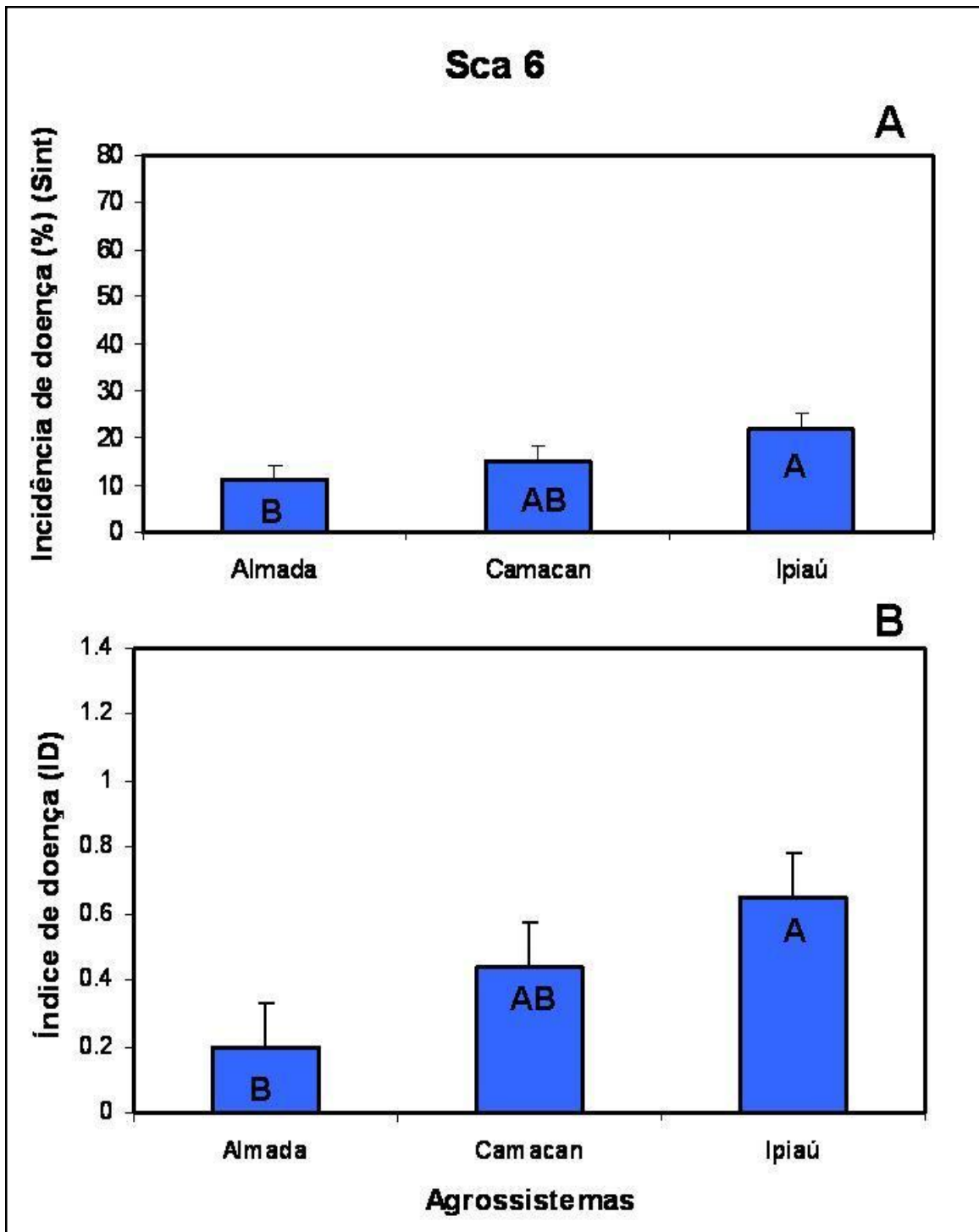


Figura 5. Efeito dos inóculos de *M. pernicioso* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de Sca 6 para as variáveis: A- porcentagem média de infecção (SINT) e B- Médias de índice de doença (ID).

