

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



**MURCHA-DE-CERATOCYSTIS (*Ceratocystis cacaofunesta*) NO SUL DA  
BAHIA: METODOLOGIA PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE  
CACAUUEIRO RESISTENTES E ESTUDOS PRELIMINARES DESCRITIVOS  
DO PATÓGENO.**

CHARLES LEONEL GALVÃO SANCHES

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Dezembro de 2006**

**CHARLES LEONEL GALVÃO SANCHES**

**MURCHA-DE-CERATOCYSTIS (*Ceratocystis cacaofunesta*) NO SUL DA  
BAHIA: METODOLOGIA PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE  
CACAUUEIRO RESISTENTES E ESTUDOS PRELIMINARES DESCRITIVOS  
DO PATÓGENO.**

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

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Dezembro de 2006**

CHARLES LEONEL GALVÃO SANCHES

MURCHA-DE-CERATOCYSTIS (*Ceratocystis cacaofunesta*) NO SUL  
DA BAHIA: METODOLOGIA PARA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE  
CACAUEIRO RESISTENTES E ESTUDOS PRELIMINARES  
DESCRITIVOS DO PATÓGENO.

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

APROVADO: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007

---

Dr. ALAN WILLIAN VILELA POMELLA  
Sementes Farroupilha Ltda.

---

Dra. STELA DALVA VIEIRA MIDLEJ SILVA  
CEPLAC

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. LEANDRO LOPES LOGUERCIO  
UESC – Orientador

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL  
Dezembro de 2006

## DEDICATÓRIA

Dedico a Dinalva G. Sanches, minha mãe e a Enedina Dias Galvão, minha avó, por serem exemplos de vida com caráter e temor a Deus; e a Rita Vital, minha esposa, que foi, e é amiga, companheira e incentivadora sempre presente.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

criador de tudo e de todos. Que me provou que o “amor é o que o amor faz” fazendo muito por mim! Por “Porque D’ele, por Ele e para Ele são todas as coisas, Glória, pois a Ele eternamente, Amém”.

À minha mãe,

mulher que vi dar a sua vida por mim em cada momento da minha vida; mulher de coragem que me mostrou o mundo sem deixar que eu me contaminasse com o que há de ruim. Jamais te esquecerei, jamais te deixarei.

À minha esposa Rita Vital,

a pesquisa nos fez colegas e amigos; o amor aproveitou a situação e uniu as nossas vidas; Deus, nosso Pai, para completar, selou e abençoou o que vai durar por toda vida.

À minha avó Enedina Dias Galvão,

pelas constantes orações que me fazem vitorioso por onde quer que eu for. Amo muito a senhora!

A todos os meus familiares e amigos,

que nunca pouparam esforços em me ajudar. À contribuição de vocês não terei condições de retribuir, mas sempre vou rogar a Deus para que os abençoe e os guarde por toda a vida.

Ao Dr. Leandro Lopes Loguercio,

meu orientador. Na verdade um *mestre*, que com respeito, confiança e habilidade me mostrou as dificuldades e juntos criamos as soluções, sempre considerando que a vida deve ser, antes de tudo, vivida e as oportunidades aproveitadas. Um *mestre* a gente nunca esquece!

A Alberto, Bruna, Carlyle, Cilene, Durval, Eline, Marco, Rita, Rogério, Sândalo,

meus colegas de curso que demonstraram companheirismo em cada momento, construindo juntos um ideal que se realiza ‘um por um’. Grande abraço a todos!

Aos meus amados irmãos em Cristo,

que com atitudes grandiosas se interessavam em cada passo desse trabalho acompanhando e orando por mim. Saibam que nunca me achei só nessa caminhada.

Ao meu pequeno grupo Teleios de Cristo,

que por pouco eu não dava aulas sobre o meu trabalho em nossas reuniões para torna-los envolvidos no processo como um todo. Obrigado pelas orações!

Ao Dr. Alan Wilian Vilela Pomella,  
que me ajudou dar os primeiros passos com o *Ceratocystis cacaofunesta* e dedicou grande parte do seu tempo a me fazer conhecer mais sobre a pesquisa com um profissionalismo e competência incomparável.

À Dra. Stela Dalva Vieira Midlej Silva,  
que me acompanhou desde a iniciação científica nunca medindo esforços para ensinar e acompanhar cada passo da pesquisa; que com paciência e atenção se dispôs a estar contribuindo sempre para um melhor desenvolvimento desse trabalho, sempre me mantendo atualizado quanto às pesquisas com o *Ceratocystis cacaofunesta*.

Ao Dr. Luiz Roberto Pinto,  
grande profissional, amigo e tutor “de última hora” que, com seu vasto conhecimento e experiência em cacau e em Estatística, foi o grande responsável pelo salto de qualidade apresentado neste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela colaboração na minha formação profissional.

À FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia, pela concessão da bolsa de mestrado. Espero ter feito jus!

À UESC – Universidade Estadual de Santa Cruz,  
minha casa acadêmica, por fornecer toda a sua estrutura de ensino, pesquisa e extensão contribuindo para o meu aprendizado.

À Almirante Cacau,  
pelo apoio em todo trabalho e financiamento da maior parte da pesquisa e por abrirem as portas para que tudo se realizasse com qualidade e precisão.

Aos amigos Iara, Alicia, Agnaldo, Delvani, D. Mirian e toda sua equipe, Domingos, Nai, Nego, Lívia, Remilton (Zoião), Luís, Robson, Marcus, Rui, Soraia, e todos os outros companheiros de trabalho na Almirante que com boa vontade sempre se dispuseram a estar contribuindo para o bom andamento desse trabalho. Vocês são co-autores de tudo isso.

A todos cujo nome não estão aqui,  
mas que estiveram direta ou indiretamente contribuindo para que cada passo fosse dado da melhor forma. Sem o apoio de todos vocês nada aconteceria.

## **VALEU DEMAIS**

Valeu demais!  
As noites mal dormidas ansiando a paz  
Perdida e pretendida,  
Que eu já não sabia mais  
Onde é que fora se esconder,  
Valeu o tempo de esperar o teu querer!

Valeu demais!  
Os dias mal passados caminhando atrás  
De planos mal traçados,  
Que eu só posso agradecer  
A tua mão que me livrou,  
Valeu o tempo de esperar, mas já passou!

Pois eu estou bem certo,  
Breve tempo de aflição  
Não pode comparar-se à nossa eterna salvação  
E os dias de tristeza servem mais pra destacar  
A imensa glória e honra  
Com que Deus vai nos brindar.

Valeu demais!  
Valeu!  
O tempo e o contratempo  
Que esta história traz,  
E cada vão momento fica cheio de esperança  
Que é a certeza da presença do Senhor  
Em cada passo por onde eu for!

***Guilherme Kerr.***

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
EXTRATO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. O cacauero .....	3
2.2. O fungo <i>Ceratocystis cacaofunesta</i> .....	4
2.3. A doença .....	7
2.4. Resistência de plantas a doenças .....	13
3. METODOLOGIA .....	14
3.1. Avaliação da concentração ideal de inóculo .....	14
3.2. A avaliação da resistência de clones de cacauero ao <i>C. cacaofunesta</i> .....	16
3.3. Altura relativa de lesão .....	18
3.4. Coleta de isolados de <i>C. cacaofunesta</i> .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1. Estabelecimento de metodologia para avaliação da resistência de clones de cacau à murcha-de- <i>Ceratocystis</i> . .....	21
4.1.1. Avaliação de parâmetros para comparações entre genótipos .....	21
4.1.2. Época ideal para avaliação .....	24
4.1.3. Concentração ideal de inóculo .....	26
4.1.4. Avaliação da resistência de clones de cacauero – validação do método. .....	31
4.1.5. Altura relativa de lesão – parâmetro alternativo para avaliação de genótipos de cacauero .....	40
4.2. Identificação e caracterização preliminar de <i>C. cacaofunesta</i> . .....	44
4.2.1. Distribuição geográfica na região cacauera do sul da Bahia .....	44
4.2.2. Aspectos morfológicos e de cultura do fungo .....	50
5. CONCLUSÕES .....	53
6. BIBLIOGRAFIA .....	55



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plantas do clone ICS-1. Área experimental da CEPLAC (Estação Experimental Joaquim Baiana) município de Itajuípe, infestada por *C. cacaofunesta*..... p. 10
- Figura 2.** Percentual de plantas mortas (%PM) de acordo com os genótipos ICS-1 e TSH1188 e as concentrações de inóculo nas 13 avaliações (ver Metodologia). As seis concentrações estudadas são indicadas à direita (de C1 à C6); 'med' identifica a média geral de %PM para o experimento, aqui definido como o 'Índice de doença'..... p. 23
- Figura 3.** Médias observadas de %PM nas 13 avaliações, com destaque para a diferença entre as médias para as progênies de ICS-1 e de TSH-1188 (DIF - área sombreada). As letras (a e b) ao lado dos nomes dos genótipos representam a diferença estatística entre os mesmos em todas as avaliações, exceto para a 1<sup>a</sup>..... p. 26
- Figura 4.** Evolução do %PM médio para as progênies de ICS-1 e de TSH-1188, na avaliação nº 9. As diferenças de comportamento de mortalidade entre as duas progênies (DIF) estão indicadas pelas linhas verticais entre as 2 curvas..... p. 29
- Figura 5.** Associação entre o índice de doença (%) e o número de propágulos (esporos) / mL como inóculo inicial necessários para atingir o seu valor. A equação da reta que estima os valores de concentração dos propágulos é  $y = - 109,0 + 4,965x$ ..... p. 31
- Figura 6.** (a) Evolução do %PM (curvas de morte) nas 12 avaliações para os 10 clones de cacaueteiro testados para resposta à inoculação com isolado de ceratocystis, e (b) Regressão linear das médias do %PM de cada clone, por avaliação, em função dos Índices de Doença correspondentes. Os clones '10' e '51' correspondem aos CCN; os '2000' aos CEPECs; o '25' = HW-25; o '16' = PH-16; o '2' = SJ-02; e o '1188' = TSH-1188. O Índice de Doença (médias gerais do experimento) está representado por 'ID'. A Linha vertical em (b) representa a média geral de %PM para todo o experimento, incluindo clones e avaliações..... p. 35

**Figura 7.** Relações entre as médias do %PM dos clones e os respectivos coeficientes lineares da regressão ( $b$ , ver Tabela 6), que servem como indicadores da estabilidade do comportamento de resposta ao patógeno. A média geral do experimento para os valores de %PM e  $b$  é a confluência das linhas vertical sólida e horizontal tracejada (Índice de Doença). Grupo 'R' indica alta resistência, grupo 'MR' indica moderada resistência e grupo 'S' indica susceptível..... p. 39

**Figura 8.** Média da Altura Relativa de Lesão (ARL = altura da lesão/altura da planta) entre progênies de ICS-1 e de TSH-1188, após inoculação com ceratocystis e 90 dias de incubação. Os controles sem inoculação não apresentaram lesões mensuráveis..... p. 42

**Figura 9.** Média da Altura Relativa de Lesão – ARL entre progênies de ICS-1 e de TSH-1188 em diferentes idades, calculada através da relação altura da lesão/altura da planta. Os valores são médias de 5 plantas (repetições)..... p. 43

**Figura 10.** Distribuição geográfica dos pontos de coleta na região cacaueteira sul-baiana e norte do Espírito Santo. 'O' = pontos onde não foram encontradas plantas com sintoma; '●' = identificação de plantas com sintomas (amostras); '■' = presença confirmada de ceratocystis. Não inclui amostras cedidas (ver Tabela 6)..... p. 49

**Figura 11.** (a) foto de conídios e clamidosporos caracterizando a forma de resistência de ceratocystis denominada *Chalara* sp. (foto publicada no *website* pessoal de Thomas C. Harrington – [www.public.iastate.edu/~tcharrin/FimbDis.html](http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/FimbDis.html)); (b) foto das estruturas encontradas na massa micelial esbranquiçada dos isolados de ceratocystis coletados no sul da Bahia (este trabalho)..... p. 51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Análise de variância do percentual de plantas mortas (%PM) para os três parâmetros investigados..... p. 24
- Tabela 2.** Percentual de plantas mortas (%PM) – média total por avaliação, combinando as progênies de ICS-1 e TSH-1188 (Índice de Doença)..... p. 27
- Tabela 3.** Análise de Variância do %PM para os clones sob estudo..... p. 32
- Tabela 4.** Comparações entre as médias dos clones através do Teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ )..... p. 33
- Tabela 5.** Coeficientes de regressão linear ( $b$ ), intersecção ( $a$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para a regressão entre %PM dos clones e o Índice de Doença..... p. 37
- Tabela 6.** Distribuição de *Ceratocystis cacaofunesta* na Região cacauera da Bahia e norte do Espírito Santo. Esforço e sucesso de coleta..... p. 45

## EXTRATO

SANCHES, Charles Leonel Galvão, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, janeiro de 2007. **Murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) no sul da Bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacauero resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno.** Orientador: Leandro Lopes Loguercio.

A 'murcha-de-ceratocystis' é uma doença altamente perigosa para a cacauicultura, pois o principal efeito patogênico de seu agente causal – o fungo *Ceratocystis cacaofunesta* – é a morte da planta. Este fungo já foi relatado como estando presente na região cacauera sul baiana e do norte do Espírito Santo, cuja retomada do agronegócio cacau, após o advento da vassoura-de-bruxa, tem sido calcada na utilização de clones resistentes a esta enfermidade. Considerando que a maior parte destes clones recomendados tem aparentemente demonstrado alta susceptibilidade ao *Ceratocystis* sp, e que pouco se sabe sobre a distribuição e diversidade deste fungo nesta região, os objetivos deste trabalho foram estabelecer uma metodologia consistente e reproduzível para avaliação de genótipos de cacauero quanto às respostas de resistência-susceptibilidade à inoculação controlada de *C. cacaofunesta*, bem como conhecer a distribuição geográfica deste fungo nessa região, e aspectos preliminares de sua morfologia em cultura e armazenamento. Utilizou-se inoculações de esporos de *C. cacaofunesta* com concentrações definidas, em sistemas de cortes nos caules de plântulas (mudas), tanto oriundas de sementes (polinização aberta), quanto propagadas por estaquia (clones). Avaliou-se dois parâmetros principais como indicadores de resposta da planta ao fungo: percentual de plantas mortas (%PM) e altura relativa de lesão (ARL). Além disso, foram empregadas diversas técnicas e métodos estatísticos para analisar os resultados e padronizar as etapas do método de avaliação. Para os estudos do fungo, realizou-se expedições de coleta na região cacauera supracitada e procedeu-se com técnicas de isolamento, cultivo *in vitro*, repicagem e manutenção das

amostras de fungo coletadas. Os resultados dos estudos de avaliação de resposta de plantas à inoculação com *ceratocystis* mostraram que (i) os genótipos ICS-1 e TSH-1188 podem ser usados como referências de susceptibilidade e resistência, respectivamente, no processo de avaliação de outros genótipos; (ii) o parâmetro %PM, após inoculação com o fungo, é adequado para avaliação de genótipos; (iii) o período de avaliação em que se percebe a estabilização das mortes das plantas é o mais adequado para a diferenciação de genótipos; (iv) a concentração mais favorável de esporos de *ceratocystis* para inoculação é a de  $1 \times 10^5$  esporos/mL; (v) a aplicação do método em 10 clones de cacau, juntamente com a utilização de técnicas estatísticas especiais de análise, permitiu o agrupamento dos clones em resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis; (vi) o parâmetro ARL mostrou-se adequado como alternativa de avaliação de genótipos, quando não ocorre morte das plantas inoculadas. Os resultados referentes aos estudos com o fungo indicaram que o *C. cacaofunesta* concentra-se nos agroecossistemas de Camacã e Valença; além disso, foi possível identificar um variante morfológico alternativo para este fungo, provavelmente como sendo a forma de resistência a estresses ambientais. Tomados em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho devem servir para auxiliar programas de melhoramento genético do cacaueiro visando resistência à murcha-de-*ceratocystis*, bem como permitir melhores definições das estratégias de manejo para esta enfermidade.

## ABSTRACT

SANCHES, Charles Leonel Galvão, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, January, 2007. **Ceratocystis wilt (*Ceratocystis cacaofunesta*) at southern Bahia: methodology for selection of resistant cocoa-tree genotypes and preliminary descriptive studies of the pathogen.** Advisor: Leandro Lopes Loguercio.

The 'ceratocystis wilt' is a very dangerous disease for the cocoa crop, because the major pathogenic effect of its causal agent – the fungus *Ceratocystis cacaofunesta* – is the death of the whole cocoa-tree. This fungus is present at the producing region of southern Bahia and northern Espírito Santo, in which the recover of the cocoa agrobusiness has been centered onto the use of clones resistant to the witches' broom disease. Most of these recommended clones has shown an apparently high susceptibility to *Ceratocystis* sp, and little is known about the distribution and diversity of this fungus in this region. Hence, the objectives of this work were to establish a consistent and reproducible methodology to evaluate cocoa genotypes regarding their disease responses to a controlled challenging by *C. cacaofunesta*, as well as to gain knowledge about the geographical distribution of this fungus in this region and about preliminary aspects of its morphology after culture and storage. Defined *C. cacaofunesta* spore concentrations were used to inoculate cut stems of cocoa plantlets, originated both from open-pollinated seeds and vegetative propagation (clones). The plant response to the fungus was assessed by two parameters: the percentage of death plants (%DP) and the relative lesion-height (RLH). Moreover, several statistical techniques and methods were employed to analyze the data and standardize the steps of the evaluation methodology. For the studies on the fungus, collection trips were made to the cocoa producing region mentioned above, and isolation, *in vitro* culture and maintenance techniques were applied to the collected samples. The results of the study on the plant responses to ceratocystis showed that (i) the ICS-1 and TSH-1188 genotypes can be used as references for susceptibility and resistance, respectively, when evaluating other genotypes; (ii) the %DP

parameter, after plant inoculation with the pathogen, is suitable to genotypes assessment; (iii) the evaluation period in which ceases the increase of plant death is the most adequate for genotypic differentiation; (iv) the most appropriate ceratocystis' spore concentration for plant inoculation is  $1 \times 10^5$  spores/mL; (v) the validation of the method on 10 cocoa clones, with the application of special techniques for statistical analyses, allowed the classification of the clones as resistant, moderately resistant and susceptible; (vi) the parameter RLH was suitable as an alternative for genotypic assessment when there was no death of the ceratocystis-inoculated plants. The results concerning the studies about the pathogen revealed that the *C. cacaofunesta* is concentrated at the agroecosystems of Camacã e Valença; in addition, it was possible to identify a morphological variant for this fungus, likely as its resistance form to environmental stress. Taken together, the results here presented should be useful to aid breeding programs aiming at improving cocoa resistance to ceratocystis wilt, as well as to allow the establishment of better strategies to manage this disease.