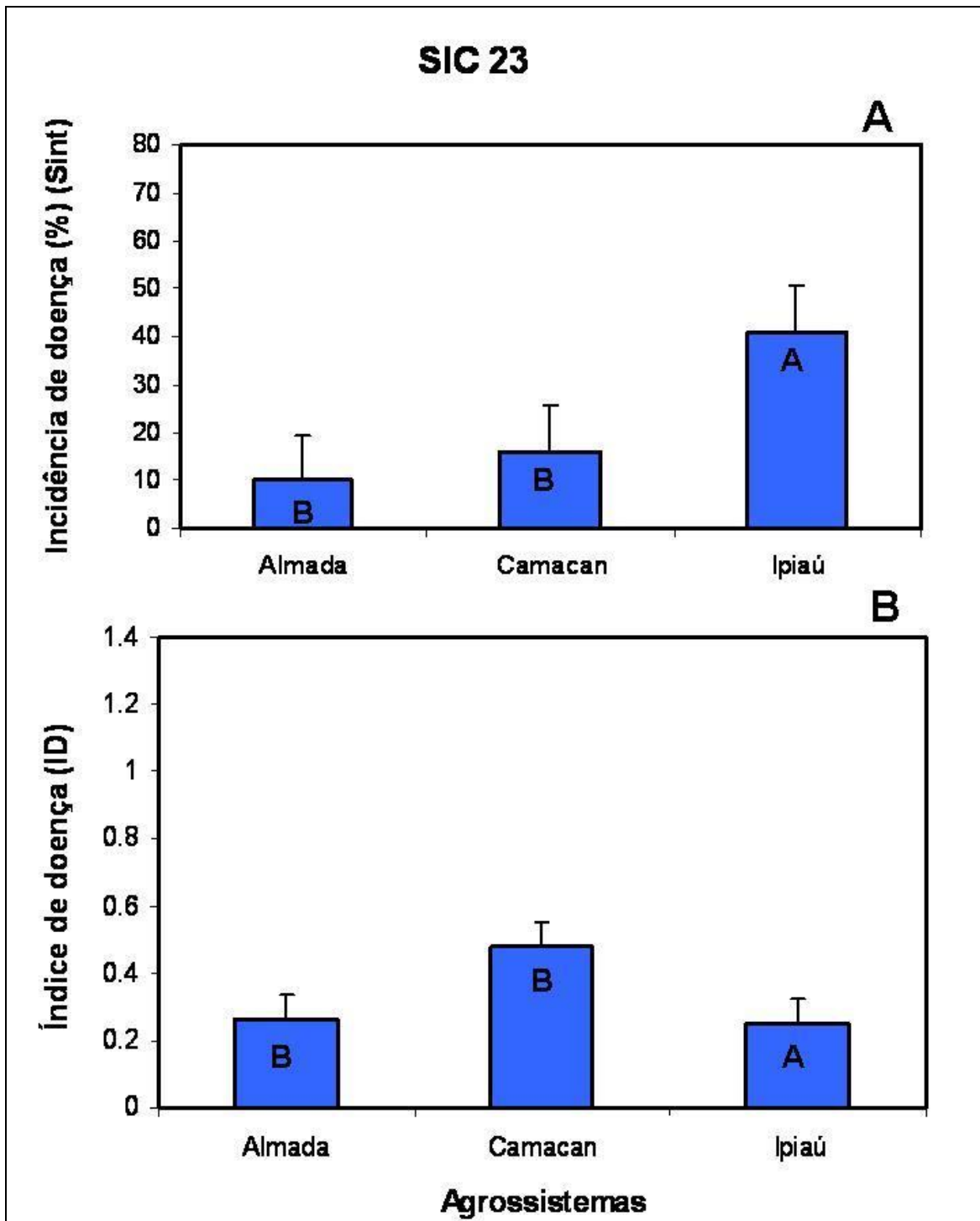


Figura 6. Efeito dos inóculos de *M. pernicioso* obtidos em diferentes agrossistemas na reação de plântulas da progênie de SIC 23 para as variáveis: A- porcentagem média de infecção (SINT), e B- Médias de índice de doença (ID).

A interação inóculo (município) x progênie não foi significativa. No entanto, as porcentagens de infecção para a progênie de ICS 1, variaram entre 14% (Pau Brasil) a

65% (Ipiaú); para Sca 6 de 3% (Floresta Azul) a 36% (Ipiaú) e para SIC 23, entre 1% (Floresta Azul) e 53% (Ipiaú) (Tabela 3). Porcentagens de infecção, iguais ou superiores a 50% foram obtidas apenas para a progênie de ICS 1, com os inóculos de Floresta Azul (50%), Ilhéus (57%) e Ipiaú (65%) e, na progênie de SIC 23, apenas para o inóculo de Ipiaú (53%). Em termos de severidade (ID) os valores médios variaram para ICS1 de 0,26 (Pau Brasil) a 1,67 (Ipiaú), de 0,02 (Floresta Azul) a 1,23 (Ipiaú) para Sca 6 e para a progênie de SIC 23 de 0,03 (Floresta Azul) a 1,72 (Ipiaú). É interessante observar que para as duas variáveis, os valores mais altos foram obtidos para o inóculo proveniente do município de Ipiaú, enquanto os mais baixos, para as progênies de Sca 6 e SIC 23, foram os do inóculo proveniente de Floresta Azul. Outro ponto interessante visualizado na Tabela 3, é o efeito do inóculo de Floresta Azul na progênie de ICS 1, onde as duas variáveis apresentaram valores altos em relação ao pouco efeito demonstrado por este inóculo nas progênies de Sca 6 e SIC 23, embora sem base estatística, devido ao efeito não significativo da interação inóculo x progênie.

Tabela 3. Influência dos inóculos oriundos de diferentes municípios da região cacaeira baiana na patogenicidade de *M. perniciosa* em três progênies de *Theobroma cacao* L.

Inóculo	SINT (%)			ID		
	ICS 1	Sca 6	SIC 23	ICS 1	Sca 6	SIC 23
Ilhéus	57	15	16	1,15	0,36	0,51
F. Azul	50	03	01	1,18	0,02	0,03
Jussari	37	16	12	0,63	0,24	0,24
Camacan	15	17	18	0,34	0,42	0,51
St. Luzia	36	19	21	0,81	0,64	0,62
P. Brasil	14	10	09	0,26	0,26	0,30
Ipiaú	65	36	53	1,67	1,23	1,72
Jitaúna	40	12	22	1,13	0,30	0,58
Itagibá	37	19	48	0,97	0,41	1,49

SINT = presença ou ausência de sintomas da vassoura-de-bruxa nas progênies de *Theobroma cacao* L.; ID = índice de doença.

Para atingir o segundo objetivo deste estudo incluiu-se nas análises um quarto tratamento, para cada agrossistema, que consistiu nas misturas dos inóculos de cada um dos agrossistemas, que foram denominadas, mistura A (agrossistema Almada), mistura B (agrossistema Ipiaú) e mistura C (agrossistema Camacan). A ANOVA e o

teste de Tukey ($P > 0,005$) para comparação de médias foram realizados por progênie dentro de cada agrossistema. Para a progênie de ICS 1, nas duas variáveis e nos três agrossistemas, não houve diferenças estatísticas entre as quatro médias pelo teste de Tukey (Tabela 4). Para as progênies Sca 6 e SIC 23, não houve diferenças significativas entre as médias para o agrossistema Camacan. No entanto, nos agrossistemas Almada e Ipiaú ocorreram diferenças. No agrossistema Almada, a mistura apresentou, para as duas progênies, nas duas variáveis, as maiores médias, seguidas dos inóculos de Ilhéus e Jussari para a progênie de Sca 6 nas duas variáveis e, para SIC 23, na variável SINT. Para a progênie SIC 23 e a variável ID, apenas o inóculo de Ilhéus não diferiu estatisticamente da média da mistura. Plântulas das duas progênies (Sca 6 e SIC 23) apresentaram menor incidência e severidade da doença quando inoculadas com basidiósporos provenientes de Floresta Azul do que com a mistura de inóculos deste agrossistema. Para o agrossistema Ipiaú, a mistura provocou médias de SINT e ID nas progênies de Sca 6 e SIC 23 menores do que aquelas causadas nas plântulas inoculadas com basidiósporos provenientes do município Ipiaú, e não diferiram estatisticamente, para as duas variáveis, das médias obtidas para os inóculos de Jitaúna e Itagiba, a exceção da variável SINT para a progênie SIC 23, onde os inóculos de Itagibá e Ipiaú diferiram significativamente dos inóculos de Jitaúna e da mistura. O inóculo de Jitaúna também não diferiu estatisticamente daquele obtido de Ipiaú para as duas variáveis e as duas progênies.

Tabela 4. Porcentagem de infecção e médias de índice de doença obtidas para as três progênes (ICS 1, Sca 6 e SIC 23) quando inoculadas com suspensão de basidiósporos obtidos de cada município e da mistura de municípios por agrossistema.

Inóculos	Municípios	ICS 1		Sca 6		SIC 23	
		SINT (%)	ID	SINT (%)	ID	SINT (%)	ID
Almada	Ilhéus	57 A	1,15 A	15 AB	0,36 AB	16 AB	0,51 AB
	F. Azul	50 A	1,18 A	3 B	0,02 B	1 B	0,03 B
	Jussari	37 A	0,64 A	16 AB	0,24 AB	13 AB	0,24 B
	Média	48 A	0,99 A	11 A	0,28 A	10 A	0,26 A
	Mistura A	59 A	1,66 A	24 A	0,83 A	31 A	1,22 A
Ipiaú	Ipiaú	65 A	1,67 A	36 A	1,23 A	53 A	1,72 A
	Jitaúna	40 A	1,13 A	12 B	0,31 B	22 B	0,56 B
	Itagibá	37 A	0,97 A	19 AB	0,41 AB	48 A	1,41 AB
	Média	47 A	1,26 A	22 A	0,65 A	41 A	1,26 A
	Mistura B	39 A	1,05 A	8 B	0,20 B	19 B	0,60 B
Camacan	Camacan	15 A	0,34 A	17 A	0,42 A	18 A	0,51 A
	St. Luzia	36 A	0,81 A	19 A	0,64 A	21 A	0,62 A
	P.Brasil	14 A	0,26 A	9 A	0,26 A	9 A	0,3 A
	Média	22 A	0,47 A	15 A	0,44 A	16 A	0,48 A
	Mistura C	19 A	0,56 A	25 A	0,66 A	27 A	0,83 A

SINT = presença ou ausência de sintomas da vassoura-de-bruxa nas progênes de *Theobroma cacao* L.; ID = índice de doença. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, dentro de cada agrossistema, para $P > 0,05$ pelo Teste de Tukey.

A média aritmética foi calculada para cada genótipo por variável em cada agrossistema, a partir dos valores obtidos para os três inóculos dentro do agrossistema. Estas médias foram comparadas aos valores médios obtidos para a mistura de inóculos daquele agrossistema, através da análise de contrastes (Tabela 5). Observou-se que, para o agrossistema Camacan, os contrastes entre as médias das progênes ICS 1, Sca 6 e SIC 23 e as médias das misturas não foram significativos para a variável ID nos agrossistemas Almada e Ipiaú. No entanto, no agrossistema Almada, para as três progênes (exceto para SINT em ICS 1), as médias das misturas e as médias dos inóculos foram diferenciadas, sendo as médias das misturas superiores às dos inóculos. Para as progênes Sca 6 e SIC 23, nos agrossistemas Almada e Ipiaú, as misturas se mostraram distintas das médias dos inóculos para as duas variáveis. No entanto, para o agrossistema Almada, as misturas apresentaram valores maiores que as médias dos inóculos e no agrossistema Ipiaú, valores menores que as médias dos inóculos. Assim

sendo, para o agrossistema Almada, o uso da mistura de inóculos poderia ser benéfico e para o agrossistema Ipiaú não.

Tabela 5. Valores da probabilidade (Teste F) para rejeição da hipótese de nulidade do contraste entre as médias das progênies por variável e por agrossistema e a média da mistura de cada agrossistema.

Variável	Agrossistema	Progênie	Média	Mistura	Probabilidade	
					Teste F	Significância
Sint (%)	Almada	ICS1	48	0,59	0,2596	ns
		SCA6	11	0,24	0,0305	*
		SIC23	10	0,31	0,0072	*
	Camacan	ICS1	22	0,19	0,7788	ns
		SCA6	15	0,25	0,1305	ns
		SIC23	16	0,27	0,2105	ns
	Ipiaú	ICS1	47	0,39	0,3579	ns
		SCA6	22	0,08	0,0094	*
		SIC23	41	0,19	0,0057	*
ID	Almada	ICS1	0,99	1,66	0,0313	*
		SCA6	0,21	0,83	0,0057	*
		SIC23	0,26	1,22	0,0013	*
	Camacan	ICS1	0,47	0,56	0,6889	ns
		SCA6	0,44	0,66	0,2876	ns
		SIC23	0,48	0,83	0,2167	ns
	Ipiaú	ICS1	1,26	1,05	0,466	ns
		SCA6	0,65	0,20	0,084	*
		SIC23	1,26	0,60	0,0456	*

SINT = presença ou ausência de sintomas da vassoura-de-bruxa nas progênies de *Theobroma cacao* L.;

ID = Índice de doença;

ns = não significativo ao nível de 5%

* = significativo ao nível de 5%

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados evidenciaram a existência de variabilidade patogênica entre inóculos de *M. pernicioso* obtidos de vassouras secas provenientes de diferentes agrossistemas e municípios, considerando as duas variáveis utilizadas para medidas de incidência (SINT) e severidade (ID) da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro.

O inóculo do agrossistema Ipiá mostrou-se mais eficiente em causar infecção nas plântulas de cacauzeiro inoculadas, do que os do Almada e Camacan; com índice médio de doença mais que o dobro dos causados pelos inóculos provenientes dos outros dois agrossistemas (Figura 2).

Na Bahia a vassoura-de-bruxa do cacauzeiro foi descrita pela primeira vez em 1989 no agrossistema Almada, município de Uruçuca, e posteriormente, no Agrossistema Camacan, município de Camacan, alcançando os demais agrossistemas da região cacauzeira no mesmo ano (PEREIRA, 1996). Naquela ocasião a área infectada em plantações de cacau foi categorizada em três níveis dependendo da percentagem de plantas/área da propriedade que apresentavam sintomas da doença. As fazendas que apresentavam infecção em até 10% das plantas da área foram classificadas como nível 1, as que apresentavam infecção entre 10% e 30% da área como nível 2 e as que apresentavam infecção em mais de 30% da área foram consideradas como nível 3 (LISBOA, 1998). De acordo com esta classificação, todas as fazendas localizadas nos agrossistemas de Camacan e Almada logo alcançaram nível 3, enquanto naqueles consideradas como de transição ao cultivo do cacauzeiro, como Ipiá, os cacauais permaneciam classificados como nível 1 até quando se encerraram as prospecções da CEPLAC em 1991, período em que muitas propriedades no

agrossistema Camacan já estavam em estado de abandono dada a severidade do ataque da vassoura-de-bruxa.