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta arbórea oriunda do Alto Amazonas, presente do lado oriental e ocidental da Cordilheira do Andes. O seu cultivo se dá em vários países de clima tropical, sendo, atualmente, a Costa do Marfim, o maior produtor mundial com cerca de 1.200 ton/ano. O Brasil ocupou a 2ª posição mundial com 380.000 ton/ano, sendo a Região Cacaueira da Bahia a responsável por 90% dessa produção. Contudo, por volta de 1987 a região cacaueira passou por períodos decadentes em função de problemas climáticos, distorção nas políticas públicas relacionadas ao cacau, economia desfavorável e, principalmente, problemas agrônômicos – doença vassoura-de-bruxa.

Nesse momento as pesquisas se direcionaram na busca de genótipos resistentes à enfermidade em meios às plantas regionais e coleções vindas do exterior. A necessidade de uma solução urgente não permitia às pesquisas de melhoramento a realização de todos os testes com os genótipos e alguns produtores lançaram mão de materiais com indicativos de resistência os quais mais tarde, após o aparecimento de outra doença na região – a mucha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis cacaofunesta* – se mostraram suscetíveis a este fungo, ocasionando a morte de aproximadamente 85% do plantio em algumas fazendas.

A propagação dessa enfermidade entre as plantas se dá pelos tratos culturais normais da lavoura, principalmente a desbrota onde esporos vão de uma planta infectada para outra sadia através da ferramenta. A utilização de porta-enxertos resistentes à murcha-de-ceratocystis é fundamental para um desenvolvimento de clones já melhorados e que, por ventura, não apresentam boa resistência a doença.

Tendo em vista a sustentabilidade da produção ao longo do tempo e a preservação do ecossistema no qual está inserida a cacauicultura baiana, buscou-se neste trabalho estabelecer metodologia apropriada para avaliação de resistência de



genótipos (clones) de cacaueteiro ao *C. cacaofunesta*, visando caracterização de genótipos locais e identificação de potenciais porta-enxertos resistentes. Além disso, procurou-se estudar aspectos sobre a distribuição geográfica do fungo na região cacaueteira da Bahia, bem como sua morfologia e cultura. Espera-se com esses resultados prover alternativas que possam auxiliar programas de recomendação de clones e melhoramento do cacaueteiro quanto à resistência ao ceratocystis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O cacauero

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma planta arbórea, perene, típica de clima tropical, com centro de origem na Bacia Amazônica, provavelmente das nascentes dos rios Amazonas e Orenoco, de onde se disseminou basicamente em dois grandes grupos. O cacau 'Crioulo' (Criollo), originado do lado ocidental dos Andes e o grupo 'Forasteiro' (Forastero) do lado oriental. Tem-se ainda um terceiro grupo, o 'Trinitário', oriundo de um cruzamento entre o Crioulo e o Forasteiro, considerado como uma primeira tentativa de melhoramento (SOUZA & DIAS, 2001 e GRAMACHO *et al.*, 1992).

Foi introduzido na região Sul da Bahia em 1746, às margens do Rio Pardo na Fazenda Cubículo, hoje município de Canavieiras, por sementes vindas do Pará (SOUZA & DIAS, 2001 e GRAMACHO *et al.*, 1992). A partir daí a cultura se expandiu nessa região, onde as condições edafoclimáticas e a riqueza dos recursos naturais contribuíram bastante para a tornar essa região a principal produtora de cacau do país (FÓRUM NACIONAL DA AGRICULTURA, 1997). A cacauicultura foi tida por muito tempo como um dos principais fatores do desenvolvimento econômico do Estado da Bahia e de bastante importância na produção agrícola da região Amazônica (PINTO & PIRES, 1998), envolvendo investimentos em torno de R\$ 2,5 bilhões, aproximadamente 300.000 empregos diretos (FÓRUM NACIONAL DA AGRICULTURA, 1997).

A partir de 1987, esse monocultivo passa a ser fortemente comprometido pela queda dos preços, descapitalização e endividamento dos produtores, já antes desestimulados pelas políticas governamentais desfavoráveis, baixa competitividade

do setor, exploração de plantações já antigas e em decadência, manejo inadequado da lavoura, estresse hídrico por mais de seis anos consecutivos na região e a ocorrência, em 1989 (SOUZA & DIAS, 2001; COUTO, 2000; GRAMACHO *et al.*, 1992), do fungo causador da 'vassoura-de-bruxa' do cacaueteiro – *Moniliophthora perniciosa* (ex *Crinipellis*; AIME & PHILLIPS-MORA, 2005; CROZIER, 2006). Essa enfermidade causou danos na região, grandes o suficiente para quase dizimar a cacauicultura na região a ponto de sair de uma produção de 400.000 ton/ano para menos de 150.000 t/ano (DIAS, 2001).

As práticas de controle recomendadas não conseguiram deter os danos causados pela vassoura-de-bruxa com suficiente eficiência econômica e ambiental (CENEX, 1997; GRAMACHO *et al.*, 1992) e o controle genético se tornou o mais eficiente, principalmente a longo prazo. Isto levou as pesquisas e os interesses de investimento a se concentrarem no melhoramento genético, buscando fontes de resistência e produtividade. Dentre os trabalhos de melhoramento realizados com base em fontes de resistência, principalmente de coleções do exterior (como os ICS – “Imperial College Selection”, os SCA – Scavina, os TSH – “Trinidad Selected Hybrids”, etc.), o cruzamento do clone Scavina 6 com o clone ICS-1 originou o Theobahia, híbrido de alta produtividade quando comparado com variedades comuns, e de elevada resistência à vassoura-de-bruxa na região. Este foi então recomendado para retirada de propágulos visando a expansão da área enxertada enquanto não se tinham definidas variedades clonais melhoradas pelo CEPEC – Centro de Pesquisas do Cacau (SOUZA & DIAS, 2001).

Ocorre que esse híbrido foi largamente utilizado por alguns produtores e ainda se apresentaram altamente susceptíveis ao 'Mal-do-facão' do cacaueteiro ou 'murcha-de-Ceratocystis' (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halted), o que levou a morte de inúmeras plantas na região causando cerca de 80% de morte em algumas áreas (ALAN W. V. POMELLA, informação pessoal).

## **2.2. O fungo *Ceratocystis cacaofunesta***

O fungo *Ceratocystis fimbriata* foi descrito pela primeira vez em 1918 no Equador por Rorer (DELGADO & SUÁREZ, 2003; DELGADO, 2003; ALARCON, 1994;

MATA, 1991; OCAMPO R. & CORREA N., 1978; GUERRERO, 1975; CHONG, 1961) causando o cancro-do-cacaueiro; mesma enfermidade causado por *Cerastomella fimbriata* (CHONG, 1961). Como sinônimo tem-se *Ceratostomella fimbriata*, *Endocenidiophora fimbriata*, *Ophiostoma fimbriata*, *Rostrella coffea*, *Shaeroma fimbriata* (CHONG, 1961). É um organismo pertencente ao Domínio EUKARYA; Reino EUMYCOTA; Classe dos ASCOMYCETES; Ordem OPHIOSTOMALES; Família OPHIOSTOMATACEAE; e Gênero *Ceratocystis*. A espécie *Ceratocystis fimbriata* descrito por Ellis & Halsted (WINGFIELD *et al.*, 2006; DELGADO & SUÁREZ, 2003; MARIN *et al.*, 2003; DELGADO, 2003; ALARCON, 1994; MATA, 1991; OCAMPO R. & CORREA N., 1978; GUERRERO, 1975; CHONG, 1961) ataca plantas de diversas famílias como *Ipomea batata* (BARNES *et al.*, 2001; CHONG, 1961; ); *Coffea arábica* L. (CAICEDO, 2004; MEDEIROS *et al.*, 2003; MARIN *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2001; Alarcon, 1994; GUERRERO, 1975; CHONG, 1961); *Crotolaria* sp. L. (ALARCON, 1994; CHONG, 1961) *Hevea brasiliensis* (MARIN *et al.*, 2003; CHONG, 1961); *Plantanus* sp. L. (BARNES *et al.*, 2001; WITTHUHN *et al.*, 1999; ALARCON, 1994; SMITH, 1992; CHONG, 1961); ***Cássia fistula*** L. (ALARCON, 1994; ); *Cajanus cajan* Millsp (ALARCON, 1994; GUERRERO, 1975); *Mangifera indica* L. (CARVALHO & CARMO, 2002; GALLO *et al.* S. D.); *Eucalyptus* sp. (ZAUZA *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2001), *Daucus carota* L. (CARVALHO & CARMO, 2002); *Populus tremuloides* (BARNES *et al.*, 2001); *Prunus* sp. (BARNES *et al.*, 2001); *Citrus* sp. (BARNES *et al.*, 2001) e *Acacia mearnsii* De Wild (SANTOS & FERREIRA, 2003).

Além disso, existe uma grande lista de hospedeiros, elaborada por Baker *et al.* (2003) e Harrington (2004), apresentando 25 diferentes hospedeiros (incluindo os citados acima), com os suas respectivas regiões de identificação datadas de 1900 a 2003.

O isolado do cacaueiro, no entanto, foi re-descrito mais recentemente por Engelbrecht & Harrington (2005) como *Ceratocystis cacaofunesta*, através de técnicas de biologia molecular, e observação de diferenças morfológicas, onde se utilizou 37 isolados de cacau (*Theobroma cacao*), batata (*Ipomoea batatas*) e *sycamore* (*Platanus* spp.).

Foi constatado pela primeira vez em 1997 na Bahia em mudas propagadas para enxertia (BEZERRA, 1997) e em 1998 em plantas adultas (BEZERRA *et al.*, 1998). Possui peritécios que ficam imersos, ou parcialmente imersos, no substrato. Estes são pretos, globosos, com rostro longo, cilíndrico e fimbriado possuindo ostíolo na

extremidade, por onde ocorre a liberação dos ascósporos. Os ascósporos são muito pequenos (4-7 $\mu$ m de largura e 3-4 $\mu$ m de diâmetro), elípticos, achatados, hialinos, e são extrusados com uma massa gelatinosa pela da extremidade do rostro (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005; CHONG, 1961). Normalmente quando há um aumento de temperatura e umidade, essa massa que envolve os ascos absorve umidade e aumenta de tamanho exercendo uma pressão de dentro para fora do peritécio, sendo o rostro o único lugar para o material sair e ser exposto ao ambiente (GUERRERO, 1975; CHONG, 1961).

Chong (1961), Baker et al. (2003) e Harrington (2004) relatam que em meios artificiais de cultivo há a formação de uma colônia inicialmente esbranquiçada, pela formação de endoconídios hialinos e esverdeados, escurecendo posteriormente após a formação de macroconídios escuros, seguindo-se um maior escurecimento após a formação dos peritécios. Chong (1961) relata que os microconídios e os endoconídios são originados no interior dos conidióforos. São septados, de 150 a 400  $\mu$ m de largura por 4 a 6 $\mu$ m de diâmetro, hialinos e têm forma de ladrilhos. Em dado momento do seu desenvolvimento, cada segmento limitados por septos, se diferencia adquirindo parede própria e o crescimento empurra os outros. Os endoconídios então saem em cadeias ou sozinhos ao romper-se do conidióforo.

Galli (1980) detalha que os endoconídios são hialinos, unicelulares, cilíndricos, catenulados e têm entre 8-18 x 1,5-3 $\mu$ m; e os macrononídios são elípticos, com 8-15 x 8-13 $\mu$ m, de coloração verde-oliva escuro, simples, às vezes em cadeia. Sobre os peritécios relata ainda, além das características citadas acima, que têm entre 90-270 $\mu$ m de diâmetro, providos de rostro longo, cilíndrico, medindo 500-700 $\mu$ m, fimbriado e mais claro na extremidade.

Engelbrecht & Harrington (2005) relata, além das características supra-citadas em relação a formato, cor, etc., tamanhos levemente diferentes das estruturas do isolado de cacau (*C. cacaofunesta*). Os peritécios têm de 110-250 $\mu$ m x 120-250 $\mu$ m. E os ascósporos têm de 5,0-7,5 $\mu$ m x 3,5-5,0 $\mu$ m.

Em ambiente natural (campo) a infecção das plantas ocorre através de portas de entrada como cortes efetuados por ferramentas em práticas comuns de manejo da cultura como a desbrota e a poda (Baker & Harrington e HARRINGTON 2004; GUERRERO, 1975; MARIN *et al.*, 2003; CHONG, 1961; DELGADO & SUÁREZ, 2003) e através do ataque de coleobrocas como *Xyleborus* sp. (Coleóptera-Scolytidae)

(Baker & Harrington e HARRINGTON 2004; DELGADO & SUÁREZ, 2003; GUERRERO, 1975; OCAMPO & CORREA, 1978; GOITÍA & ROSALES, 2001; LAWRENCE et al., 1991; CHONG, 1961) que possuem na região frontal do abdome estruturas chamadas de micanjas de onde já foi isolado o fungo *C. cacaofunesta*, esses insetos quanto penetram nas plantas podem já levar propágulos do fungo para o interior da planta (CHONG, 1961). Também deixam no solo, na região próxima ao tronco uma serragem que é rica em clamidósporos, sendo esta uma potencial fonte de inóculo que pode ser levado pela água da chuva ou até mesmo pelo homem (GUERRERO, 1975).

Além disso, Marin *et al.* (2003) diz que partículas de solo podem levar estruturas de propagação do fungo e transmiti-lo até mesmo de uma fazenda para outra (CASTRO, 1991); Witthuhn *et al.* (1999) afirma que a disseminação de espécies de *Ceratocystis* normalmente está relacionada a besouros (Coleóptera: Scolytidae e Nitidulidae). Wood & Lars (1985), falando sobre as formas de disseminação, relatam que esporos de *C. cacaofunesta* são disseminados pelo inseto *Xyleborus spp.* Embora esse coleóptero seja encontrado com frequência em plantas mortas pelo fungo, não há consenso entre pesquisadores sobre o papel de *Xyleborus spp.* na disseminação da doença. Alguns acreditam que o inseto penetra em tecidos já colonizados pelo fungo, enquanto outros afirmam que o inseto é essencial para disseminação da doença (Wood & Lars, 1985).

Ainda há registros sobre a disseminação de *Ceratocystis sp.* pelo contato entre as raízes de batata-doce (*Ipomea batatas L.*), mangueira (*Mangífera indica L.*), plátano (*Platanus spp.*), e eucalipto (*Eucalyptus spp.*) (BAKER & HARRINGTON, 2001). O *C. fimbriata* também causa a seca da mangueira, mofo cinzento da seringueira, podridão escura/seca em inhame, murcha-de-Ceratocystis em acácia-negra e, em cacauero é conhecido como 'Murcha-de-ceratocystis' ou 'Mal-de-machete', ou ainda, 'Mal-do-facão' (Baker & Harrington e HARRINGTON, 2004).

### **2.3. A doença**

A murcha-de-Ceratocystis é uma enfermidade letal para o cacauero (ALARCON, 1994) e tem causado danos econômicos na cacauicultura do Brasil desde 1978 (BASTOS E EVANS, 1978) e em países vizinhos.

No Equador, onde foi descrita pela primeira vez (DELGADO & SUÁREZ, 2003; DELGADO, 2003; ALARCON, 1994; MATA, 1991; OCAMPO & CORREA, 1978; GUERRERO, 1975; CHONG, 1961; ENRIQUEZ & SORIA, 1984), causou a morte de um grande número de árvores de cacau na década de cinqüenta, incluindo genótipos do chamado 'complexo nacional do Equador', um cacau fino de alto valor para este país, com aroma e sabor típico (ALARCON, 1994), o qual é classificado como suscetível (ENRIQUEZ & SORIA, 1984). Também causou a morte de cerca de 35.000 plantas do clone ICS-1 entre os anos 50 e 60 (DELGADO, 2003). Até hoje um número indeterminado de árvores foi eliminado devido à enfermidade (DELGADO & SUÁREZ, 2003) que, quase sempre está associada neste país ao ataque de colebrocas (CHONG, 1961).

Na Venezuela, foi identificada pela primeira vez em 1951 e provocou a destruição de 20% das plantas na zona oriental e no litoral do Estado de Aragua e nos vales de Choroní e Cruao (ENRIQUEZ & SORIA, 1984; GUERRERO, 1975; DOMINGUEZ & VELÁSQUEZ, 1972; CHONG, 1961). Goitía & Rosales (2001) ainda registram que neste Estado e no Estado de Sucre, a enfermidade causou a morte de 20 a 50% das árvores de cacau. Calcula-se que mais de 120.000 plantas enfermas foram queimadas nesse país (CHONG, 1961).

Na Colômbia, causou grandes estragos na zona de Puerto Tejada no início do ano de 1953 e foram eliminadas mais de 5.000 árvores de cacau (CHONG, 1961); também atacou 50% das plantações de cacau do município de Sofía, e, no Valle del Cauca, não existem plantações saudas (GUERRERO, 1975).

Entre 1969 e 1971 a Costa Rica teve de 57 a 73% dos cacauzeiros mortos dos nove cultivares mais suscetíveis, sendo essas mortes sempre associadas ao ataque de *Xyleborus* spp. (LAWRENCE, s.d.). Já Guerrero (1975) relata que as perdas nesse país são de 5% da população total de plantas de cacau por ano.

Em Trinidad (CHONG, 1961), essa doença é registrada desde 1932, sendo que em 1959 houve perdas de 2,5% das plantações (GUERRERO, 1975).

Também no México e em Porto Rico, a *Ceratostomella* (como é conhecida nestes países) é registrada (CHONG, 1961), bem como na Guiana, Peru, República Dominicana e Guatemala, onde aparece também atacando plantas do gênero *Theobroma* (Baker & Harrington e Harrington, 2004).

Na região cacauzeira do Estado da Bahia a enfermidade já se encontra em ampla disseminação e as mortes já somam o equivalente a 24% das plantas,

principalmente aquelas derivadas do clone ICS-1, como a variedade Theobahia (RAM, 2002; SILVA & LUZ, 2000).

A partir de 1989 com o aparecimento da vassoura-de-bruxa do cacau na região Sul da Bahia, as pesquisas se concentraram na seleção de plantas resistentes a esta enfermidade. Dentre os produtos dessa seleção trabalhou-se com o genótipo Scavina, oriundo de coleções do exterior o qual apresentou boa resistência ao patógeno, e o ICS-1 (*Imperial College Selection* – Trinidad), um cacau Trinitário, de porte médio, que proporcionou um maior número de plantas por área e produtividade mais alta. Do cruzamento desses dois materiais obteve-se, entre outros, o Theobahia (Scavina-6 x ICS-1), um genótipo que serviria para futuras seleções na região. Contudo, alguns produtores utilizaram as sementes para formação de plantios comerciais os quais hoje se encontram completamente destruídos pelo ataque da murcha-de-Ceratocystis, já que esse genótipo tem demonstrado ser de alta suscetibilidade.