Pode-se, pois, levantar a hipótese de que a maior patogenicidade apresentada pelo inóculo de Ipiaú em relação ao dos agrossistemas Almada e Camacan seja em decorrência da epidemia da doença encontrar-se, ainda, na fase exponencial, portanto, com o seu agente causal comportando-se ainda como um patógeno exótico ao ambiente. Assim, nos agrossistemas Almada e Camacan, a pressão de inóculo do patógeno já teria diminuído em função da doença haver tornado-se endêmica.

Chama-se atenção, no entanto, para a pequena amostragem, dentro de cada agrossistema, que foi usada neste estudo - apenas três municípios entre os que compõem os respectivos agrossistemas: cinco no de Camacan, treze em Ipiaú e doze no Almada. Mesmo assim, foi possível observar diferenças na patogenicidade de *M. perniciosa* entre eles, demonstrando o potencial de adaptação do fitopatógeno a diferentes áreas geográficas dentro da região cacaueteira baiana.

Entre os inóculos do agrossistema Ipiaú, destacou-se pela agressividade o do município de Ipiaú, seguido do de Itagiba, enquanto o de Jitaúna ficou em um grupo intermediário (Tabela 2). Isto indica variação dentro os inóculos deste agrossistema. Isto também foi observado para os agrossistemas do Almada em relação ao inóculo de Ilhéus e no de Camacan em relação ao de Pau Brasil, o menos agressivo dos inóculos testados.

Um fator de variação no comportamento dos inóculos de diferentes municípios pode ter sido a idade das vassouras utilizadas no experimento. De todos os locais de coleta foram utilizadas vassouras secas que após tratamento de desinfestação superficial, foram penduradas no vassoureiro, recebendo então igual condição para a produção de basidiomas. No entanto, observou-se que vassouras de algumas fazendas dentro de municípios não produziram ou formaram apenas poucos basidiocarpos o que provocou o descarte do inóculo por não atingir a concentração de basidiósporos necessária. Este fato ocorreu, principalmente, no inóculo proveniente de Camacan. Isso pode ser uma indicação de que estas vassouras já estavam secas, no campo, há algum tempo e que, provavelmente, já houvessem passado da fase de maior produção, que, segundo Luz et al. (1994), é nos seis primeiros meses após o período de dormência. Deste modo, a

impossibilidade de padronização de idade das vassouras foi um fator de variação no experimento.

Diferenças na compatibilidade somática de isolados de *M. pernicioso* foram relatados por Oliveira et al. (2006) ao estudarem 135 isolados obtidos de coleta e isolamento a partir de materiais infectados amostrados nos diferentes agrossistemas produtores de cacau. Estes autores encontraram entre os isolados por eles estudados, a existência de, pelo menos, três grupos de compatibilidade somática, aos quais aleatoriamente denominaram de, grupos A, B e C. Os grupos A e B eram predominantes em relação ao C. O interessante neste estudo, para os objetivos do nosso trabalho é que, os isolados estudados dos agrossistemas Almada (64,5%) e Camacan (90%) eram predominantemente do grupo A, enquanto os do agrossistema Ipiaú (70,6%) eram do grupo B. Em todos os agrossistemas haviam isolados dos grupos A e B. Embora não hajam estudos sobre a patogenicidade de isolados destes grupos de compatibilidade sexual, a predominância de isolados do tipo B em Ipiaú, pode vir a estar associada à patogenicidade. Assim, é previsível que as diferenças em patogenicidade encontradas neste estudo sejam referentes à diferentes populações de *M. pernicioso* presentes na região cacauzeira baiana, como indicado pela compatibilidade sexual do patógeno.

Grandes avanços têm sido obtidos para demonstrar a variabilidade genética do patógeno, através de marcadores moleculares do tipo RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA (ANDEBRHAN et al. 1999; ANDEBRHAN; FURTEK, 1994; NIELLA et al. 2000; GOMES et al., 2000; GRAMACHO et al., 2005b), ERIC - Repetitive Element Sequence-Based, PCR - Genomic Fingerprinting (ARRUDA et al., 2003a), DNA nuclear e mitocondrial (ARRUDA et al., 2003b), AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism (PLOETZ et al., 2005), PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis (RINCONES et al., 2006), e microssatélites (GRAMACHO et al., 2007). Os trabalhos acima mencionados revelaram diferenças moleculares entre populações do patógeno provenientes de diferentes países, entre regiões dentro de países, entre e dentro de municípios da região cacauzeira da Bahia, entre partes de uma mesma planta (frutos, almofada, gema vegetativa) e, também entre anos de observação sobre um mesmo grupo de plantas (GRAMACHO et al., 2003, 2006, 2007; MOREIRA, 2006; BRAZ et al.,

2006) evidenciando, portanto, variabilidade genética no fitopatógeno, sem entretanto estabelecer diferenças em patogenicidade.

Quando os comportamentos de ICS 1, Sca 6 e SIC 23 foram comparados, sem levar em consideração a origem do inóculo (Figura 3), ou interação progênie x agrossistema (Figura 4 – 6), observou-se que a progênie de ICS 1, considerado como de reação intermediária, em relação a vassoura-de-bruxa (LUZ et al., 1999; SILVA et al., 2001) comportou-se como a mais suscetível entre as três testadas. Por outro lado a progênie do clone SIC 23, considerada como suscetível e até usada como padrão de suscetibilidade em ensaios para seleção de genótipos resistentes (PIRES et al., 1999; LUZ et al., 2006) não se diferenciou estatisticamente da progênie Sca 6. Esta, por outro lado, quando comparada as outras duas progênies (Figuras 3 e 5) manteve um padrão de resistência, confirmando a possibilidade de continuidade do seu uso como tal em experimentos para seleção de genótipos resistentes (LUZ et al., 2001; PAIM et al., 2006; LUZ et al., 2006). Como observado na Tabela 3, o valor máximo de infecção obtido para a progênie de Sca 6 foi de 36%, quando inoculada com suspensão de basidiósporos provenientes de vassouras coletadas no município de Ipiaú, bem como a severidade dos sintomas também foi a mais expressiva (ID = 1,23), ressaltando, uma vez mais, a agressividade do inóculo do agrossistema Ipiaú, neste caso, especialmente para o município que dá nome ao mesmo.

Ficou evidenciado, portanto, que dependendo do local onde estejam sendo cultivadas, pode haver alteração no comportamento das progênies em relação ao patógeno. Isto significa que o material genético a ser recomendado para plantio na região, tem que ser testado pelo programa de melhoramento genético do cacauero para os inóculos de todos os municípios da região cacauera, ou para uma mistura desses inóculos, o que deve ser objeto de futuros experimentos.