A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) mantém em suas áreas experimentais um dos maiores bancos de germoplasmas do cacau do mundo, há mais de 20 anos. Neste banco, encontra-se materiais de diversos países que servem, entre outras finalidades, para avaliação quanto à resistência e para novos cruzamentos visando o controle de doenças, maior produtividade, etc. Esse Banco hoje se encontra severamente ameaçado pela presença de *C. cacaofunesta* que tem levado a morte muitos clones principalmente os originados do grupo Criollo (observado em visita ao banco ativo de germoplasma da CEPLAC).

Também em plantios da CEPLAC, na Estação Joaquim Bahiana (município de Itajuípe-BA), a murcha-de-Ceratocystis provocou a morte de toda quadra do clone ICS-1 utilizado para experimentação (Figura 1). Há que se discutir, no entanto, que se trata de uma quadra em que há muito não se fazia tratamentos culturais, o que, portanto, eliminaria a probabilidade de disseminação do fungo pelos tratamentos culturais, permitindo dizer que esta aconteceu por outros meios. A área se encontrava em condições precárias de cultivo, com alta infestação de plantas invasoras, gerando grande competição; a nutrição dos cacauzeiros não estava sendo mantida, o manejo de copa inadequado, etc (observado em visitas feitas ao local). Isso pode ter levado essas plantas a situações de estresse, atraindo coleobrocas que podem ter sido as responsáveis pela disseminação do fungo.





**Figura 1:** Plantas do clone ICS-1. Área experimental da CEPLAC (Estação Experimental Joaquim Baiana) município de Itajuípe, infestada por *C. cacaofunesta*.

Como ainda é uma doença pouco estudada nesta região, o conhecimento de sua variabilidade genética bem como a busca por fontes de resistência em cacau são necessários para que se implementem medidas de controle mais eficazes. A preocupação se intensifica na medida em que a cacaucultura da região, responsável por mais de 80% da produção nacional, vem sofrendo um processo de renovação com clones resistentes à vassoura-de-bruxa, sendo necessário portanto a avaliação da resistência destes clones quanto ao ‘mal-do-facão’ (ALAN W. V. POMELLA, informação pessoal).

Os sintomas externos da murcha-de-Ceratocystis são clorose e murcha das folhas que secam e morrem, num prazo de 2 a 4 semanas, permanecendo aderidas à planta (SILVA *et al.*, 2004; DELGADO & SUÁREZ, 2003; CHONG, 1961; LAWRENCE, s.d.); num processo mais avançado, o escurecimento do caule ou ramo tomando uma coloração marrom acastanhada (SILVA *et al.*, 2004; GUERRERO, 1975). Esses sintomas, segundo Silva *et al.* (2004) e Alarcon (1994), estão sempre associados com galerias feitas por insetos Scolitidae, apesar de Saunders (1963) relatar que é impossível detectar ou isolar *C. cacaofunesta* destes insetos, nem tão pouco ocorrer

infecção de árvores são atacadas pelos mesmos. No entanto o controle desses insetos diminui a incidência da enfermidade em campo.

Delgado (1964), citado por Alarcon (1994), relata uma morte descendente das folhas, seja em ramos ou em toda planta, até o ponto onde houve a infecção. O murchamento revela um aspecto parecido com folhas jovens que acabam de aparecer em um broto. Arbelaez (1957), citado por Alarcon (1994), discutindo sobre o avanço da lesão interna, relata um crescimento mais rápido no sentido do ápice da planta. Segundo ele, isso se deve ao fato do patógeno atacar principalmente o xilema, o que o conduz com mais eficiência para cima. Apesar disso, Arbelaez (1957) observa que há uma colonização quase uniforme também no sentido horizontal.

A permanência das folhas secas nos ramos e a uniformidade de colonização principalmente no sentido horizontal são os principais diferenciais visuais entre a murcha-de-Ceratocystis e a murcha-de-Verticillium a qual apresenta queda das folhas e ramos finos após cerca de um mês, e tem lesões internas mais pontuais relacionadas à colonização maior dos vasos do xilema desde as raízes até as folhas (RESENDE, 1994).

Os métodos de controle químicos e culturais não têm dado respostas satisfatórias (GUERRERO, 1975; ESPINOZA & DELGADO, 1970; LAWRENCE, s.d.). O uso de fungicidas, por exemplo, é inviável (ALARCON, 1994), pois, como a entrada do patógeno se dá por ferimentos na planta, o que é quase inevitável em um cacauel, ter-se-ia que se fazer pulverizações regulares, o que é difícil, além de muito custoso (GUERRERO, 1975).

Como controle cultural, recomenda-se a eliminação mediante queima das plantas já mortas (ALARCON, 1994; GUERRERO, 1975). Para as que apresentam os sintomas iniciais recomenda-se a retirada, com instrumento esterilizado, de toda parte afetada no tronco ou caule, e aplicação de uma pasta ou calda desinfetante (ALARCON, 1994; GUERRERO, 1975). No local se forma um cancro cicatrizado e a planta continua viva e produzindo. A discussão, no entanto, é que, quando se observa que a planta está infectada, o processo, na maioria dos casos, já está avançado e é irreversível.

A maioria dos autores concordam que o controle genético com a utilização de genótipos resistentes é o mais eficiente (SILVA *et al.*, 2004; DELGADO, 2003; DELGADO & SUÁREZ, 2003; Baker & Harrington e HARRINGTON, 2004; ALARCON, 1994; OCAMPO

& CORREA, 1978; GUERRERO, 1975; DOMINGUEZ & VELASQUEZ, 1972; DELGADO, 1970; CHONG, 1961; LAWRENCE et al, 1991), por ser mais estável e ecologicamente correto, dentro da perspectiva de manejo integrado da cacauicultura (SANCHES *et. al.*, 2005).

Alguns genótipos são citados como resistentes ao *C. cacaofunesta*:

- UF-29, UF-296, UF-613, CC-41, CC-38, CC-42, IMC-67, PA 121, SPA-9 e POUND-12 (LAWRENCE, s.d.);
- IMC-67, POUND-12, EET-399 e EET-400 (DELGADO & SUÁREZ, 2003);
- IMC-47 e IMC-67 – resistente a isolado Equatoriano e suscetível a isolado Brasileiro (DELGADO & SUÁREZ, 2003);
- OC-63 – maior possibilidade de resistência em autofecundação, OC-61Xoc-77 – melhor cruzamento quanto à resistência e o OC-61 como melhor em transmitir características de resistência em seus cruzamentos (DOMINGUEZ R. & VELASQUEZ, 1972);
- AMA-10, EBC-122, EBC-138, EBC-142, EBC-148 e LCT-EEN 73 – resistentes tanto à colonização como à reprodução do fungo. AMA-4, AMA-14, AMA-9, CUR-3, LCT-EEN 57 E LCT-EEN 382 – resistentes à reprodução do patógeno (DELGADO, 2003).
- O híbrido de PA-46xIMC-67 e os clones SPA-9, POUND-12, IMC-67 e PA-121 (OCAMPO & CORREA, 1978).
- EET-112, EET-194, EET-199, IMC-67 – da coleção da EETP (Estación Esperimental Tropical Pichilingue); os cultivares 49H98, L56H45, L34H07, L51H36 e L42H65 da coleção do CCAT (Finca Experimental La Buzeta, del Centro de Cacao de Aroma Tenguel) (ALARCON, 1994).

SILVA *et al.* (2004) relatam um trabalho de avaliação da resistência de clones de cacau do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau, em Ilhéus-BA, utilizando o método de Delgado e Echandi (1965), com isolado Brasileiro. Os clones avaliados do BAG foram suscetíveis a altamente suscetíveis; os clones SIC-644 e SIC-812 apresentaram-se como moderadamente resistentes e a variedade 'Jaca' se comportou com maior resistência, acompanhada pelos clones SIAL-577, CB-205 E CBI-205. Contudo os autores concluem que o isolado da Bahia é altamente agressivo, pois até o IMC-67, que na literatura é bem aceito como resistente, foi classificado como suscetível (SILVA *et al.*, 2004).

## 2.4. Resistência de plantas a doenças

O emprego da resistência genética no controle de doenças em plantas é um dos mais significativos avanços tecnológicos da agricultura (MICHEREFF, s.d.), sendo uma das formas mais eficientes para se controlar fitopatógenos. Com esse intuito, Luz et al. (2000) testaram o nível de resistência de alguns clones de cacaueteiro ao *C. cacaofunesta*, clones esses utilizados no programa de melhoramento genético para resistência a *M. pernicioso* (vassoura-de-bruxa) e *Phytophthora spp*, (podridão parda). Nenhum dos clones estudados apresentou resistência a *C. cacaofunesta*. Em outro estudo, foram avaliados 212 genótipos de cacaueteiro quanto à resistência a *C. cacaofunesta*. O cacau cv. Jaca foi o único genótipo testado que apresentou resistência ao patógeno (SILVA, 2003).

Considerando que técnicas distintas foram utilizadas para a avaliação deste comportamento de resistência (principalmente aplicadas em outros países, genótipos, isolados e sistemas), o estabelecimento de uma técnica padronizada e consistente para avaliação de genótipos, com possibilidade de aplicação em diversos sistemas, é altamente recomendável. Além disso, o conhecimento sobre a variabilidade genética de qualquer patógeno é crucial antes que se inicie programas de melhoramento genético de plantas para resistência a esses organismos. Segundo Harrington (2000), existe uma diversidade genética e fisiológica muito grande dentro das espécies de *C. cacaofunesta*. Logo, estudos sobre aspectos metodológicos envolvidos na avaliação do comportamento de resposta de genótipos de cacaueteiro a inoculações controladas de *C. cacaofunesta*, bem como um maior conhecimento sobre a distribuição geográfica e diversidade genética deste fungo na região cacaueteira baiana e capixaba, são imprescindíveis para uma contribuição aos trabalhos de melhoramento genético visando resistência de cacaueteiro à *murcha-de-ceratocystis*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Avaliação da concentração ideal de inóculo

Utilizou-se plantas de TSH-1188 como controle negativo e de ICS-1 como controle positivo, isto é, como genótipos-referência de resistência e susceptibilidade, respectivamente (SILVA ET AL, 2006; ALAN W. V. POMELLA, dados não publicados), sendo ambos propagados via seminal com polinização aberta. A idade das plantas utilizadas, bem como a forma de cultivo nos estádios iniciais, foram diferentes de acordo com o experimento: para os experimentos de comparação por morte de plantas, as idades eram de aproximadamente 4 meses, e o cultivo feito em tubetes com solo (~ 290 mL); para os experimentos de altura relativa de lesão (ver Metodologia, item 3.3), as idades variaram de 6 a 10 meses e o cultivo foi feito em sacos de aproximadamente 12 cm diâmetro x 20 cm altura (~2,2 L). O inóculo foi obtido a partir do isolado do fungo *Ceratocystis cacaofunesta* ALF-78 (Almirante Fungo-78) da Fazenda Almirante, o qual é mantido preservado em frascos com pedaços de papel filtro, em geladeira. O fungo foi repicado em placas de Petri com meio BDA acidificado e mantido em câmara com temperatura de 25°C, por 8 dias. À colônia foi acrescentado água destilada estéril, raspou-se com lâminas de vidro e filtrou-se a suspensão inicial em gaze estéril. A inoculação nas plantas foi feita através de corte superficial de 1,0 a 1,5 cm de comprimento e 0,3 a 0,5 cm de profundidade na haste das mudas com bisturi e deposição de 20µL de suspensão de inóculo nas seguintes concentrações: 'zero' (concentração '1');  $5 \times 10^3$  (conc. '2');  $1 \times 10^4$  (conc. '3');  $5 \times 10^4$  (conc. '4');  $1 \times 10^5$  (conc. '5') e  $5 \times 10^5$  (conc. '6') esporos/mL. Plantas controle foram inoculadas apenas com água destilada estéril. No local da incisão, foi feita uma câmara úmida, logo após a aplicação do inóculo, com algodão umedecido em água destilada estéril e recoberto com filme de polietileno por 2 dias.

Após este período as plantas foram observadas, avaliando-se o aparecimento de sintomas característicos da doença ou a morte das plantas (ver a seguir). Após os 2 dias de câmara úmida, realizou-se um total de 13 avaliações da seguinte forma: no 10º, 12º, 17º, 20º, 24º, 35º, 40º, 45º, 52º, 55º, 59º, 63º e 70º dia, quando encerrou-se o experimento. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos completos casualizados, com 4 repetições (blocos). Cada repetição (unidade experimental) foi composta de 4 plantas de cada genótipo, num total de 24 plantas por tratamento.

Uma das variáveis utilizadas para distinguir os genótipos quanto à resistência à murcha-de-Ceratocystis foi o Percentual de Plantas Mortas (%PM), definido como sendo o número de plantas mortas do total da unidade experimental (4 plantas) em cada avaliação. Os valores plotados por cada tratamento de genótipo e concentração de inóculo correspondem à média dos 4 blocos na respectiva avaliação. Foram calculados o %PM para cada concentração nas 13 avaliações para as progênies dos genótipos ICS-1 e TSH-1188 utilizados. Os dados foram tratados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e teste F (pacote estatístico 'SAEG' V-5,0/1993, Viçosa-MG), a um nível de significância de  $P < 0,05$ , considerando-se as fontes de variação 'concentração' de inóculo (6 tratamentos), 'genótipos' (2 tratamentos) e 'épocas' de avaliação (13 tratamentos), tanto de forma individual quanto em relação à interação entre eles.

Avaliou-se a curva de progresso da doença, isto é, o avanço da morte das plantas com o decorrer do tempo. Além disso, definiu-se o parâmetro 'Índice de Doença' do experimento como uma forma de se generalizar os resultados entre diferentes experimentos, realizados em condições distintas. Este parâmetro foi estimado como sendo a média de plantas mortas do experimento como um todo.

Outro parâmetro definido para a avaliação comparativa entre genótipos de diferentes respostas de resistência foi a 'DIF', que é a diferença de mortalidade média entre eles, em cada tempo de avaliação; é fornecida pela fórmula 'DIF = %PM médio<sub>(genótipo suscetível)</sub> - %PM médio<sub>(genótipo resistente)</sub>'. No caso deste experimento, este parâmetro serviu para delimitar as diferenças entre os genótipos extremos de susceptibilidade e resistência - ICS-1 e TSH-1188, respectivamente.

Considerando apenas o período em que o progresso da doença é crescente (ou seja, entre a 1ª e 9ª avaliação, quando então ocorre a estabilização – ver item 4.1.2.), associou-se as avaliações com o parâmetro de morte. Assim, em um procedimento de regressão linear, o valor médio de %PM do experimento em cada avaliação (Índice de Doença) foi utilizado como variável independente e o nº de dias após a inoculação como variável dependente. O modelo da regressão obtido (equação da reta) permite estimar o nº de dias que se necessita para avaliar o experimento, para um determinado Índice de Doença do mesmo (ver item 4.1.2).

### **3.2. A avaliação da resistência de clones de cacauero ao *C. cacaofunesta***

O trabalho foi conduzido em viveiro com telado de sombrite a 70% no Centro de Pesquisas da Empresa Almirante Cacau Agrícola Comércio e Exportação Ltda. (município de Barro Preto- BA), entre junho e agosto de 2006. As mudas, obtidas por estaquia de ramos plagiotrópicos em tubetes, foram produzidas e mantidas pelo Instituto Biofábrica de Cacau (organização social vinculada ao Governo do Estado da Bahia, Banco do Pedro, Ilhéus-BA), no período de março-junho/2006.

Os 10 clones utilizados [CCN-10; CCN-51; CEPEC's 2002 (VB-1151), 2007 (VB-681), 2008 (VB-547), 2009 (VB-663); HW-25; PH-16; SJ-02 e TSH-1188] foram escolhidos dentre aqueles considerados com elevado nível de resistência à enfermidade vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa* – AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), dentre os recomendados pela CEPLAC para a renovação da lavoura cacauera do Sul da Bahia, e propagados massivamente pelo Instituto Biofábrica do Cacau para sua distribuição aos cacauicultores. Os clones CCN-10 e CCN-51 são oriundos do Equador. Os clones 'CEPEC' são oriundos de plantios comerciais da região cacauera da Bahia, selecionados pelo Centro de Pesquisas do Cacau (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauera – CEPLAC), localizado em Ilhéus-BA. Os clones HW-25, PH-16 e SJ-02 foram selecionados por agricultores e o TSH-1188 é uma introdução de Trinidad e Tobago.

O isolado e o procedimento para a preparação do inóculo foi o mesmo descrito no item anterior. Em seguida fez-se a aferição da concentração de propágulos em câmara de Neubauer para  $1 \times 10^5$  esporos/mL para aplicação em

todos os tratamentos (clones). A inoculação foi feita em corte realizado com bisturi, sentido vertical (1,5 cm), com 4 mm de profundidade e a 4-5 cm de altura a partir do colo da plantas. Neste corte foi feita a deposição de 20 µL de suspensão de inóculo, na concentração indicada. Plantas controle foram inoculadas com água destilada estéril. Após a aplicação do inóculo, colocou-se algodão umedecido com água destilada estéril e uma cobertura com filme de polietileno, formando a câmara úmida citada anteriormente por 48 horas. Após, as plantas foram observadas todos os dias até o aparecimento da primeira morte ao 11<sup>o</sup> dia (avaliação n<sup>o</sup> 1). A partir daí, as demais avaliações foram aos 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51 e 55 dias, totalizando-se 12 avaliações. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados com 3 repetições (blocos), sendo 10 tratamentos (clones) e 5 plantas por unidade experimental (repetição).

O parâmetro utilizado para a avaliação da resistência dos clones de cacau foi o %PM após inoculação com *C. cacaofunesta* em 12 avaliações, que serviu para acompanhar o progresso da doença de modo similar ao que foi descrito anteriormente. Estes resultados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) conjunta, considerando-se os 3 blocos, os 10 clones e as 12 avaliações, incluindo-se os testes de médias apropriados (ver Resultados e Discussão).

Como indicador de ambiente (isto é, das condições experimentais específicas), foi utilizado o Índice de Doença descrito anteriormente, neste caso correspondendo à média de todos os clones em cada avaliação. Este índice serviu como critério delimitador de resistência e susceptibilidade, e a média do %PM de cada clone foi o parâmetro utilizado para avaliação. Foram considerados como resistentes aqueles clones com %PM médio mais baixas, ao longo das avaliações.

Foi também definido um elemento complementar para refinar a avaliação, denominado de 'estabilidade' da resistência. Para este estudo relativo a cada clone, utilizou-se a metodologia apresentada por Finlay e Wilkinson (1963) e Eberhart e Russel (1966), na qual a soma de quadrados da interação clone x avaliação, adicionada à soma de quadrados devido ao efeito de avaliação foi decomposta em efeitos de avaliação para cada um dos clones. Estas, por sua vez, foram decompostas em efeitos lineares e desvios da regressão. Como parâmetros para esta estabilidade, utilizou-se o coeficiente de regressão  $b_k$  (Eberhart e Russel, 1966), obtido, para cada um dos clones, regredindo-se as médias de cada clone contra a média de todos os clones (Índice de Doença) em cada uma das 7 primeiras



avaliações. Os clones foram caracterizados como de estabilidade intermediária quando apresentavam coeficiente de regressão linear,  $b_k$ , igual ou próximo à unidade (Eberhart e Russel, 1966), correspondendo a uma resposta moderada dos clones nas diversas avaliações. Aqueles com valores de  $b$  superiores a 1,0 correspondem a maiores incrementos na mortalidade das plantas ao longo do período de avaliação (mais instáveis) do que aqueles com valor de  $b$  menor que 1,0 (mais estáveis). A estabilidade absoluta é considerada atingida quando  $b=0$ ; nesse caso o comportamento do clone se mantém constante, independentemente do índice de doença (ou da avaliação).

Como parâmetro de 'previsibilidade' de comportamento, foram considerados os desvios da regressão linear estimados pelos respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ); considerou-se como de alta previsibilidade de comportamento o clone no qual a curva estimada apresentou-se com baixo desvio de regressão linear e, conseqüentemente, alto coeficiente de determinação.

Em cacau, esta metodologia geral de análise e comparação de comportamentos de resistência foi utilizada por Pinto & Silva (1987), Pinto et al. (1987, 1996), Silva et al. (1995) e Yamada et al. (1999). Este método também foi utilizado por Bhardwaj & Singh (1983) e Prabhu et al. (1991) para se estudar a interação entre as plantas e seus patógenos em outras culturas. A título de teste para validação do método desenvolvido neste trabalho, os clones aqui avaliados vem sendo recomendados para o Sul da Bahia, por serem sabidamente resistentes a *Moniliophthora perniciosa*.

### **3.3. Altura relativa de lesão.**

Em experimentos de avaliação da resposta à inoculação com *ceratocystis* onde não houve morte das plantas, mediu-se o tamanho das lesões verificadas após 90 dias de incubação. As mudas tiveram seus caules dissecados longitudinalmente, sendo medidas a altura da planta, bem como a altura da lesão a partir do ponto de inoculação, utilizando-se fita métrica flexível e paquímetro. Foram utilizados os genótipos ICS-1 e TSH-1188, com mudas seminais como descrito acima (item 3.1). A concentração de inóculo de *ceratocystis* utilizada foi de  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL, e o

controle foi água estéril, sendo igual o número de plantas para cada um. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se como repetições 6 plantas por genótipo e por tratamento de inoculação (com e sem patógeno).

Nas avaliações de tamanho de lesão em idades diferentes, inoculou-se plantas com idades de 6, 8 e 10 meses do mesmo clone nas mesmas condições. O experimento foi conduzido em blocos conforme a idade, onde cada um foi composto por 5 plântulas (repetições) de cada genótipo inoculadas com 20  $\mu\text{L}$  de suspensão a  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL. Foram feitas avaliações periódicas buscando-se plantas mortas e ou com sintomas, durante 90 dias, após o que as plantas foram dissecadas para avaliação do tamanho da lesão.

[OBS: outros experimentos preliminares foram realizados testando diferentes tipos e números de corte; como os resultados não foram apresentados, a metodologia correspondente não foi descrita.]

### **3.4. Coleta de isolados de *C. cacaofunesta***

Foram feitas expedições de coleta em toda a região cacauera do Sul da Bahia e norte do Espírito Santo, buscando-se plantas de cacauero com sintomas da murcha-de-Ceratocystis. Para as coletas, adotou-se o critério de subdivisão em agroecossistemas presentes na região, já utilizados para coleta de vassouras-de-bruxa. Nos locais determinados, buscou-se visualizar plantas com sintomas numa caminhada aleatória na área plantada. Ao se encontrar, foi retirado uma amostra do tronco ou ramo sintomático, sendo o material empacotado em sacos de papel e identificados com o município e ponto referente à coordenada geográfica. O tempo decorrido entre a coleta e o procedimento de isolamento do fungo variou de 20 a 45 dias, tendo sido verificado que o material permanecia adequadamente bem conservado na amostra de tronco. Em laboratório, foram feitos isolamentos das amostras, avaliando-se a presença ou não do fungo.

O isolamento do fungo foi feito pela deposição de fragmentos do tecido lesionado em seções de frutos de cacau com aproximadamente 4 meses, utilizados como iscas. Com faca flambada, partiu-se os frutos expondo o mesocarpo e, com o

auxílio de um perfurador de colônias flambado, fez-se seções circulares da casca do fruto onde os fragmentos eram depositados. Estas iscas foram colocadas em bandejas plásticas forradas com papel toalha umedecido e lacradas em sacos plásticos formando câmaras úmidas. O período de incubação nestas condições variou entre 5 e 10 dias. Foram realizadas avaliações todos os dias, buscando-se o aparecimento de peritécios com os rostros já formados e estrusando os ascósporos, os quais foram retirados sob microscópio estereoscópico (lupa) com o auxílio de um estilete flambado ao rubro e esfriado no meio estéril, e colocados em placas de Petri com meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) acidificado, sendo incubados a 25 °C por 6 dias. A presença do fungo foi confirmada pela formação da colônia característica. Na eventualidade de surgimento de contaminantes, foram realizadas repicagens para novas placas até se obter a colônia limpa de *C. cacaofunesta*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

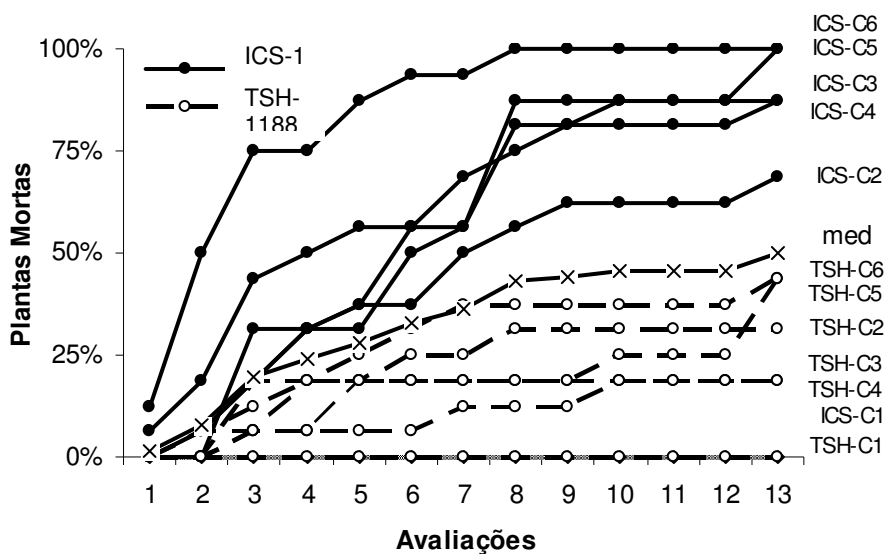
### **4.1. Estabelecimento de metodologia para avaliação da resistência de clones de cacau à murcha-de-Ceratocystis.**

A literatura não apresenta uma metodologia bem estudada e definida de avaliação da resistência de genótipos de cacau à murcha-de-ceratocystis para a região cacauzeira da Bahia. Diante disso, para se avaliar a resistência e o potencial de uso destes genótipos e de clones como porta-enxertos, foi necessário definir-se, através de experimentos em viveiro, parâmetros de inoculação de plantas com o *Ceratocystis cacaofunesta* (definido aqui como simplesmente 'ceratocystis') e de avaliação de resposta a esta inoculação, sendo estudados métodos envolvendo tanto morte de plântulas quanto tamanho relativo de lesão em plântulas vivas.

#### **4.1.1. Avaliação de parâmetros para comparações entre genótipos**

Informações preliminares sugeriam que os genótipos de cacau TSH-1188 e ICS-1 (SILVA et al, 2006; ALAN W. V. POMELLA, dados não publicados) poderiam servir como referências de resistência e susceptibilidade ao ceratocystis, respectivamente. Buscando-se avaliar o potencial destes genótipos para este fim, foi realizado um experimento com progênies seminais de polinização aberta destes materiais (doravante identificadas apenas pelo nome dos clones progenitores). Após inoculação do patógeno, acompanhou-se o comportamento das plântulas, sendo que a variável inicialmente utilizada para distinguir os genótipos quanto à resistência foi o percentual de plantas mortas (%PM). Estes foram calculados para cada

tratamento de concentração de inóculo em 13 avaliações realizadas (ver Metodologia). É notável que o comportamento de morte do ICS-1 foi sempre maior que o do TSH-1188 (Figura 2), o qual se apresentou sempre abaixo da média geral de morte do experimento considerado como um todo. Por volta dos 45 dias (avaliação nº 8) o aumento de morte praticamente se estabilizou sofrendo pequenas alterações até o 70º dia (avaliação 13). Esses resultados sugerem que os genótipos estudados devem servir adequadamente como referenciais de contraste quanto à resistência e susceptibilidade ao ceratocystis, visto que os %PM para todas as concentrações de inóculo para o ICS-1 (suscetível) estiveram acima da média do experimento (*Índice de Doença* – ver Metodologia e item 4.1.2 a seguir), enquanto que aqueles para o TSH1188 (resistente) estiveram abaixo da mesma (Figura 2). O gradiente de %PM formado conforme as maiores e as menores concentrações utilizadas não foi uniforme, isto é, não foi uma variação linear ou proporcional em todas as concentrações e genótipos, havendo, em alguns casos, situações de maiores concentrações com menores %PM. No entanto, foi possível perceber que a concentração nº 6 se mostrou muito agressiva, tendo seu %PM sempre maior em todas as avaliações, para ambos os genótipos. Já as concentrações nº 2, 3 e 4 se mostraram bastante parecidas quanto à sua eficiência na morte das plantas. Por fim, a concentração nº 1 (controle com água) não provocou a morte em nenhum dos genótipos e serviu para constatar a eficiência do método de corte para a inoculação. Esses resultados, até este momento, indicaram que todas as concentrações testadas seriam adequadas para diferenciar os genótipos resistente e suscetível. Contudo, conforme discutido a seguir, outras considerações precisaram ser levadas em conta na definição da melhor concentração de inóculo.



**Figura 2:** Percentual de plantas mortas (%PM) de acordo com os genótipos ICS-1 e TSH1188 e as concentrações de inóculo nas 13 avaliações (ver Metodologia). As seis concentrações estudadas são indicadas à direita (de C1 à C6); 'med' identifica a média geral de %PM para o experimento, aqui definido como o 'Índice de doença'.

Para uma análise mais detalhada do comportamento desses genótipos neste experimento, os dados foram processados estatisticamente, obtendo-se a análise de variância correspondente (Tabela 1). Uma vez que, associado ao genótipo, tem-se grau de liberdade igual a 1, o teste F foi considerado suficiente para mostrar a significância das diferenças de %PM existentes entre as médias do TSH-1188 e do ICS-1. Os resultados de significância estatística ( $P \leq 0,05$ ) pelo teste F evidenciaram efeito das variáveis 'concentração' de inóculo, 'genótipo' de cacaueteiro e época de 'avaliação', tanto de forma independente, quanto em relação às suas interações. Por esta razão, foi necessário avaliar-se cada uma separadamente e detalhar a análise destes parâmetros, buscando-se uma melhor definição daqueles que foram utilizados na metodologia final proposta para avaliação de resistência de genótipos e clones de cacaueteiro ao ceratocystis, conforme discutido a seguir.

**Tabela 1:** Análise de variância do percentual de plantas mortas (%PM) para os três parâmetros investigados

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>f tab</b>	
<b>Bloco</b>	3	12197,05	4065,68	1,89	3,29	
<b>Concentração</b>	5	151469,70	30293,94	14,10	2,90	*
<b>Erro a</b>	15	32235,24	2149,02	1,00		
Total Parc	23					
<b>Genótipo</b>	1	158271,70	158271,70	83,96	4,41	*
<b>G * C</b>	5	44608,52	8921,70	4,73	2,77	*
Erro b	18	33932,30	1885,13	1,00		
Total Sub-Parc	47					
<b>Avaliação</b>	14	229710,10	16407,86	138,74	1,69	*
A * C	70	58237,86	831,97	7,03	1,32	*
A * G	14	58928,82	4209,20	35,59	1,69	*
A * C * G	70	25769,12	368,13	3,11	1,32	*
Res c	504	59604,18	118,26	1,00		
<b>Total</b>	<b>719</b>					

(\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo)

#### 4.1.2. Época ideal para avaliação

Buscou-se o desenvolvimento de uma metodologia para estudo da resistência de clones de cacaueteiro que fosse válida para outros ambientes e ou condições experimentais, com o objetivo de determinar o número de dias necessários entre a inoculação de uma planta e a expressão da doença de forma adequada para sua avaliação quanto à resistência e suscetibilidade. O estudo de época de avaliação, isto é, o número de dias após a inoculação em que foi realizada observação dos sintomas, objetivou prover meios e métodos que proporcionassem adequada distinção entre os genótipos quando inoculados com o patógeno. Ao se considerar as avaliações em seqüência ordinal (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, ... n<sup>a</sup>), ou em escala de dias, impõem-se muitas variações, impossibilitando-se a aplicação das informações em outros estudos e outras condições, uma vez que o ambiente não se repete da mesma forma; ou seja, em condições variáveis de ambientes de trabalho e experimentação, intervalos iguais em experimentos diferentes podem não influenciar os resultados da mesma forma.

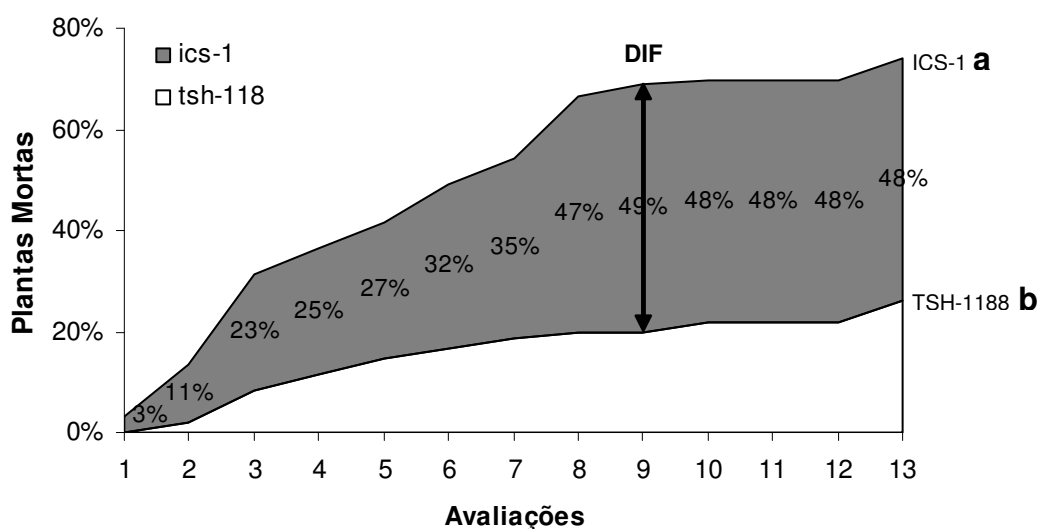
Buscando-se um parâmetro válido para um resultado representativo e generalizável quanto à resistência e suscetibilidade dos genótipos sob estudo, fez-se a análise do Índice de Doença (%PM total médio do experimento como um todo) e da DIF (= %PM médio ICS-1 – %PM médio TSH-1188). Ao se estudar desta forma o progresso da doença em relação ao número de dias decorridos entre a inoculação e cada avaliação, o Índice de Doença possibilita que os resultados possam ser extrapolados para condições experimentais diferentes, desde que se tenha os mesmos objetivos e métodos de trabalho. Este índice, entretanto, é muito sensível aos tipos de tratamentos utilizados nos experimentos. Assim, em um experimento onde haja desproporcionalidade nas quantidades de genótipos suscetíveis, de moderada resistência e resistentes, este índice tenderá para o grupo preponderante, havendo a necessidade de cautela na análise dos resultados e avaliação do experimento nesses casos.

Com base nas observações no decorrer do experimento foi possível perceber que, exceto na primeira avaliação, houve diferença estatística no %PM entre os genótipos estudados em todas as avaliações (Figura 3). O Índice de Doença entre a 1ª e 13ª (última) avaliação variou entre 5% e 65%, respectivamente (dados não mostrados), sendo que, ao fim deste período, o %PM para a progênie do ICS-1 foi de 74%, enquanto que o do TSH-1188 foi de 26% (Figura 3). Observou-se que ocorreu uma estabilização da DIF a partir da 9ª avaliação (52 dias). Esses resultados sugerem que determinar a estabilização da DIF como critério para as análises comparativas permite identificar bem as diferenças entre genótipos. No caso específico deste experimento, isto implicaria que teria sido suficiente conduzir as avaliações até o 52º dia pós-inoculação, para um procedimento adequado de identificação de progênies quanto ao seu grau de resistência (Figura 3).

Os resultados também sugerem que o parâmetro Índice de Doença relaciona-se proporcionalmente à %PM de cada genótipo e à DIF entre genótipos, podendo ser um indicador estável para se avaliar a resistência de clones ao *C. cacaofunesta*. Este parâmetro permite escolher até quando se quer avaliar o experimento com base na mortalidade das plantas. Ou seja, com o eventual objetivo de se proceder com avaliações mais rápidas de genótipos de cacauero, pode-se considerar Índices de Doença mais baixos, obtidos em menor espaço de tempo, e se fazer relações com a DIF de genótipos conhecidamente resistentes e suscetíveis. Nesse sentido, e considerando apenas o período de progresso crescente da doença (até a 9ª



avaliação, 52º dia), ao se regredir o nº de dias avaliados com os %PM médios correspondentes para o experimento (Índice de Doença), obteve-se a equação de reta  $Y = 2,63 + 0,972X$ , onde 'X' é o Índice de Doença. Isolando-se o 'X', para um 'Y' = 52 dias, encontra-se um Índice de Doença do experimento de ~50% como sendo adequado para uma boa diferenciação entre os genótipos extremos. A partir deste modelo, outros genótipos não conhecidos quanto ao seu comportamento ante a inoculação com ceratocystis pode ser enquadrado entre os dois parâmetros utilizados, formando escores de resistência. Contudo, conforme será visto adiante, outras informações foram relevantes para a definição de uma estratégia mais consistente de avaliação de genótipos de cacauero quanto à resistência ao ceratocystis.



**Figura 3:** Médias observadas de %PM nas 13 avaliações, com destaque para a diferença entre as médias para as progênes de ICS-1 e de TSH-1188 (DIF - área sombreada). As letras (a e b) ao lado dos nomes dos genótipos representam a diferença estatística entre os mesmos em todas as avaliações, exceto para a 1ª.