Os resultados sugerem alteração no comportamento das progênies tanto de ICS 1 como de SIC 23, o que pode ser função da evolução de *M. perniciosa* na região cacauera da Bahia. O SIC 23 que é um clone do tipo “comum”, e que foi bastante afetado pela doença no início da década de 90, parece agora não estar sofrendo a pressão de seleção do patógeno que estaria procurando adaptar-se aos genótipos resistentes atualmente plantados pelos agricultores.

Evidência de evolução do fitopatógeno na Bahia foi demonstrada por Pires (2001) e Gramacho et al. (2006): isolados amostrados em materiais resistentes diferem geneticamente dos amostrados em genótipos susceptíveis, conforme marcadores RAPD. A mudança de comportamento de descendentes de Scavina foi, a partir daí, verificada em áreas experimentais no CEPEC (PAIM et al., 2006) e também em diversas propriedades rurais de diferentes municípios da região, o que foi comprovado, por inoculações do patógeno e marcadores moleculares (JUCA, 2009).

O caso específico da progênie de Sca 6 haver mantido a comportamento de resistência quando comparado as outras duas utilizadas é de interesse do programa de melhoramento do cacaueteiro, pois, como foi visto (PIRES, 2003; PAIM et al., 2006) já existem evidências da quebra de resistência na Bahia, como ocorreu anteriormente em outros locais (ALBUQUERQUE, 2006). Alguns autores consideram que a resistência do clone Scavina, especificamente o Sca 6 pode ser predominantemente qualitativa (AHNERT, 2000; NIELLA, 2000; FALEIRO et al., 2001), porém, devem haver também genes de resistência quantitativa, pois de acordo com (ROBINSON, 1976; BERGAMIN FILHO et al., 1996) a resistência monogênica não ocorre desacompanhada da poligênica, neste caso genes de efeito qualitativo e quantitativo estariam atuando conjuntamente no comportamento de resistência dos descendentes de Sca 6, conforme sugerido por Surujdeo-Maharaj et al. (2004), Luz et al. (1999) e Pires et al. (1999).

Os resultados presentes com relação ao comportamento da progênie de Sca 6 tendem a confirmar estudos anteriores que evidenciam que provavelmente o cacaueteiro apresenta resistência à doença dos tipos monogênica e poligênica (FALEIRO et al., 2002; PARLEVLIT, 1993; PARLEVLIT, ZADOKS, 1977). A identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) com genes de efeitos menores reforçam este argumento (CROUZILLAT et al., 1996; LANAUD et al., 1996; LANAUD et al., 2004; MOTILAL et al., 2000; PUGH et al., 2004; QUEIROZ et al., 2003; RISTERUCCI et al., 2000). Contudo, face a evolução do patógeno deve-se buscar fontes de resistência geneticamente distintas aos clones Scavina, conforme vem sendo feito no Programa de Melhoramento Genético do Cacaueteiro. Preferencialmente estão sendo indicados para plantio clones com genes de várias fontes de resistência, a fim de se obter material genético com

resistência durável, evitar o aumento da pressão de seleção no patógeno, e, por conseguinte o desenvolvimento de cepas mais virulentas.

O índice de doença, usado nesse trabalho como medida de severidade, mostrou-se uma variável confiável para ser usada na seleção em casa-de-vegetação por refletir o comportamento das progênies estudadas em relação aos sintomas que refletem a severidade da vassoura-de-bruxa no campo, a formação de vassouras. Para avaliação da resistência em plântulas de cacauero, o comprimento da vassoura terminal e o número de vassouras axilares formadas são variáveis muito importantes (SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2004) e que estão incluídas nesse índice. Assim sendo, sugere-se que o mesmo venha a ser rotineiramente utilizado na avaliação do comportamento de progênies quanto à resistência a vassoura-de-bruxa do cacauero.

O fato das misturas de inóculos provenientes dos municípios dentro do agrossistema Almada terem apresentado mais sintomas do que o inóculo dos municípios de “per se” (Tabela 4) em relação às duas progênies que, de modo geral, se comportaram como resistentes (Sca 6 e SIC 23) leva a sugerir a possibilidade do uso de misturas de inóculos provenientes de diversas áreas geográficas da região cacauera para testar a resistência de materiais genéticos à vassoura-de-bruxa. Isto facilitaria muito o trabalho dos fitopatólogos que trabalham no programa de melhoramento genético. No entanto, os resultados observados para o agrossistema Ipiaú, onde a mistura quando contrastada com a média dos valores das variáveis para cada progênie por agrossistema, apresentou valores menores que a mesma (Tabela 5), indicam cautela no uso das misturas. Neste caso específico, pode ter havido sinergismo entre os inóculos de diferentes procedências quando misturados.

Isto indica que antes que se recomende o uso de mistura de inóculos para agilizar a seleção do material genético resistente à vassoura-de-bruxa será necessário fazer-se novas inoculações, usando estas mesmas progênies, porém, com inóculos de *M. perniciosus* obtidos de mais localidades, principalmente do agrossistema onde o material genético será plantado.

Este trabalho demonstrou a existência de variabilidade na patogenicidade de inóculos provenientes de diferentes agrossistemas da região cacauera e entre aqueles obtidos de municípios dentro de cada agrossistema, bem como, o comportamento

diferenciado das progênies de Sca 6, ICS 1 e SIC 23, especialmente de Sca 6 e SIC 23, quando inoculadas com basidiósporos do patógeno obtidos de diferentes localidades da região. Estes resultados são de grande importância para o melhoramento genético do cacauero visando resistência a esta doença, e, para direcionar os trabalhos de diversidade genética do patógeno buscando associar as características de patogenicidade aos marcadores moleculares já identificados no genoma do patógeno.