#### 4.1.3. Concentração ideal de inóculo

Com o objetivo de estudar o comportamento dos genótipos em cada concentração separadamente, buscando verificar este efeito do inóculo no progresso da doença, foram calculadas as médias de %PM das duas progênes nas diferentes concentrações para as 13 avaliações (Tabela 2). Observou-se que a concentração

nº 1 (somente água) funcionou bem quanto ao seu papel de controle negativo em todas as avaliações e que a concentração nº 6 foi excessivamente agressiva às plantas, causando morte desde a primeira avaliação (6%) e mantendo um %PM sempre mais alto do que as outras concentrações. Além disso, verificou-se que esta concentração causa uma mortalidade média mais elevada para o TSH-1188 (dados não mostrados), que é considerada indesejável, pois implica que o padrão de resistência passa a não cumprir sua função no sistema de forma eficiente. Para as demais concentrações (nºs 2, 3 e 4), observou-se um comportamento discrepante entre elas, tal que as maiores não necessariamente ocasionaram níveis de mortalidade maiores em relação às outras. Isso sugere que nesta faixa de concentração de esporos, os efeitos são semelhantes, sendo essa discrepância possivelmente devida a variações genéticas, pelos provavelmente maiores níveis de heterozigose causados pela polinização aberta (mudas seminais utilizadas no experimento). Os valores de %PM em cada concentração se mantiveram inalterados após a 9ª avaliação (fato relatado anteriormente), variando apenas na 13ª. Este aumento de morte ao final do experimento pode estar relacionado ao fato de outros fatores como coleobrocas, tempo de permanência das mudas em tubetes e até mesmo outros fungos terem provocado a morte de mais plantas. Seguramente a ação exclusiva e específica do *Ceratocystis* deu-se entre a 1ª e 9ª avaliação, com estabilização deste efeito percentual no período posterior.

**Tabela 2:** Percentual de plantas mortas (%PM) – média total por avaliação, combinando as progênes de ICS-1 e TSH-1188 (Índice de Doença).

Concentrações	Avaliações												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	19%	19%	28%	31%	38%	44%	47%	47%	47%	47%	50%
3	0%	3%	13%	25%	25%	34%	38%	50%	50%	53%	53%	53%	53%
4	0%	6%	13%	19%	22%	31%	41%	44%	47%	50%	50%	50%	53%
5	3%	13%	28%	34%	38%	38%	38%	53%	53%	56%	56%	56%	72%
6	6%	25%	47%	47%	56%	63%	66%	69%	69%	69%	69%	69%	72%

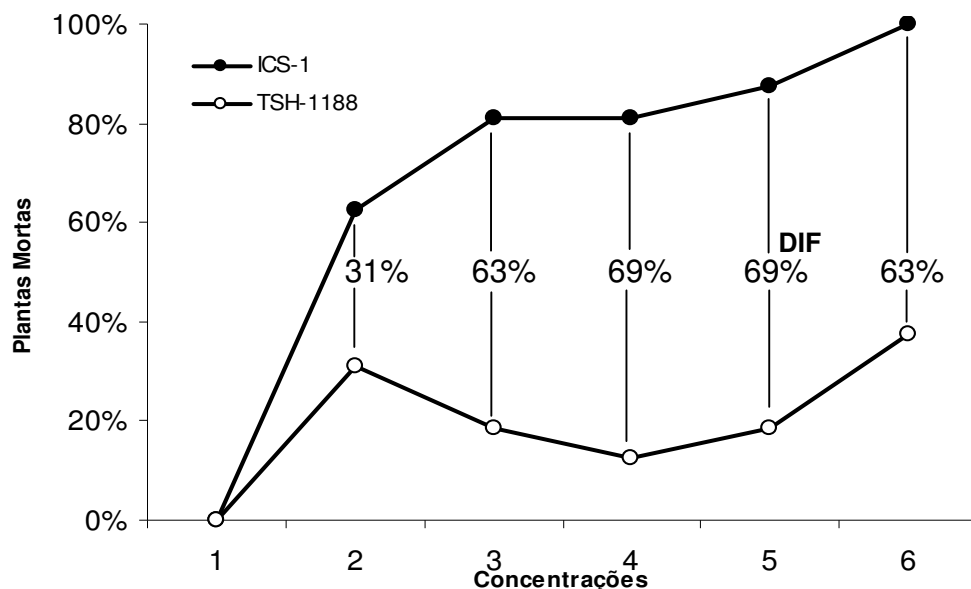
A análise comparada das concentrações individuais testadas (Tabela 2), portanto, apontou para dois aspectos relevantes para os procedimentos de avaliação, isto é, (i) a possibilidade de usar uma faixa de concentrações de esporos

de aproximadamente 1 a 2 logaritmos para inoculação, com resultados similares de progresso da doença, e (ii) que parece ser suficiente para verificar os efeitos patogênicos do fungo conduzir as avaliações até o momento de estabilização dos níveis de morte, o que ocorreu no mesmo período para todas as concentrações testadas.

A partir das análises do número de dias entre a inoculação e a última avaliação (item 4.1.2), e do comportamento geral similar dos genótipos nas diferentes concentrações de inóculo, optou-se por estudar comparativamente as diferentes concentrações do inóculo especificamente na avaliação nº 9, de forma a aferir-se se alguma dessas concentrações apresentaria uma maior vantagem ou eficiência para uso como padrão nos estudos de seleção de genótipos resistentes a *C. cacaofunesta*. Dessa forma plotou-se (Figura 4) as médias dos %PM de cada genótipo em cada concentração somente na avaliação nº 9 (52 dias após inoculação). Com base nesses resultados e nas análises anteriores, pode-se perceber que essa avaliação apresentou-se como adequada para representar bem o comportamento tanto do TSH-1188 quanto do ICS-1, em todas as concentrações, frente ao patógeno. Também foi observado que não se tem uma resposta uniforme dos clones: a partir da concentração '2', o %PM para TSH-1188 diminuiu e voltou a aumentar, enquanto o do ICS-1 manteve-se ascendente. Contudo, foi possível verificar que as diferenças entre o %PM para as duas progênies praticamente se estabilizaram a partir da concentração '3'. Assim, pode-se considerar, a princípio, qualquer destas concentrações como adequada no processo de identificação de progênies quanto ao seu grau de resistência, visto que para este tipo de análise, uma maior distância entre os extremos de referência deve permitir uma melhor comparação com outros genótipos a serem investigados.

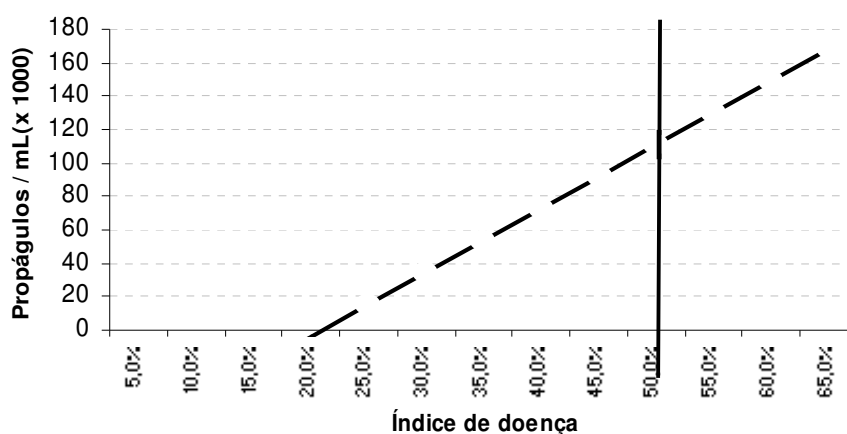
Considerando os resultados obtidos, alguns aspectos de cunho metodológico devem ser discutidos no contexto da decisão por uma melhor concentração. Sendo os propágulos do *C. cacaofunesta* envolvidos por uma massa gelatinosa, dando a estes uma forte aderência entre si que formam grumos com até 10 esporos (fato observado durante as aferições), concentrações muito altas podem somar erros na contagem destes na câmara de Neubauer, já que mesmo com a adição de TWEEN 80 e boa homogeneização, ainda se encontra agrupamentos que dificultam uma contagem mais precisa – metodologicamente esses grumos são contados como um

e nada impede que todos germinem aumentando a concentração da suspensão. Por outro lado, outro fator com potencial de indução de erro que pode ocorrer refere-se a suspensões de esporos muito diluídas. Neste caso, já que a quantidade de propágulos na suspensão é baixa, as alíquotas coletadas com a pipeta (20 $\mu$ L) para se aplicar na planta estão mais sujeitas a erros provocados por deficiência de homogeneização das amostras. Outro ponto importante é que a germinação de *Ceratocystis* situa-se ao redor de 80% (ALAN W.V. POMELLA, dados não publicados) e nada impede que essa variação de percentagem de germinação se sobressaia nessas concentrações, aumentando a variabilidade entre elas. Tais fatores somam-se para a escolha de uma concentração mediana e que se mantenha eficiente da diferenciação dos genótipos. Um argumento técnico importante neste caso é o de que essa concentração deve ter a capacidade de provocar a morte de um grande número de plantas do genótipo suscetível e simultaneamente não ser tão agressiva ao genótipo resistente. É importante salientar que todas essas concentrações não são reais em condições de campo, onde a pressão de inóculo tende a ser bem menor.



**Figura 4:** Evolução do %PM médio para as progênies de ICS-1 e de TSH-1188, na avaliação nº 9. As diferenças de comportamento de mortalidade entre as duas progênies (DIF) estão indicadas pelas linhas verticais entre as 2 curvas.

Os resultados até aqui sugeriam que, considerando-se tratar de mudas seminais (ver anteriormente), mais de uma concentração de inóculo seriam aparentemente possíveis de serem utilizadas com eficiência, isto é, a '3', '4' ou '5'. Contudo, partindo-se dos pressupostos que maiores concentrações de inóculo deveriam causar mais doença, e que o Índice de Doença (ver item 4.1.2) é um parâmetro estável que relaciona-se com o total médio de mortes do experimentos, decidiu-se estudar a associação entre o progresso geral da doença (medido pelo Índice de Doença) e as concentrações de inóculo. Assim, regressiu-se, linearmente, o número de propágulos (esporos) / mL definidos para cada concentração (variável dependente) com o valor médio geral de %PM do experimento (índice de doença – variável independente) em cada avaliação (Figura 5). A curva mostrou que é possível variar a concentração de acordo com o percentual de morte de plantas que se deseja alcançar. Por exemplo, para que metade de todas as plantas no experimento estivessem mortas (Índice de Doença = 50%), seriam necessários aproximadamente 52 dias após a inoculação. Vale lembrar que este período coincide com a avaliação nº 9, previamente indicada como mais adequada para o procedimento, pois nela obteve-se a maior diferença média de morte entre os genótipos, considerando-se todas as concentrações em conjunto, estabilizando-se tal diferença a partir daí (Figura 3). Além disso, quando se aplicou 50% de Índice de Doença para o experimento no modelo linear descrito anteriormente (ver item 4.1.2), o total de dias adequados foi o mesmo, isto é, 52 dias. Sendo assim, a partir da regressão apresentada na Figura 5, estimou-se que o número de esporos no inóculo inicial para que 50% de todas as plantas no experimento estejam mortas (o que ocorreu na 9ª avaliação) seria de  $1,39 \times 10^5$  propágulos/mL. Como o número de esporos da concentração '5' ( $1 \times 10^5$  esporos/mL) melhor aproxima-se daquele valor, esta análise, portanto, permitiu definir e justificar o uso desta concentração como sendo a mais apropriada para avaliação de resistência, nas condições gerais de experimentação deste trabalho.



**Figura 5:** Associação entre o índice de doença (%) e o número de propágulos (esporos) / mL como inóculo inicial necessários para atingir o seu valor. A equação da reta que estima os valores de concentração dos propágulos é  $y = - 109,0 + 4,965x$ .

Portanto, no caso deste experimento, tanto pela via da estabilização do Índice de Doença (item 4.1.2; Figura 3), quanto pela via da DIF (Figura 4) e pela via da melhor concentração, foi confirmada a avaliação no 52º dia como sendo a mais adequada para discriminar os genótipos (Figuras 3 e 5). Tomados em conjunto, os princípios teóricos, resultados e interpretações dessas análises fornecem um corpo de alternativas de procedimentos que podem ser utilizados para avaliação comparativa de genótipos contrastantes quanto à resistência ao *Ceratocystis*.

#### **4.1.4. Avaliação da resistência de clones de cacauero – validação do método.**

Para validar a metodologia desenvolvida e avaliar a resistência de diversos genótipos de cacauero a esta enfermidade de forma simultânea, foi instalado um experimento onde se analisou o comportamento de 10 clones (mudas propagadas por estquia – ver item 3.1.2) de cacauero ante a inoculação com suspensão de esporos de *Ceratocystis*, nas mesmas condições estudadas anteriormente. Os resultados da Análise de Variância para o %PM considerando-se os clones, avaliações, suas interações e desdobramentos são apresentados na Tabela 3, onde são mostrados os quadrados médios das várias fontes de variação com suas

respectivas significâncias, obtidas através do teste F. Os efeitos de 'Clones' (C), 'Avaliação' (A) e a interação 'Clone x Avaliação' (C x A) foram significativos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ), indicando que existem diferenças entre as médias dos clones e entre as avaliações.

**Tabela 3:** Análise de Variância do %PM para os clones sob estudo.

F.V.	GL	SQ	QM	F
<b>Bloco</b>	2	21660	10830	
<b>Clone ( C )</b>	9	179732	19970	15,3 *
<b>Erro (a)</b>	18	23428	1302	
<b>Avaliação (A)</b>	11	235576	21416	151,1 *
<b>C x A</b>	99	57612	582	4,1 *
<b>(Avaliação / Clone)</b>	(110)	293188	2443	17,2 *
(Avaliação / CCN-10)	(11)	48389	4032	28,5 *
Efeito linear	1	44916	44916	317,0 *
Desvio da regressão	10	3456	346	2,4 *
(Avaliação / CCN-51)	(11)	40567	3381	23,9 *
Efeito linear	1	31055	31055	219,1 *
Desvio da regressão	10	9512	951	6,7 *
(Avaliação / CEPEC 2002)	(11)	27422	2285	16,1 *
Efeito linear	1	25693	25693	181,3 *
Desvio da regressão	10	1729	173	1,2 Ns
(Avaliação / CEPEC 2008)	(11)	6489	541	3,8 *
Efeito linear	1	6117	6117	43,2 *
Desvio da regressão	10	371	37	0,3 ns
(Avaliação / CEPEC 2009)	(11)	33456	2788	19,7 *
Efeito linear	1	29376	29376	207,3 *
Desvio da regressão	10	4079	408	2,9 *
(Avaliação / HW-25)	(11)	40400	3367	23,8 *
Efeito linear	1	28229	28229	199,2 *
Desvio da regressão	10	12171	1217	8,6 *
(Avaliação / PH-16)	(11)	37989	3166	22,3 *
Efeito linear	1	28067	28067	198,1 *
Desvio da regressão	10	9922	992	7,0 *
(Avaliação / SJ-02)	(11)	45633	3803	26,8 *
Efeito linear	1	37110	37110	261,8 *
Desvio da regressão	10	8524	852	6,0 *
(Avaliação / CEPEC 2007)	(11)	12622	1052	7,4 *
Efeito linear	1	9511	9511	67,1 *
Desvio da regressão	10	3111	311	2,2 *
(Avaliação / TSH-1188)	(11)	222	19	0,1 Ns
Efeito linear	1	93	93	0,7 Ns
Desvio da regressão	10	129	13	0,1 Ns
Resíduo (b)	220	31176	142	
<b>Total</b>	<b>359</b>	<b>549169</b>		

(\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo)

Para se observar melhor esses efeitos foi feito o estudo comparativo do comportamento dos clones em cada avaliação. É possível distinguir-se, as

diferenças de comportamento dos clones em relação ao percentual de plantas mortas como resultado da inoculação com *C. cacaofunesta* (Tabela 4). Verifica-se que os clones tiveram comportamentos diferenciados nas diversas avaliações e que a partir da 7ª avaliação os clones mantiveram seus comportamentos e, portanto, as diferenças relativas entre si. Neste sentido, para este experimento, esta avaliação corresponderia à nº 9 do experimento realizado com os genótipos de referência (itens 4.1.1 a 4.1.3). O clone TSH-1188 destacou-se como o mais resistente, seguido do CEPEC-2008. Estes dois compuseram o grupo dos mais resistentes, com %PM  $\leq$ 13% para a avaliação nº 7 e  $\leq$  40% na avaliação nº 12. Vale ressaltar que, neste experimento, as plantas de TSH-1188 utilizadas são homogêneas geneticamente, visto que são oriundas de estaquia (ver Metodologia). Se considerarmos que nos experimentos anteriores foram usadas mudas seminais (variáveis geneticamente), mas que em ambos os experimentos a mortalidade deste genótipo foi semelhantemente baixa, isso reforça sua relevância como material genético referência para resistência ao ceratocystis. Além disso, a análise do comportamento do TSH-1188 demonstra claramente a importância do parâmetro 'estabilidade' (discutido em detalhes adiante), que corresponde ao comportamento do genótipo ao longo do tempo quando exposto ao contato com o fungo, isto é, durante o progresso da doença no experimento de avaliação. No caso do TSH-1188 a sua resistência se manteve desde o início até o fim das avaliações (Tabela 4).