6. CONCLUSÕES

- 1) Existe variabilidade patogênica entre inóculos de *M. pernicioso* provenientes dos três agrossistemas e dentro dos municípios de cada agrossistema demonstrando o potencial de adaptação do fitopatógeno a diferentes áreas geográficas na região cacaueteira baiana;
- 2) Inóculos oriundos do agrossistema Ipiaú foram mais patogênicos em relação aos inóculos dos agrossistemas Almada e Camacan;
- 3) Dentre os inóculos testados (nove municípios) o de Ipiaú foi o mais agressivo;
- 4) Houve variabilidade no comportamento das progênies “per se” em relação aos inóculos provenientes de diferentes agrossistemas;
- 5) As progênies ICS 1 e SIC 23 sofreram alteração no comportamento esperado, tendo a progênie de ICS 1 comportado-se como a mais suscetível. A progênie de Sca 6 manteve comportamento de resistência, apresentando menos sintomas que as demais mesmo ao inóculo mais virulento (Ipiaú);
- 6) Recomenda-se cautela no uso de misturas de inóculos na seleção de material genético para avaliação de resistência à vassoura-de-bruxa, até que outros experimentos sejam realizados, para comprovar a viabilidade do seu uso;

- 7) A variável índice de doença demonstrou-se eficiente como medida de severidade, podendo ser usada nas avaliações rotineiras de genótipos em casa-de-vegetação para selecionar resistência a vassoura-de-bruxa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, San Diego: Academic Press, 635p, 1997.
- AHNERT, D. Use of QTLs for witches'broom resistance in cocoa breeding. In: International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, 2001, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysi. **Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding**. Londom : INGENIC, p. 116-119, 2000.
- AIME, M. C.; PHILLIPS - MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, p. 1012 - 1022, 2005.
- ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e Identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacauero (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 133p, 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1996.
- ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 1474 - 1486, 1999.
- ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M.; CASCARDO, J.; FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, n.2 , p.167-175, 1999.
- ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYAMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. **Agrotrópica**, v.10, p.49-60, 1998.

ANDEBRHAN, T.; FURTEK, D. B. Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. **Plant Pathology**, v. 43, n.6, p.1020-1027, 1994.

ANDEBRHAN, T.; BASTOS, C. N. Variabilidade de isolados de *Crinipellis pernicioso*. In Belém, CEPLAC/DEPEA. **Informe Técnico**, p. 51-56, 1985.

ANDEBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: **Proceeding of the 9th International Cocoa Research Conference**, p. 395-402, 1984.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L. C. Crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso* originado de vários locais da Amazônia Brasileira. **Informe Técnico**, p. 42-43, 1984.

ARRUDA, M. C. C. de; FERREIRA, M. A. S. V.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and host. **Mycological Research**, v.107, n.1, p.25-37, 2003a.

ARRUDA, M. C. C. de.; MILLER, R. N. G.; FERREIRA, M. A. S. V.; FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequebce-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, v. 52, n.2, p.236- 244, 2003b.

BAKER, R. E. D.; HOLLIDAY, P. Witches' broom disease of cacao. The Commonwealth Mycological Institute, **Phytopathological Paper**, n. 2, 39p., 1957.

BASTOS, C. N. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 305-306 (suplemento), 2000.

BASTOS, C. N. Potential of *Trichoderma viride* for control of cocoa witches' broom (*Crinipellis pernicioso*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 509-512, 1996.

BASTOS, C. N. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer). Ilhéus: CEPLAC/CEPEC, (CEPLAC/CEPEC). **Boletim técnico**, v. 168, 21p., 1990.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e Controle Econômico**. São Paulo: Ceres, 299 p., 1996.

BEZERRA, J. L.; COSTA, J. C. B.; BASTOS, C. N.; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**, v 28, p. 408-412, 2003.

BOCCHESI, C. A. C.; MARTINELLI, J. A.; MATSUMURA, A. T. S.; FEDERIZZI, L. C.; PRESTES, A. M. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados

de *Pyrenophora chaetomioides*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n. 1, p.11-16, jan./fev, 2003.

BRAZ N. G. R.; GRAMACHO, K. P.; MOREIRA, R. F. C.; SERRA, W. O. Temporal Variability in *Crinipellis pernicioso* in Plantations of Southeast Bahia, Brazil. In: 15th International Cocoa Research Conference and classified the category, 2008, Costa Rica. **15th International Cocoa Research Conference**, p. 1229-1236, 2008.

BRAZ, N. G. R.; GRAMACHO, K. P.; MOREIRA, R. F. C.; SERRA, W. O. Temporal Variability in *Crinipellis pernicioso* in Plantations of Southeast Bahia, Brazil*. In: **15th International Cocoa Research Conference**, p. 184-184, 2006.

CARVALHO, A. C. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero.** (Dissertação de Mestrado), Universidade Estadual de Santa Cruz, 2006.

COSTA, J. C. B.; BASTOS, C. N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa. **Anais. Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**, p.45-51, 2000.

CROUZILLAT, D.; LERCETEAU, E.; PETIARD, V.; MORERA, J.; RODRIGUEZ, H.; WALKER, D.; PHILLIPS, W.; RONNING, C.; SCHNELL, R.; OSEI, J.; FRITZ, P. *Theobroma cacao* L.: A genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.205-214, 1996

DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R. X.; MONTEIRO, W. R.; LUZ, E. D. M. N.; GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V. Caracterização de uma população de cacauero para mapeamento de genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.380-386, 2005.

DICKSTEIN, E. R.; PURDY, L. H.; FRIAS, G. A. *Crinipellis pernicioso*, the cacao witches' broom fungus: Inoculum production and storage, **Phytopathology**, v. 77, p. 1747, Ababstract, 1987.

EVANS, H. C. Pleomorphism of *Crinipellis pernicioso* causal agent of witches' broom disease of cacao. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980.

EVANS, H. C., BASTOS, C. N. Uma avaliação do ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, n. 1, p.104, 1979.

FALEIRO, F. G. et al. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis Pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma Cacao* L.). **Euphytica**, v.149, p. 227 - 235, 2006.

FALEIRO, F. G. et. al. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando à obtenção de marcadores RAPD. **Agrotropica**, v. 2, p. 31 – 34, 2002.

FALEIRO, F. G.; NIETSCHKE, S.; RAGAGNIN, V. A.; BORÉM, A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha-

angular em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 86-89, 2001b.

GOMES, L. M. C.; MELO, G. R. P.; FALEIRO, F. G.; SILVA, S. D. M.; ARAÚJO, I. S.; BAHIA, R. C.; VALLE, R. R.; MORAES, M. G. & AHNERT, D. Diversidade genética de *Crinipellis pernicioso* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. Proceedings, vol.1, **13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, pp.605-612, 2000.

GRAMACHO, K. P.; PIRES J. L.; LOPES, U. V.; BEZERRA, J. L. Vassoura-de-bruxa, evolução do fungo e necessidade de remoção das partes afetadas em clones resistentes. **Boletim Técnico**, 2008.

GRAMACHO, K. P.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C.; LIMA, L. S.; LOPES, U. V. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p.153–155, 2007.

GRAMACHO, K. P.; LIMA, L. S.; MOREIRA, R. F. C.; SERRA, W O.; LIMA, L. S.; BRAZ, N. G. Proposta para estabelecimento de diferenciadoras para estudo da evolução do *Crinipellis pernicioso*. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2006, Salvador. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31. p. 214-214, 2006.

GRAMACHO, K. P.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V.; BEZERRA, J. L. Vassoura-de-bruxa, evolução do fungo e necessidade de remoção das partes afetadas em clones resistentes. **28 Semana do fazendeiro - Agenda Técnica**, v. 28, p. 423-426, 2006.

GRAMACHO K. P.; LOPES U. V.; PIRES J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA R. C.; MAHE L. Phylogeography of the witches' broom pathogen in Bahia. **Agrotrópica**, v.17, p. 65-72, 2005.

GRAMACHO K. P.; LOPES U. V.; PIRES J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA R. C.; MAHE L. Phylogeography of the witches' broom pathogen in Bahia. **Agrotrópica**, 17, 65-72, 2005b.

GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; LOPES, J. R. M.; BAHIA, C.; Z Aidan, H. Phylogeography of the Witches' broom pathogen in Bahia. In: **14th International Cocoa Research Conference**, p.1325-1332, 2003.

GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; OLIVEIRA, M. L. de.; PIRES, J. L.; NIELLA, G. R.; FALEIRO, F. G. Estrutura genética de isolados de *Crinipellis pernicioso* em diferentes órgãos de um cacaueteiro. In: **XXXV CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, v. 27. p.117-117, 2002.

HOLLIDAY, P. *Crinipellis pernicioso*. **C. M. I. description of pathogenic fungi and bacteria**. London: Commonw. Mycol. Inst., p.2, 1970.

HOYOS, J. M. A. **Utilização de fungos endófitos de cacau como biocontroladores da vassoura-de-bruxa.** (Tese de Mestrado), Universidade Federal de Lavras, 2008.

JUCA, F. F. J. **Influência do local, do tipo de vassoura e de clones de cacau na estrutura genética de *Moniliophthora perniciosa* na Bahia.** (Tese de Mestrado), Universidade Estadual de Santa Cruz, 2009.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A. M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J. A. K.; FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding** 13, 211–227, 2004.

LANAUD, C.; KÉBÉ, I.; RISTERUCCI, A. M.; CLÉMENT, D.; N'GORAN, J. K. A.; GRIVET, L.; TAHI, M.; CILAS, C.; PIERETTI, I.; ESKES, A. B.; DESPRÉAUX, D. Mapping Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. In: **International Cocoa Research Conference**, p. 99 -105, 1996.

LEACH, J. E.; VERA CRUZ, C. M.; BAI, J.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as predictor of durability of disease resistance genes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 39, p. 187-224, 2001.

LEAL, J. B.; SANTOS, L. M.; SANTOS, C. A. P.; PIRES, J. L.; AHNERT, D.; CORRÊA, R. X. Diversidade genética entre acessos de cacau de fazendas e de banco de germoplasma na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 851-858, 2008.

LISBOA, G. J. **Impacto da Vassoura de Bruxa sobre a Produção de cacau no Município de Itajuípe-BA.** (Monografia). p.59, 1998.

LUZ, E. D. M. N. ; SILVA, S. D. V. M. ; PAIM, M. C. A. . Resistance to witches' broom disease of cacao in Brazil: methods of inoculation, problems and correlations with field results.. In: **Eskes, A.B.; Efron, Y.. (Org.). Global approaches to cocoa germplasm utilization and conservation.** 1 ed. Amsterdam: CFC/ICCO/IPGRI, v. 1, p. 146-150, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J.T.; OLIVEIRA, M. L.; BEZERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Vassoura-de-bruxa do cacau: novos enfoques sobre uma velha doença. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 14, p. 59-111, 2006.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P.; LOPES, U. V.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Cacao progenies responses to *Crinipellis perniciosa* under field and controlled environment conditions in Bahia, Brazil. In: **13th International Cocoa Research Conference**, v. 1. p. 537-543, 2001.

LUZ, E. D. M. N. et al. Evaluation of cocoa in Brasil, for resistance to *Crinipellis pernicioso*. In: **12th International Cocoa Research Conference**. Proceedings. Lagos, Nigéria, Cocoa Producers' Alliance, p. 219 - 226, 1999.

LUZ, E. D. M. N.; BEZERRA, J. L.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, M. L. Cacau (*Theobroma cacao* L.) Controle de doenças. In: Ribeiro do Vale, F.X. & Zambolim, L. (Eds.) **Controle de Doenças de Plantas-Grandes Culturas**. Viçosa. UFV, v.2, p. 617-622, 1997.

LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, H. A.; MACHADO, R. C. R. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidiomas e atividade de *Crinipellis pernicioso* em ramos e frutos de cacauzeiro na Bahia. In: XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Itajaí. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília : Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v. 19. p. 341-341, 1994.

MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; MARQUES, J. R. B.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; PAIM, M. C. A. Population breeding activities in Brazil. In: Eskes, A. B.; Efron, Y.. (Org.). **Global approaches to cocoa germplasm utilization and conservation**. 1 ed. : CFC/OCCO/IPGRI, v. 1, p.28-34, 2006.

MOREIRA, R. F. C. M. **Estrutura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR**. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

MOTILAL, L.; SIRJU-CHARRAN, G.; SREENIVASAN, T. N. Effect of *Crinipellis pernicioso* on abscission of cacao cotyledons, reserve mobilization and dry matter partitioning. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.546-552, 2003.

MOTILAL, L. A.; SOUNIGO, O.; THÉVENIN J. M.; RISTERUCCI A. M.; PIERETTI I.; NOYER J. L.; LANAUD C. *Theobroma cacao* L.: Genome map and QTLs for *Phytophthora palmivora* resistance. **13th International Cocoa Research Conference**, 2000.

NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M. H. **Applied linear statistical models**. 3.ed, 1181p, 1990.

NIELLA, G. R. **Frutificação *in vitro*, caracterização molecular e patogênica de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em *Theobroma cacao* L.** (Tese de Doutorado), Universidade Federal de Lavras. 2000.

NIELLA, G. R.; CASTRO, H. A.; SILVA, L. H. C. P.; CARVALHO, J. A. Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 4, v. 24, p. 523 - 527, 1999.

OLIVEIRA, M. L.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, V. R. Compatibilidade somática entre isolados de *Crinipellis pernicioso* originários da região cacauzeira da Bahia. **Agrotrópica**, v. 17, p. 53-62, 2006.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E.D.M.N. **Identificação e manejo das principais doenças do cacaueteiro no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 132 p., 2005.