Tabela 4: Comparações entre as médias dos clones através do teste de Tukey (P $\leq$ 0,05)

CLONE	Avaliações											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TSH-1188	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	0% a	7% a	7% a
CEPEC-2008	0% a	0% a	0% a	0% a	13% ab	13% ab	13% ab	20% ab	27% ab	27% ab	33% ab	40% ab
CEPEC-2002	0% a	0% a	7% ab	13% ab	40% abc	47% abc	53% bc	60% bc	60% bc	60% bc	73% bc	80% c
CEPEC-2007	0% a	13% a	33% ab	47% abc	47% abc	5% bc	53% bc	53% bc	53% bc	53% bc	60% bc	67% bc
CEPEC-2009	0% a	0% a	7% ab	40% abc	47% abc	60% bc	67% c	73% c	73% bc	80% c	80% c	80% c
CCN-10	0% a	0% a	20% ab	7% abc	53% bc	67% c	80% c	87% c	87% c	93% c	100% c	100% c
CCN-51	0% a	0% a	20% ab	53% bc	67% c	80% c	87% c	87% c	87% c	87% c	87% c	87% c
SJ-2	0% a	0% a	40% ab	53% bc	67% c	87% c	93% c	93% c	93% c	93% c	100% c	100% c
PH-16	0% a	13% a	33% ab	73% c	80% c	80% c	87% c	93% c	93% c	93% c	93% c	93% c
HW-25	0% a	0% a	53% b	73% c	73% c	80% c	93% c	93% c	93% c	93% c	93% c	93% c

médias com letras iguais não diferem entre si

Compondo um 2º grupo, os clones CEPEC-2002 e CEPEC-2007 apresentaram resistência intermediária, com %PM = 53% na avaliação 7 e entre 67-80% na avaliação 12 (Tabela 4). É interessante observar que o CEPEC-2002 (em



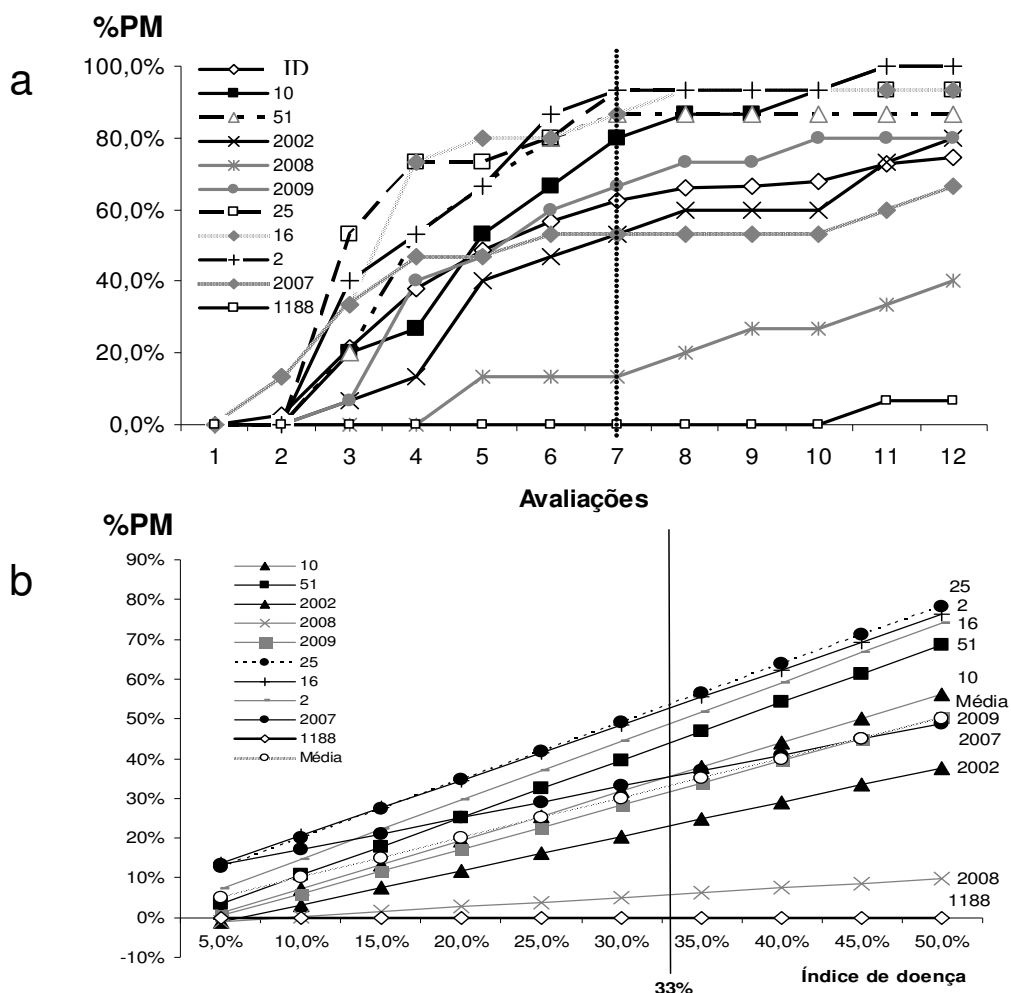
oposição ao TSH-1188 e CEPEC-2008, por exemplo) apresentou um comportamento de maior *instabilidade* dessa resistência, pois o %PM não estabilizou-se com o tempo, aumentando ainda a partir da 7<sup>a</sup> avaliação de tal forma que na 12<sup>a</sup> avaliação agrupou-se com os mais suscetíveis (ver a seguir). Considerando o que foi discutido anteriormente a respeito de potenciais fatores que podem interferir no aumento de morte de plantas após o período de estabilização (ver item 4.1.3), não foi possível determinar neste momento se esta maior instabilidade seria uma característica genótipo-específica, ou se foram esses fatores citados os responsáveis pelo fenômeno. Outros experimentos seriam necessários para dirimir esta dúvida.

Os demais clones (CEPEC-2009, CCN-10, CCN-51, SJ-02, PH-16, HW-25) formaram o grupo dos clones mais suscetíveis, apresentando %PM  $\geq 67\%$  na avaliação n<sup>o</sup> 7 e  $\geq 80\%$  na avaliação n<sup>o</sup> 12 (Tabela 4). Aqui, novamente, evidencia-se a questão da estabilidade da reação do genótipo ao patógeno, ao longo do período experimental, pois, não obstante os clones CEPEC-2002 e CEPEC-2009 tenham apresentado os mesmos percentuais de plantas mortas na avaliação n<sup>o</sup> 12, na avaliação n<sup>o</sup> 7 eles classificaram-se de forma diferente. Isto foi devido a terem se apresentado com desempenhos diferentes ao se considerar o incremento na curva de progresso da doença (ver adiante). Se esta característica de instabilidade de resposta ao patógeno for levada em conta, eventualmente pode-se ter dificuldades na classificação de genótipos em avaliações antecipadas. Considerando o exposto anteriormente sobre outros fatores interferentes em avaliações avançadas no tempo, bem como o fato de que o CEPEC-2002 manteve-se estatisticamente no 2<sup>o</sup> grupo até a 11<sup>a</sup> avaliação (Tabela 4), consideramos adequado incluir o CEPEC-2002 no grupo de clones com resistência intermediária.

Como será visto logo a seguir, foi importante desenvolver uma forma de melhor analisar este parâmetro 'estabilidade' da resistência para permitir uma avaliação comparativa entre genótipos mais consistente, e que não comprometesse os resultados anteriores que apontaram o momento da estabilização da resposta como adequado para as comparações (aqui, na avaliação n<sup>o</sup> 7).

De forma semelhante à realizada no experimento anterior (ver Figura 2), buscou-se visualizar melhor o comportamento de cada clone, compondo-se curvas de morte nas 12 avaliações. Plotou-se tanto os dados da Tabela 4 (médias do %PM

em cada avaliação), quanto o Índice de Doença ('ID', Figura 6a). Observou-se que, de fato, a avaliação que delimitou a estabilização geral dos %PM dos clones foi a de nº 7, correspondendo, assim, à de nº 9 do experimento anterior (item 4.1.3). Este procedimento também facilitou a observação de que os clones TSH-1188, CEPEC-2008, CEPEC-2007 e CEPEC-2002 (que classificaram-se como mais resistentes pela Tabela 4) mantiveram seus %PM abaixo da média nesta avaliação. Esta estabilização aos 35 dias (avaliação nº 7) corrobora dados obtidos por Silva et al. (2006). Este período mostrou-se ideal para a análise do experimento, visto que encerrou as maiores diferenciações entre os genótipos quanto às respostas de resistência.



Não obstante o estudo de %PM de cada clone indicando a resistência ou suscetibilidade com base no Índice de Doença (e na referência já estabelecida neste trabalho, isto é, o TSH-1188), utilizou-se o método desenvolvido por Finlay e Wilkinson (1963) e Eberhart e Russel (1966) para estudar-se também, de modo mais detalhado, a ‘estabilidade’ dessa resistência como um parâmetro adicional para refinar a avaliação dos clones e prover maiores informações sobre os mesmos (ver Metodologia). Este método baseia-se na adição das somas de quadrados das interações ‘Clone x Avaliação’ com as somas de quadrados devidas ao efeito das avaliações, decomposta em efeitos de avaliação dentro de cada um dos genótipos. Estas somas de quadrados foram decompostas em efeitos lineares e desvios da regressão (Tabela 3).

Para se avaliar a estabilidade da curva de progresso da doença, regrediu-se o %PM médio de cada clone em cada avaliação (variável dependente) em função da média de todos os clones (Índice de Doença do experimento – variável independente), considerando-se as sete primeiras avaliações; foram estimados os coeficientes de regressão linear ‘*b*’, as intersecções das retas no eixo das ordenadas ‘*a*’, e os coeficientes de determinação  $R^2$  (Tabela 5). As retas correspondentes a estas regressões que, em última análise, demonstram os modelos descritivos das curvas de progresso da doença para os clones nestas condições experimentais, aparecem na Figura 6b. Os coeficientes de determinação  $R^2$  destes modelos possuem um caráter de ‘previsibilidade’ do comportamento de morte dos clones ao longo do tempo (ver a seguir), dependendo do Índices de Doença geral do experimento. Estima-se que um número maior de repetições desse experimento, com estes e outros clones, poderá permitir o estabelecimento de uma curva de Índice de Doença mais geral, que sirva como referência para testes de avaliação de resistência para qualquer genótipo que se queira estudar, em relação à inoculação com *C. cacaofunesta*.

**Tabela 5:** Coeficientes de regressão linear (*b*), intersecção (*a*) e coeficientes de determinação (*R*<sup>2</sup>) para a regressão entre %PM dos clones e o Índice de Doença.

<b>Clone</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>CCN-10</b>	1,22	-0,05	0,95
<b>CCN-51</b>	1,45	-0,04	0,99
<b>CEPEC-2002</b>	0,86	-0,05	0,90
<b>CEPEC-2008</b>	0,24	-0,02	0,73
<b>CEPEC-2009</b>	1,11	-0,05	0,96
<b>HW-25</b>	1,45	0,06	0,93
<b>PH-16</b>	1,39	0,07	0,95
<b>SJ-02</b>	1,48	0,00	0,98
<b>CEPEC-2007</b>	0,79	0,09	0,91
<b>TSH-1188</b>	0,00	0,00	0,0
<b>média</b>	1,0	0,00	1,00

Os clones com comportamentos mais previsíveis ( $R^2 \geq 0,93$ ) foram CCN-51, SJ-02, CEPEC-2009, CCN-10, PH-16, HW-25, que se caracterizaram, também, como os mais suscetíveis (Tabela 4, Figura 6). Além disso, apresentaram uma maior inclinação das respectivas retas, apontando para o aumento consistente do %PM com o tempo até a estabilização (coeficiente  $b > 1$ ) e indicando claramente um comportamento mais instável. Deste grupo dos suscetíveis, o menos instável foi o CEPEC-2009, com o menor dos coeficientes de regressão ( $b = 1,11$ ); inclusive, sob outro ponto de vista analítico, esta menor instabilidade permitiu sua classificação num grupo intermediário (ver adiante).

Por outro lado, os clones considerados de moderada e alta resistência apresentaram seus coeficientes lineares  $b < 1$ , obviamente refletindo uma menor inclinação de suas retas e, portanto, menor mortalidade percentual com o tempo, isto é, maior *estabilidade* da característica (ao menos dentro do período de tempo definido para a avaliação). O CEPEC-2007 e CEPEC-2002 apresentaram o  $R^2$  em torno de 0,90, ainda indicando boa previsibilidade de comportamento, mas foram considerados como de moderada resistência, tanto pela magnitude dos valores médios de seus %PM, quanto pela maior estabilidade no período, com menor aumento deste %PM com o tempo revelado pela menor inclinação das retas ( $0,4 < b < 1$ ). Os outros dois clones, TSH-1188 e CEPEC-2008, foram considerados os mais

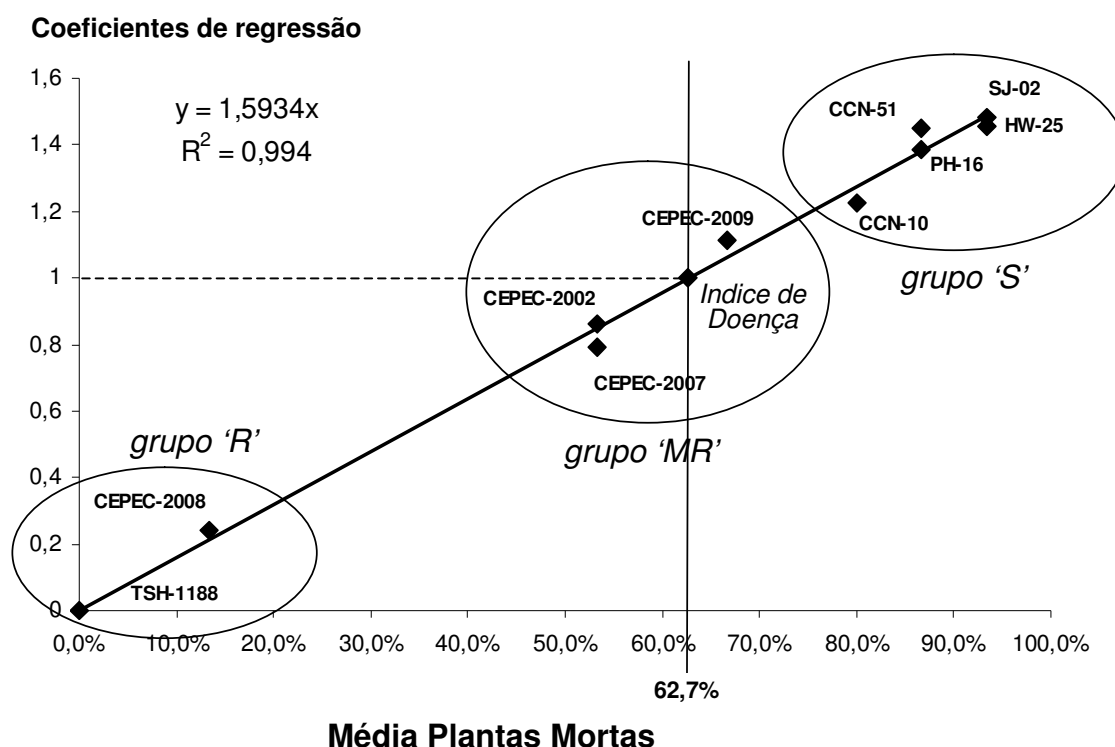
resistentes pelos menores %PM, e mais estáveis, devido à tendência à horizontalidade de suas retas ( $0 = b < 0,25$ ). O menor  $R^2$  de 0,73 encontrado para o CEPEC-2008, apesar de menor, ainda pode ser considerado razoável para uma boa previsibilidade de comportamento. Contudo, o  $R^2 = 0,0$  obtido para o TSH-1188 (que apontaria para uma ausência de previsibilidade de comportamento) deve ser analisado com cautela e pode ser entendido como um 'artefato' da técnica matemática, pois reflete exatamente essa tendência à horizontalidade citada acima que, em regressão linear, revela ausência de função. O fato do clone TSH-1188 não ter apresentado morte de plantas até a avaliação nº 7, implicou em constância de comportamento, zerando-se, por consequência, o coeficiente de determinação  $R^2$ .

A maior coincidência existente entre previsibilidade de comportamento e susceptibilidade dos clones é provavelmente devida à tendência do Índice de Doença do experimento em direção a maiores %PM, devido a maior quantidade de clones apresentando susceptibilidade. Conforme discutido anteriormente, essa limitação deste Índice (que é a média geral do experimento por avaliação) deve diminuir com uma distribuição maior de genótipos testados, tanto entre os limites de resistência e susceptibilidade, quanto em relação à estabilidade de comportamento de resposta ao patógeno (maiores e menores aumentos de %PM com o tempo). Desse modo, o Índice de Doença poderia servir como um parâmetro mais genérico, com possibilidade de uso como referencial teórico (limite geral) para diferentes experimentos com genótipos cujo comportamento ainda seja desconhecido.

A partir dos parâmetros estudados e discutidos acima, realizou-se uma análise dos dados que permitiu melhor visualizar as diferenças entre os clones, bem como verificar de forma mais nítida os critérios para suas classificações. Conforme mostrado na Figura 7, associou-se os %PM médios de cada clone (considerando a média das 7 primeiras avaliações) e os coeficientes de regressão  $b$ . Os resultados mostrados no gráfico permitiram identificar claramente os 3 grupos discutidos acima: o grupo constituído pelos clones TSH-1188 e CEPEC-2008 de alta resistência, com  $b < 0,4$  e baixo %PM (grupo 'R'); o grupo constituído pelos clones CEPEC-2007, CEPEC-2002 e CEPEC-2009 de moderada resistência, com  $b$  próximo de 1,0 e %PM em torno da média ('MR'); e o grupo constituído pelos demais suscetíveis, com  $b > 1,2$  e alto %PM (grupo 'S'). Além disso, a estabilidade dos clones cresce no sentido direto ao da resistência. Vale notar que, integrando esses parâmetros da

forma apresentada na Figura 7, o clone CEPEC-2009, ganharia novo *status*, saindo de susceptível (ver Tabela 6, Figura 6a) para moderadamente resistente, por conta de seu comportamento menos instável ao longo do período experimental. Observou-se que a utilização do período de avaliação até a 7ª tornou o critério de classificação dos clones pelos parâmetros estudados (%PM, Índice de Doença, e coeficientes da regressão linear entre %PM médio do período e Índice de Doença) como mais preciso. Isto se deve exatamente por ser o período de maiores diferenças de variação entre os clones, de modo semelhante ao que ocorreu no experimento anterior com a avaliação nº 9 (Figuras 3 e 4).

De qualquer forma, procedendo-se o estudo do modo apresentado, é possível definir com maior consistência e informação quais critérios podem ser adotados para a avaliação de genótipos de cacauero quanto a resistência ao *C. cacaofunesta*. A metodologia utilizada para a análise permite discriminar os clones com base em sua resistência (%PM médio), estabilidade na curva de progresso da doença (*b*) e na previsibilidade de comportamento ( $R^2$ ).



**Figura 7:** Relações entre as médias do %PM dos clones e os respectivos coeficientes lineares da regressão (*b*, ver Tabela 6), que servem como indicadores da estabilidade do comportamento de resposta ao patógeno. A média geral do experimento para os valores de %PM e *b* é a confluência das linhas vertical sólida e horizontal tracejada (Índice de Doença). Grupo 'R' indica alta resistência, grupo 'MR' indica moderada resistência e grupo 'S' indica susceptível.

A partir dos resultados acima descritos para mudas de clones de cacaueteiro, obtidas por enraizamento de estacas plagiotrópicas em tubetes, e inoculadas com *C. cacaofunesta*, os clones indicados como mais resistentes e estáveis – TSH-188 e CEPEC-2008 – poderiam ser utilizados em plantios comerciais e, ou como porta-enxertos. Os clones CEPEC-2007, CEPEC-2002 e CEPEC-2009 com moderada estabilidade e resistência poderiam ser utilizados em regiões de baixa incidência de *C. cacaofunesta*, ou como enxerto (copa). Finalmente, os clones CCN-10, PH-16, CCN-51, HW-25 e SJ-02, ao se mostrarem muito suscetíveis ao *C. cacaofunesta*, não seriam recomendados para o plantio em locais de reconhecida infestação. Em futuros trabalhos semelhantes, uma inclusão mais proporcional de clones resistentes, de resistência moderada e suscetíveis, promoveria uma estimativa da média geral mais equilibrada e, portanto, referências e limites mais generalizantes para o enquadramento dos clones.