OLIVEIRA, M. L. Eficácia de fungicidas triazóis no controle da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro causada por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 149 (Suplemento), 2004a.

OLIVEIRA, M. L. Estrobilurinas, novo grupo de fungicidas com eficácia contra a vassoura-de-bruxa do cacaueteiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 258 (Suplemento). 2004b.

OKU, H. Gene expression in susceptibility and resistance of fungal plant diseases. In: **Desh Pal S. Verma (Ed.) Molecular signals in plant- microbe communications**. CRC-Boca Raton, v. 511, p. 49-63, 1992.

PAIM, V. R. L. D. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; SILVA, S. D. V. M.; SOUZA, J. T. ; ALBUQUERQUE, P. S. B.; SANTOS FILHO, L. P. Sources of resistance to *Crinipellis pernicioso* in progenies of cacao accessions collected in the Brazilian amazon. **Scientia Agricola**, v.63, p.572-578, 2006.

PAIM, V. R. L. M. **Estudo da diversidade genética de novas fontes de resistência à vassoura-de-bruxa do cacaueteiro**; Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, 2005.

PARLEVLIIET, J. E. What is durable resistance, a general outline. In: JACOBS, T.H.; PARLEVLIIET, J. E. **Durability of Disease Resistance**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 23 - 29, 1993.

PARLEVLIIET, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, v. 26, p. 5 - 21, 1977.

PEREIRA, J. L. Renewed advance of witches' broom disease of cocoa: 100 years later. In: **INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE**, Salvador, 1996. Salvador: Cocoa Producers' Alliance, p.87-89, 1996.

PEREIRA, J. L. M.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v.1, p. 79-81. 1989.

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 de Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, 2003.

PIRES, J. L. et al. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 347, 2001.

PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; PINTO, L. R. M.; LUZ, E. D. M. N. Resistance to witches'-broom evaluation of genotypes from different origins. In: **12th INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE**, Proceedings. Salvador, p.389-397, v.12, 1999.

PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. **Boletim técnico**, v.18, 35p.1998.

PLOETZ, R. C.; SCHNELL, R. J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C. T.; MOTAMAYOR, J. C.; JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.111, n.4, p.317-326, 2005.

PUGH, T. et al. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1151 - 1161, 2004.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Phytopathology**, v.34, p.573-594, 1996.

QUEIROZ, V. T.; GUIMARÃES, C. T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R. T.; PEREIRA, M. G.; IRANDA, V. R. M.; LOGUÉRCIO, L. L.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, v.122, n.3, p.268-272, 2003.

RINCONES, J.; MAZOTTI, G. D.; GRIFFITH, G. W.; POMELA, A.; FIGUEIRA, A.; LEAL, C. A.; QUEIROZ, M. V.; PEREIRA, J. F.; AZEVEDO, R. A.; PEREIRA, G. A.; MEINHARDT, L. W. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Mycol. Res.** v. 110, p. 821-832, 2006.

RISTERUCCI, A. M. ; PAULIN, D. ; N'GORAN, J. K. A.; DUCAMP, M. ; LANAUD, C. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Phytophthora* in *Theobroma cacao* L. **INGENIC Newsletter**, v. 5, p. 9 - 10, 2000.

ROCHA, H. M.; MIRANDA, R. C.; SGRILLO, R. B.; SETUBAL, R. A. Witches' broom in Bahia Brazil. In: RUDGARD, S. A.; MADDISON, A. C.; ANDEBRHAN, T. (Ed.). **Disease Management in cocoa**: comparative epidemiology of witches' broom. London: Chapman and Hall, p.189-200, 1993.

ROBINSON, R. A. **Plant pathosystems**. Springer-Verlag, 184p.,1976.

SANTOS, R. M. F.; LOPES, U. V.; BAHIA, R. C.; MACHADO, R. C. R.; AHNERT, D.; CORREA, R. X. Marcadores microssatélites relacionados com a resistência à vassoura-de-bruxa do cacauero. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1137-1142, 2007.

SAS Institute. SAS/STAT. User's guide. Version 8.2. Cary, 943p., 1988.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Cacao resistance to *Crinipellis pernicioso*: diallelic crosses increase genes for resistance. In: **8th International Congress of Plant Pathology**, Christchurch Addendum to Abstracts of Offered Papers, Christchurch – New Zealand 8th ICPP, p.8, 2003.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C. de; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacauero. **Agrotrópica**, v.14, n.1, p.1-28, Edição especial, 2002.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; SANTOS FILHO, L. P. Aumento da frequência de genes de resistência a *Crinipellis pernicioso* em progênies de cacauero. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, SP. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26. p. 353. 2001.

SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis pernicioso***. (Tese Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, 1997.

SILVA, L. F.; LEITE, J. de O. Caracterização preliminar dos agrossistemas das regiões cacaueras da Bahia e Espírito Santo. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC, **Boletim Técnico** n. 156, 15p, 1988.

SINGER, R. A monographic study of the genera "*Crinipellis*" and "*Chaetocalathus*". **Lilloa**, v.8, p. 441-514, 1942.

SOUZA, J. T; POMELLA, A. W. V.; BOWERS, J. H ; PIROVANI, C.P.; LOGUERCIO, L. L.; HEBBAR, P. K. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches'broom pathogen. **Phytopathology**, n. 1, v. 96, p. 61-67, 2006.

STAHEL, G. ***Marasmius perniciosus*** nov. spec. Department van den Landbonw in Surinam. Bulletin n. 33, p. 1-26. 1915.

SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D. R. Assessment of resistance to witches'-broom disease in clonal and segregating populations of *Theobroma cacao*. **Plant Disease**, v. 88, p. 787–803. 2004.

VELLO, F.; GARCIA, J. R. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. **Revista Theobroma**, v.1, p. 3 - 10, 1971.

WHEELER, B. E. J.; MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology** v.37, p.475-488. 1988.

WENT, F. A. F. C. Krulloten en Verstende vruchten van cacao in Suriname Verch. K Akad. Wet. Amsterdam 2, Sect. v.10, p. 1-40, 1904.

YAMADA, M. M.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; DANTAS NETO, A.; PIRES, J. L.; FLORES, A. B.; FALEIRO, A. S. G.; BAHIA, R. C. S. Diversidade genética de acessos de cacauero da série CEPEC por meio de marcadores RAPD. **Agrotrópica**, Bahia, v. 14, n. 3, p.137-140, 2002.