A metodologia de inoculação e análise de dados mostrou-se adequada e eficiente, uma vez que permitiu diferenciar os diversos clones em sua capacidade de resistir à infecção pelo patógeno, promovendo a morte dos suscetíveis e permitindo a sobrevivência dos resistentes. Contudo, pode haver situações experimentais em que, devido a características específicas de vigor, idade e preparação das mudas, a morte das plântulas não seja obtida (ao menos num tempo razoável). Os experimentos descritos a seguir buscaram verificar se outros parâmetros distintos do %PM poderiam ser adequadamente utilizados como alternativa para avaliação.

#### **4.1.5. Altura relativa de lesão – parâmetro alternativo para avaliação de genótipos de cacaueteiro**

Em ambiente natural (campo), a infecção das plantas ocorre possivelmente por mais de uma porta de entrada em razão do tipo e periodicidade das práticas de desbrota e poda, e intenso ataque de coleobrocas em determinados locais e épocas. Com base em informações de literatura (ALARCON, 1994) e discussões do grupo de pesquisa com colaboradores, surgiu o questionamento sobre se o tipo e o número de cortes utilizado neste método traria diferenças de intensidade da doença nas mudas. Este fenômeno poderia influenciar no aumento do parâmetro ‘morte’ de

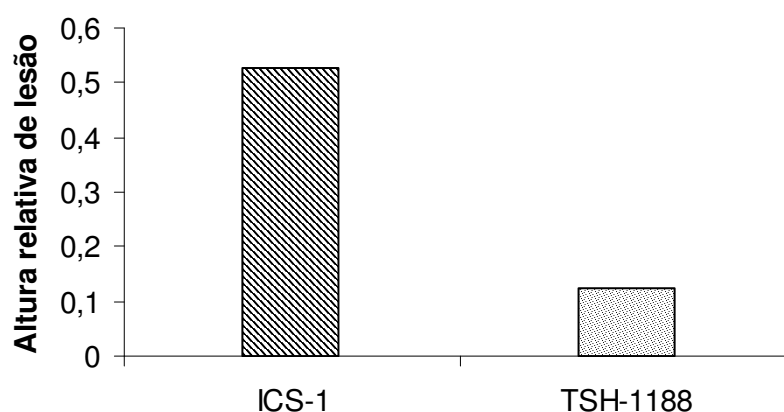
plantas por um outro fator que não a susceptibilidade ou resistência do genótipo de cacau, criando fatores extras de variabilidade experimental a serem controlados. Em alguns ensaios preliminares com experimentos em viveiro, testou-se tipos e números diferentes de corte, buscando-se verificar possíveis diferenças de eficiência em provocar a infecção e morte das plantas suscetíveis e, simultaneamente, não ser tão agressivo às plantas resistentes. Os resultados sugeriram que não houve diferenças tão contundentes que justificasse uma alteração na metodologia de inoculação já testada (dados não mostrados).

Entretanto, as plantas utilizadas nesses testes prévios eram diferentes quanto à idade e tipo de propagação que, conseqüentemente, afetavam seu vigor (provavelmente devido ao fato de terem sido propagadas em volumes de solo maiores que aqueles dos tubetes, discutidos anteriormente – ver Metodologia). Além disso, utilizou-se naquele momento genótipos pouco conhecidos quanto à sua resistência à doença que ocasionou diferenças difíceis de avaliar quanto às respostas à ação do fungo. Essas plantas, após inoculação, não morreram depois de um tempo bastante largo de acompanhamento; contudo, observou-se que apresentavam lesão interna característica da ação patogênica do *ceratocystis*. Assim, surgiu o questionamento sobre se, após dissecação do caule das plantas, seria possível utilizar a medição da altura destas lesões como parâmetro eficiente para comparação entre genótipos. Os experimentos a seguir descrevem os resultados relativos a esta alternativa de parâmetro de avaliação.

Após a dissecação dos caules das plântulas sob estudo, que foram inoculadas da maneira padronizada (ver Metodologia), mediu-se a altura da lesão, bem como a altura da plântula. Considerando que a velocidade de tomada do tecido pelo efeito do *ceratocystis* (necrose) poderia apresentar taxas diferentes das de crescimento da muda, e que isso poderia estar associado à resposta das plantas ao patógeno, concluiu-se que a susceptibilidade ou resistência da planta estaria melhor relacionada à razão entre altura da lesão e a altura da planta, resultando no parâmetro denominado de 'Altura Relativa de Lesão' (ARL). Assim, comparou-se a ARL entre os genótipos referência, isto é, TSH-1188 e ICS-1 em experimentos onde não se logrou morte das plantas no período descrito (Figura 8). Observou-se que as respectivas médias de ARL obtidas obedeceram claramente ao padrão comum de resistência e susceptibilidade destes genótipos, sugerindo que este parâmetro pode



servir como alternativa técnica suficientemente eficaz em identificar materiais resistentes e suscetíveis, sem que ocorra morte de plantas. Experimentos posteriores seriam necessários, contudo, para se melhor avaliar questões relativas à magnitude típica de coeficientes de variação experimental para situações como esta, bem como níveis de significância e intervalos de confiança característicos para o sistema, buscando-se identificar limites generalizáveis para comparações entre genótipos. Assim, até o momento, na avaliação comparativa de genótipos ou clones, seria recomendável utilizar simultaneamente as referências de resistência e suscetibilidade (como é o caso destes genótipos) como controles internos.

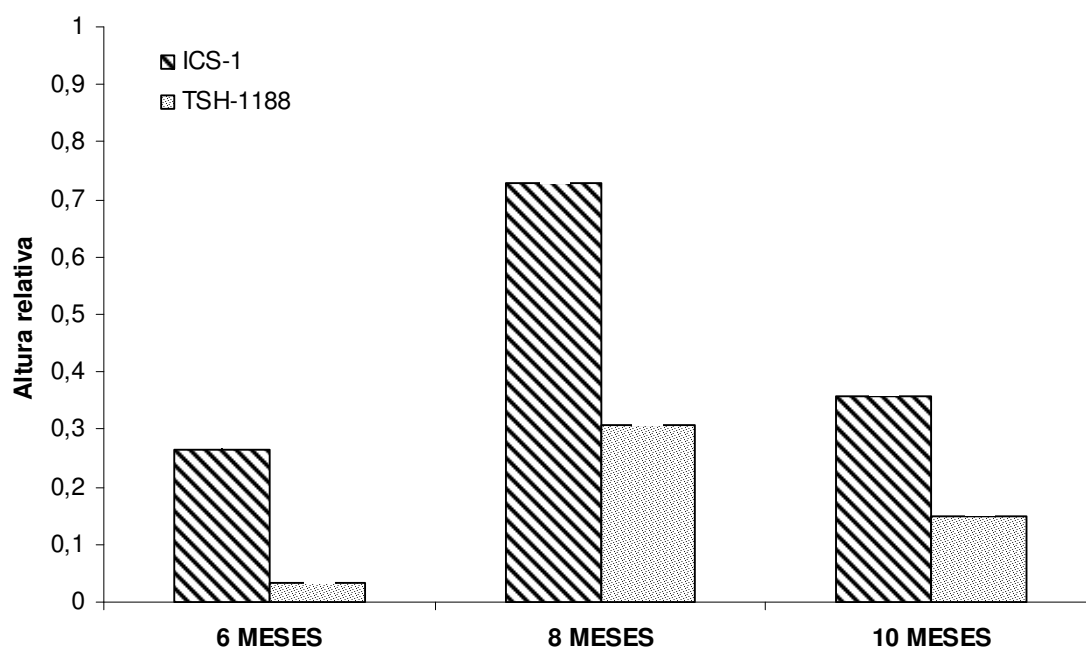


**Figura 8:** Média da Altura Relativa de Lesão (ARL = altura da lesão/altura da planta) entre progênies de ICS-1 e de TSH-1188, após inoculação com ceratocystis e 90 dias de incubação. Os controles sem inoculação não apresentaram lesões mensuráveis.

É importante discutir que a medição dessas variáveis para a constituição deste parâmetro é extremamente laboriosa, podendo causar limitações de mão-de-obra técnica qualificada, tempo de execução e número de plantas (mudas) e, ou genótipos passíveis de processamento simultâneo, caso seja utilizada em programas de melhoramento. Mesmo assim, surge como alternativa válida para implementação em qualquer circunstância em que a morte de plantas seja impossibilitada ou inconveniente.

Com base na hipótese de uma importante influência da idade-vigor das plantas na resposta de morte ou não às inoculações com ceratocystis, instalou-se

outro experimento que procurou investigar esta questão, utilizando-se plântulas propagadas em sacos plásticos com maior volume de solo que tubetes, bem como o parâmetro ARL recém discutido. Para tanto foram inoculadas progêneses seminais de TSH-1188 e de ICS-1 com três idades diferentes: 6, 8 e 10 meses. Os resultados apresentados na Figura 9 mostraram que houve diferenças de resposta das plântulas em função das idades, mas sem evidenciar alguma lógica aparente de comportamento associada a cronologia. Contudo, pôde-se perceber que, independentemente da idade, a diferença entre os genótipos se manteve, confirmando, mais uma vez, o potencial de representação de resistência e suscetibilidade destes genótipos, bem como da eficiência da técnica de avaliação do tamanho relativo da lesão (ARL). Os resultados sugerem que qualquer uma das idades avaliadas podem ser utilizadas para um teste de avaliação da resistência de plantas ao *C. cacaofunesta* quando se avalia a ARL. No entanto, conforme discutido acima, a técnica é trabalhosa, depende de adequada precisão na observação e medição das lesões, e é recomendável que o experimento possua controles internos de resistência e de suscetibilidade, como os genótipos utilizados neste trabalho. Além disso, o volume de solo para o cultivo das mudas, aparentemente, determina se haverá morte das plantas (tubetes) ou lesões sem morte (sacos plásticos).



**Figura 9:** Média da Altura Relativa de Lesão – ARL entre progêneses de ICS-1 e de TSH-1188 em diferentes idades, calculada através da relação altura da lesão/altura da planta. Os valores são médias de 5 plantas (repetições).

## **4.2. Identificação e caracterização preliminar de *C. cacaofunesta*.**

### **4.2.1. Distribuição geográfica na região cacauqueira do sul da Bahia**

Com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre o grau de severidade da doença com base em estudos de agressividade, e sobre a diversidade genética do *C. cacaofunesta* na região, buscou-se estabelecer uma coleção com um número mínimo de isolados que permitisse uma caracterização nesse sentido. Considerando a existência de um zoneamento da região cacauqueira da Bahia e norte do Espírito Santo em que foram constituídos diferentes agroecossistemas de produção de cacau (CEPEC-CEPLAC), realizou-se expedições de coleta de isolados de ceratocystis com base neste zoneamento. Ao todo foram visitados 38 municípios em 13 agroecossistemas, sendo 65 pontos visitados, o que equivaleu a 72 amostras. Destas amostras, o *C. cacaofunesta* foi isolado de apenas 16 delas (Tabela 6). Outras amostras foram gentilmente cedidas por pessoas que observavam os sintomas em fazendas da região cacauqueira da Bahia, e corresponderam a 7 locais denominados SMA (Fazenda Santa Marta no município de Uruçuca); CPMT, CPVS e CPVT (do município de Camacã); MJ (da 'Matinha' no CEPEC – Ilhéus); MC (do município de Ipiaú) e UJ-1 (do município de Una), totalizando 8 isolados (Tabela 6). Os resultados desse esforço de coleta mostraram que as identificações positivas de ceratocystis corresponderam a apenas 15% de todos os pontos amostrados. Uma possível explicação para o baixo índice de isolados em relação ao número de amostras obtidas é a semelhança de sintomas entre a murcha-de-ceratocystis e outros cancos do cacauzeiro, tais como (e principalmente) a 'murcha-de-verticillium'. Desse modo, é alta a probabilidade de que várias das amostragens realizadas de plantas com sintomas tenha ocorrido com plantas infectadas por outros patógenos ao invés do *C. cacaofunesta*.

**Tabela 6:** Distribuição de *Ceratocystis cacaofunesta* na Região cacauceira da Bahia e norte do Espírito Santo. Esforço e sucesso de coleta.

<b>Ponto visitado</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>Município</b>	<b>Agroecossistema</b>	<b>Coordenada GPS</b>	<b>Presença <i>C. cacaofunesta</i></b>
P11	2	Itacaré	Valença	-14 26' 32.06", -39 19' 34.36'	0
P12	7	Santo Amaro	Recôcavo Baiano	-12 34' 25.52", -38 45' 12.72'	0
P13	0	Santo Amaro	Recôcavo Baiano	-12 34' 25.44", -38 45' 12.72'	0
P14	0	Santo Amaro	Recôcavo Baiano	-12 34' 50.50", -38 43' 02.72'	0
P15	2	Laje	Jequiriçá	-12 34' 50.50", -38 43' 02.72'	1
P16	2	Laje	Jequiriçá	-13 11' 20.79", -39 26' 28.03'	1
P17	2	Mutuípe	Jequiriçá	-13 11' 20.41", -39 26' 28.19'	2
P18	2	Mutuípe	Jequiriçá	-13 15' 09.01", -39 30' 43.41'	0
P19	1	Jiquirica	Jequiriçá	-13 15' 07.10", -39 34' 05.17'	1
P20	3	Cravolândia	Jequiriçá	-13 15' 06.79", -39 34' 04.15'	0
P21	0	Cravolândia	Jequiriçá	-13 15' 06.79", -39 34' 04.15'	0
P22	1	Teolândia	Jequiriçá	-13 15' 06.79", -39 34' 04.15'	0
P23	0	P. T. Neves	Valença	-13 28' 20.83", -39 25' 08.11'	0
P24	1	P. T. Neves	Valença	-13 28' 50.93", -39 25' 57.33'	0
P25	7	Valença	Valença	-13 28' 50.90", -39 25' 57.33'	1
P26	3	Valença	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P27	1	Taperoá	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P28	1	Nilo Pecanha	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P29	2	Ituberá	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P30	1	Ituberá	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P31	1	Ituberá	Valença	-13 18' 28.84", -39 16' 28.18'	0
P32	2	Pirai do Norte	Valença	-13 45' 52.39", -39 14' 18.45'	0
P33	0	Pirai do Norte	Valença	-13 46' 37.57", -39 20' 00.57'	0

P34	1	Pirai do Norte	Valença	-13 46' 37.57",-39 20' 00.57'	0
P35	2	Gandú	Ipiaú	-13 46' 37.57",-39 20' 00.57'	0
P36	1	Gandú	Ipiaú	-13 51' 21.91",-39 29' 30.12'	0
P37	1	Itapebi	Itagimirim	-13 51' 22.07",-39 29' 30.13'	0
P38	1	Itapebi	Itagimirim	-13 51' 22.07",-39 29' 30.13'	0
P39	1	Itabela	Itagimirim	-16 31' 53.39",-39 33' 04.64'	0
P40	0	Linhares	Espírito Santo	-16 31' 53.35",-39 33' 04.63'	0
P41	0	Linhares	Espírito Santo	-19 17' 34.23",-39 54' 42.55'	0
P42	1	Mucuri	Caravelas	-19 24' 46.94",-39 54' 42.97'	0
P43	1	Medeiros Neto	Medeiros Neto	-19 24' 46.94",-39 54' 42.97'	0
P44	0	Itamarajú	Itagimirim	-19 24' 46.94",-39 54' 42.97'	0
P45	0	Porto Seguro	Porto Seguro	-16 25' 20.93",-39 08' 21.12'	0
P46	1	Camacã	Camacã	-16 25' 21.21",-39 08' 21.27'	0
P47	0	Ilhéus	Almada	-14 47' 35.96",-39 09' 42.66'	0
P48	1	Ilhéus	Almada	-14 47' 36.05",-39 09' 42.77'	1
P49	0	Una	Valença	-14 47' 36.05",-39 09' 42.77'	0
P50	1	Una	Valença	-14 47' 36.05",-39 09' 42.77'	0
P51	0	Canavieiras	Canavieiras	-14 47' 36.05",-39 09' 42.77'	0
P52	1	Santa Luzia	Camacã	-15 25' 54.48",-39 17' 46.26'	0
P53	0	Santa Luzia	Camacã	-15 25' 38.49",-39 20' 41.64'	0
P54	0	Camacã	Camacã	-15 27' 06.76",-39 26' 58.33'	0
P55	1	Mascote	Camacã	-15 28' 56.36",-39 24' 54.24'	1
P56	0	Itabuna	Almada	-14 50' 37.87",-39 16' 58.96'	0
P57	0	Itabuna	Almada	-14 53' 39.24",-39 17' 16.23'	0
P58	3	Buerarema	Almada	-14 56' 10.02",-39 18' 10.81'	0
P59	1	Buerarema	Almada	-15 02' 20.91",-39 19' 50.83'	0
P60	3	São José da Vitória	Almada	-15 02' 20.97",-39 19' 50.83'	0
P61	0	Jussari	Almada	-15 11' 15.72",-39 26' 15.94'	0
P62	1	Arataca	Camacã	-15 13' 29.34",-39 26' 38.16'	0
P63	1	Camacã	Camacã	-15 26' 51.22",-39 31' 34.43'	0

P64	3	Sta. Cruz da Vitória	Ibucuí	-14 57' 05.45", -39 48' 10.85'	0
P65	0	Uruçuca	Almada	-14 57' 05.29", -39 48' 10.18'	0
P66	0	Uruçuca	Almada	-14 57' 05.29", -39 48' 10.18'	0
P67	0	Aurelino Leal	Ipiaú	-14 19' 21.84", -39 20' 09.94'	0
P68	0	Ubaitaba	Ipiaú	-14 17' 15.37", -39 19' 29.52'	0
P69	1	Ibirapitanga	Ipiaú	-14 13' 49.37", -39 29' 21.55'	0
P70	0	Ipiaú	Ipiaú	-14 04' 51.95", -39 46' 06.00'	0
P71	2	Ipiaú	Ipiaú	-14 10' 48.21", -39 39' 11.31'	0
P72	2	Uruçuca	Almada	-14 30' 25.61", -39 21' 40.08'	0
P73	0	Ilhéus	Almada	-14 46' 19.72", -39 13' 19.51'	0
P74	0	Itabuna	Almada	-14 44' 13.83", -39 19' 56.18'	0
P75	0	Itajuípe	Almada	-14 43' 10.81", -39 21' 52.26'	0
P76	0	Itajuípe	Almada	-14 43' 02.41", -39 21' 28.41'	0
SMA	1	Itabuna	Almada	amostra cedida	1
CPMT	1	Camacã	Camacã	amostra cedida	1
CPVS	1	Camacã	Camacã	amostra cedida	1
CPVT	1	Camacã	Camacã	amostra cedida	1
MJ	1	Ilhéus	Almada	amostra cedida	1
MC	1	Ipiaú	Ipiaú	amostra cedida	1
UJ-1	2	Una	Valença	amostra cedida	1

Para se visualizar geograficamente o trabalho de coleta na região cacaueteira da Bahia e Norte do Espírito Santo, elaborou-se um mapa (Figura 10) dos pontos visitados com base na Tabela 6. O mapa apresenta os pontos visitados, os pontos amostrados (onde se tinha plantas com sintomas considerados válidos para coleta) e os que, após isolamento e identificação em laboratório, confirmaram a presença do *C. cacaofunesta*. Foi claramente observado que a distribuição desse fungo foi centralizada nos agroecossistemas de Valença e Camacã, com 7 e 6 isolados respectivamente. Este fato sugere duas possíveis linhas de raciocínio: ou essa concentração geográfica pode estar relacionada ao uso maior nessas áreas de plantas mais suscetíveis, como a variedade Theobahia (descendente do ICS-1), e, ou estas áreas correspondem aos pontos de entrada na região deste patógeno, mas que, devido a sua forma de propagação por práticas culturais (cujos materiais contaminados, como por ex. o facão de desbrota, tendem a permanecer nas propriedades e áreas respectivas), não se espalhou ainda pelo restante da região. Uma outra possibilidade é a de que o esforço de coleta tenha sido insuficiente, perdendo-se indivíduos infectados por passarem despercebidos.



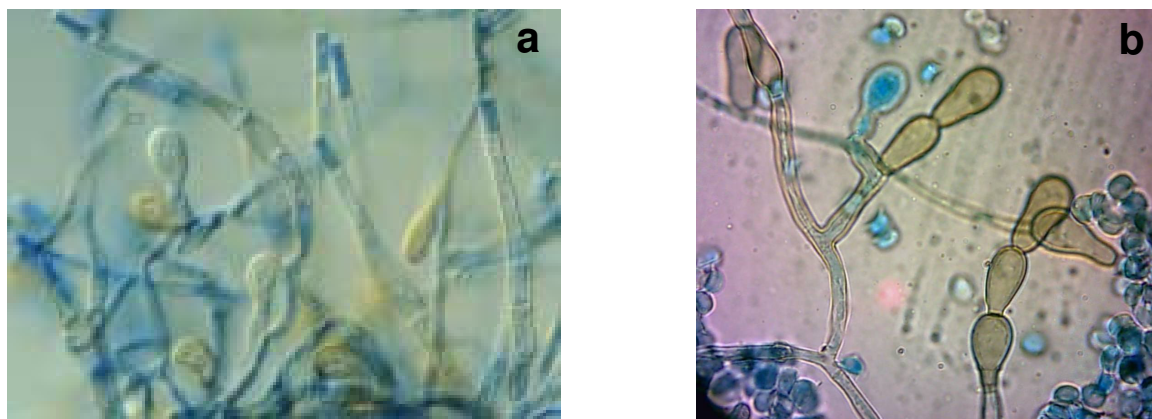
**Figura 10:** Distribuição geográfica dos pontos de coleta na região cacaueteira sul-baiana e norte do Espírito Santo. 'O' = pontos onde não foram encontradas plantas com sintomas; '●' = identificação de plantas com sintomas (amostras); '■' = presença confirmada de ceratocystis. Não inclui amostras cedidas (ver Tabela 6).

#### 4.2.2. Aspectos morfológicos e de cultura do fungo

Em laboratório, foi feito o isolamento de todo material coletado (ver item 3.4), os quais foram mantidos conservados em geladeira a 4 °C. Aparentemente, as colônias mantidas em geladeira estavam “limpas”; contudo, no momento em que se repicou o fungo, percebeu-se que havia um crescimento micelial esbranquiçado diferente, o qual crescia mais rapidamente que as colônias típicas de *Ceratocystis*. Na tentativa de purificar o fungo e renová-lo, dando-lhe mais vigor, foi feito o re-isolamento em iscas de ramos de cacau partidos longitudinalmente e recortados internamente deixando apenas a casca do ramo. O resultado foi favorável, tendo o fungo crescido rapidamente (4 dias) e com muita vitalidade, emitindo uma grande quantidade de peritécios de onde foi coletada a massa gelatinosa rica em ascósporos, típica do *C. cacaofunesta*. No entanto, quando se passou da isca para o meio de cultura (BDA acidificado, ver item 3.4), obteve-se três situações distintas: (i) isolados que não cresceram, (ii) isolados que cresceram numa boa condição, e (iii) isolados que cresceram com a aparente “contaminação” pelos micélios esbranquiçados relatados acima. Num primeiro momento, julgou-se que se tratava de um fungo contaminante, muito fortemente associado ao *Ceratocystis* ou ao material vegetal trazido pela coleta. Contudo, considerando (i) que não se conseguia eliminar essa suposta contaminação após diversas repicagens nas condições mais assépticas e de técnica apurada de re-isolamento, e (ii) que foi encontrado na literatura um relato de uma forma de *resistência* do gênero *Ceratocystis*, isto é, a *Chalara* sp. (BAKER et al, 2003), levantou-se a hipótese de que não se tratava, de fato, de um contaminante. Em fotos publicadas na internet (Figura 11a), observa-se a estrutura e aspecto dos conídios e dos clamidósporos, descritos como característicos dessa espécie que apresenta a forma de resistência de *Ceratocystis* spp. Levando em conta, então, que a massa micelial branca tida como contaminação recalcitrante poderia ser essa forma de resistência de *C. cacaofunesta*, fez-se lâminas deste referido micélio e analisou-se ao microscópio. Pelas estruturas observadas (Figura 11b), os resultados sugerem fortemente que, de fato, trata-se das estruturas modificadas do mesmo fungo – provavelmente de resistência. Uma possível explicação para o surgimento dessas estruturas em nossas condições seria o tempo demasiado grande de conservação das colônias, que pode ter disparado os



mecanismos de resposta a estresse e indução da formação das estruturas de resistência.



**Figura 11:** (a) foto de conídios e clamidosporos caracterizando a forma de resistência de ceratocystis denominada *Chalara* sp. (foto publicada no *website* pessoal de Thomas C. Harrington – [www.public.iastate.edu/~tcharrin/FimbDis.html](http://www.public.iastate.edu/~tcharrin/FimbDis.html)); (b) foto das estruturas encontradas na massa micelial esbranquiçada dos isolados de ceratocystis coletados no sul da Bahia (este trabalho).

Os resultados de distribuição geográfica e caracterização preliminar do fungo apresentados neste trabalho deixam clara a necessidade de se obter um número maior de isolados oriundos de coletas a campo, para que se possa aplicar técnicas modernas de caracterização molecular, visando maior conhecimento da diversidade genética do fungo na região. Esses estudos terão consequência direta em pesquisa descritiva com o objetivo de esclarecer sobre potenciais diferenças de agressividade do patógeno, associadas ou não com localização geográfica, além de outros aspectos importantes para o manejo espacial e temporal deste novo patossistema na região cacaueteira. As evidências morfológicas apresentadas quanto à existência de formas de resistência para este fungo abrem perspectivas de trabalhos taxonômicos e filogenéticos envolvendo *C. cacaofunesta*, nos quais a morfologia pode ser utilizada como um relevante parâmetro de classificação, certamente complementado por outras estratégias metodológicas de confirmação. Tomadas em conjunto, essas informações poderão ajudar a elucidar as razões pelas quais este fungo mantém-se restritamente localizado numa determinada área da região, e qual seria o potencial de disseminação e estimativa de tempo (velocidade) de ocorrência

deste fenômeno; também poderão ser verificadas as taxas de mutação (variação) características desta espécie e como isto interfere nos processos de ataque e disseminação do patógeno. Vale lembrar que, pela natureza da interação planta-patógeno neste caso, onde o final do processo de doença culmina com a morte das plantas de cacau, o perigo de prejuízos irreparáveis à cacauicultura baiana e capixaba é concreto. Assim, ações preventivas urgentes precisam ser tomadas para conter essa possibilidade, para o que será imprescindível o conhecimento técnico-científico a ser obtido por estudos como o deste trabalho.

## 5. CONCLUSÕES

- Experimentos de acompanhamento de plantas de cacaueteiro submetidas à inoculação prévia com *C. cacaofunesta* podem ser realizados para avaliar os níveis de resistência-susceptibilidade de genótipos a esta doença, com base em parâmetro de morte percentual de plantas.
- Diferentes concentrações de esporos utilizadas como inóculo inicial servem para esses experimentos, sendo capazes de discriminar adequadamente genótipos contrastantes quanto à resistência.
- Os genótipos TSH-1188 e ICS-1, testados na forma de mudas seminais, servem como referenciais extremos de resistência e susceptibilidade respectivamente.
- Concentração acima de  $1 \times 10^5$  esporos/mL mostrou-se muito agressiva em seu efeito de morte nas plantas, tanto quando se avaliou o Percentual de Plantas Mortas (%PM), como quando se avaliou a Diferença de Morte (DIF) entre os clones utilizados (TSH-1188 – ICS-1).
- Experimentos comparativos de genótipos baseados no acompanhamento da mortalidade de plantas com o tempo indicam que o melhor momento para proceder com a avaliação é quando o número de plantas mortas (%PM) nos diversos tratamentos pára de crescer, isto é, estabiliza ao longo do tempo.
- A concentração que se mostrou mais eficaz foi a de  $1 \times 10^5$  esporos/mL por permitir uma nítida distinção entre genótipos contrastantes quando o %PM geral do experimento atinge 50%.
- Os efeitos de 'Clones', 'Avaliação' e a interação 'Clone' x 'Avaliação' foram significativos pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

- Foi possível desenvolver métodos analíticos eficazes para o comportamento de clones de cacau submetidos ao ceratocystis com base em parâmetros estatísticos simples como %PM médio geral do experimento (índice de Doença), coeficientes de regressão linear e coeficientes de determinação, que permitiram avaliar os respectivos comportamentos de mortalidade e estabilidade das respostas ao patógeno.
- Foi possível arranjar os clones testados e comparados em três grupos conforme o nível de resistência e o grau de estabilidade da mesma: grupo 'R' (clones TSH-1188 e CEPEC-2008) com elevada estabilidade e baixo %PM; grupo 'MR' (clones CEPEC-2007, CEPEC-2002 e CEPEC-2009) com moderada estabilidade e %PM ao redor da média geral; e grupo 'S' (clones CCN-10, PH-16, CCN-51, HW-25 e SJ-02) com alta instabilidade e alto %PM.
- É também possível avaliar a resposta de genótipos de cacauero ao ceratocystis a partir da medição da Altura Relativa de Lesão (ARL), comparando-se com os respectivos dados para os genótipos referência de resistência e suscetibilidade.
- A distribuição do *C. cacaofunesta* é centralizada nos agroecossistemas de Valença e Camacã, de onde se obteve isolamentos positivos das amostras colhidas de plantas com sintomas.
- Identificou-se a presença da provável forma de resistência do *C. cacaofunesta* em colônias repicadas com muito tempo de preservação em geladeira.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 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**, n. 97, p. 1012-22, 2005.
- ALARCON, C. R. M.. **Determinacion de Resistencia de 250 Clones de Cacao de Origen Nacional al Ataque de Mal-de-Machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted)**. Tesis de Grado. Universidad Agrária del Ecuador. Guayaquil, Ecuador, 1994.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.. Introductory Mycology. Third Edition.
- ARBELAEZ, G. E. **Resistencia de cultivares de cacao a *Ceratocystis fimbriata* (Ellis and Halsted)**. In Sexta Conferencia Internacional de Investigaciones en cacao. Caracas, Venezuela. p. 70-81; 1957.
- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C.; KRAUSS, U.; ALFENAS, A. C.. Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*. The American Phytopathological Society. v. 93, n. 10, p. 1274-1284. 2003.
- BARNES, I.; GAUR, A.; BURGESS, T.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. **Molecular Plant Pathology**. 2 (6), p. 319-325, 2001.
- BEZERRA, J.L.; O.C. de ALMEIDA; E.D.M.N. LUZ; S.D.V.M. SILVA. 1998. **Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no Estado da Bahia**. *Fitopatologia Brasileira* 23 (Suplemento), 228p.
- BRADWAJ, C.L. and SING, B.M.. Interaction of minor host genes for resistance to ***Puccinia striiformis*** with changing temperature regimes. *Phytopathology* 59:999-1001. 1983.
- CARMO, M. G. F.; CARVALHO, A. O. Podridão Pós-Colheita de Cenoura Causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia brasileira*, 28(1), jan - fev 2003.

- CENEX. **Manual de recomendações para o controle da vassoura-de-bruxa.** Centro de Extensão, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), 1997.
- CHONG, G. L. **Desarrollo de la infección y naturaleza de la resistencia clonal a *Ceratocystis fimbriata*.** Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agronomo. Guayaquil, Ecuador, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad de Guayaquil. 120p. 1961.
- COITÍA, W.; ROSALES, C. J.. Relación entre la incidencia de escolítidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela. **Manejo Integrado de Plagas** (Costa Rica), n. 62, p. 65-71, 2001.
- COUTO, V. de A.. O território do cacau no contexto da mundialização. Bahia Análises & Dados. Salvador-BA. SEI v.9, n.4, p.38-52, Março 2000.
- CRONE, L. J.; BACHELDER, S.. Insect transmission of canker stain fungus, *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Plantaini*. **Phytopathology** 77, 576. 1961.
- DELGADO, J. C.; ESPINOZA, A. S.. **Fatores intrínsecos que influyen em la eficácia de la prueba de laboratorio usada para evaluar la resistência a *Ceratocystis fimbriata* en cacao.** Turrialba: v. 21, n. 1, p. 13-17, trimestre enero-marzo, 1971.
- DELGADO, J. **Estúdio de la resistencia del cacao al mal de machete producido por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Holsted.** Turrialba, Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 42; 1964.
- DELGADO, R.. Fuentes de resistencia al mal del machete en accesiones de cacao silvestre coletadas en la Amazonia Ecuatoriana. XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal. Latacunga, Ecuador, noviembre, 2003.
- DELGADO, R.; SUÁREZ, C.. **Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao.** XII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal. Latacunga, Ecuador, noviembre 19-21, 2003.
- DIAS, L. A. S.. **Melhoramento genético do cacaueiro.** Viçosa-MG. FUNAPE, UFG. 578 pág., 2001.

- DOMINGUEZ R., P. F.; VELASQUEZ, F.. **Selección de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) por resistencia al hongo *Ceratocystis fimbriata***. Rev. Fac. Agron. (Maracay), p. 57-73, v. 6, n. 4, Diciembre, 1972.
- EBERHART, S.A. and RUSSEL, W.A.. **Stability parametrs for comparing varieties**. Crop Science 6:36-40. 1966.
- ENRÍQUEZ, G. A.; SORIA A. J. . **Mejoramiento genético para resistencia a cinco enfermedades del cacao**. Revision de Literatura. Centro Agronomico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa Rica, 1984.
- FINLAY, K.W. and WILKINSON, G.N.. **The analysis of adaptation in a plant-breeding programme**. Australian Journal of Agricultural Research 14:742-754. 1963.
- FÓRUM NACIONAL DA AGRICULTURA. Grupo Temático Cacao. Proposta básica de políticas para a cadeia produtiva do cacao. [s. l.] FNA, 108 pág., 1997 .
- GALLI, F. **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas, vol. II. Ed. Agronômica Ceres LTDA. 1980.
- GALLO, P. B.; *et. al.* Importância do Porta-Enxerto Resistente à Seca-Da-Mangueira Causada por *Ceratocystis Fimbriata*. Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócios de Frutas – IAC.
- GRAMACHO, I. DA C. P.; MAGNO, A. E. DE S.; MANDARINO, E. P.; MATOS, A.. **Cultivo e Beneficiamento do Cacao na Bahia**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. CEPLAC. Ilhéus-BA-Brasil, 1992.
- GUERRERO, H. A. M. de O. **Estudio de la resistencia a *Ceratocystis fimbriata* Ellis y Halst., en híbridos y clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando dos metodos de evaluacion**, Tesis de grado Magister Scientiae. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de La OEA. Turrialba, Costa Rica. 1975.
- HARRINGTON, TC. **Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata***. Fitopatologia Brasileira, 25 (Suplemento), 262-263. 2000.
- HARRINGTON, T. C.; McNEW, D.; STEIMEL, J.; HOFSTRA, D.; FARREL, R.. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm

- disease fungi. *Micologia*. The Mycological Society of America, Lawrence. 93 (1), pp. 111-136, 2001.
- ITON, E. F.. *Ceratocystis* wilt. In: Annual Report on Cacao Reserch, 1965, p. 44-56. University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad. 1966.
- LAWRENCE, J.S.; CAMPÊLO, A.M.F.L.; FIGUEIREDO, J.M. Enfermidades do cacaeiro. III – Doenças fúngicas vasculares e radiculares. *Agrotrópica (Brasil)* 3(2): 65-73. 1991.
- LAWRENCE, J. S. Enfermedades del cacao en Costa Rica y su control. CATIE, Turrialba, Costa Rica. S.d. (sem data).
- LUZ, E.D.M.N.; S.D.V.M. SILVA; K.P. GRAMACHO. 2000. **Seleção de clones de cacaeiro para resistência a *Ceratocystis fimbriata***. 2000. *Fitopatologia Brasileira*, 25 (Suplemento), 389p.
- MALONE, E.; et al. 2004. **Estudos de Dissimilaridade genética entre 17 genótipos de trigo mediante marcadores moleculares ISSR**. Resumos do XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. [http://www.ufpel.edu.br/xiicic/relatorios/conteudo\\_CA.html#00861](http://www.ufpel.edu.br/xiicic/relatorios/conteudo_CA.html#00861) – 07/03/2005 / 10:10h.
- MARIN, M.; CASTRO, B.; GAITAN, A.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian Coffee-Growing regions based on molecular data an pathogenicity. *J. Phytopathology*, 151, 395-405, 2003.
- MATA, S. N. 1991. **Metodos de Inoculacion de *Ceratocystis fimbriata* e Evaluacion de Resistencia en Cacao**. Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Agronomía con énfasis en Producción. Universidade de Costa Rica, Turrialba, Costa Rica.
- MEDEIROS, A. B. P.; CHRISTEN, P.; ROUSSOS, S.; GERN, J. C.; SOCCOL, C. R.. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34:245-248, 2003.
- OCAMPO R., F.; CORREA N., J. T.. Evaluacion de hibridos de cacao al Mal-de-Machete. *El Cacaotero Colombiano*, n. 6, Setiembre, 1978.



- PAIM, M. C.; CASTRO, W.. Cacau “Jaca” resistente a *Ceratocystis fimbriata* na região cacauera da Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29:538-540. 2004.
- PINTO, L. R. M. ; SILVA, S. D. V. M. . **Estabilidade do comportamento da resistência horizontal das plantas aos patógenos..** In: XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1987, Londrina - PR. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília - DF : Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1987. v. 12. p. 133-133).
- PINTO, L. R. M. ; SILVA, S. D. V. M. ; YAMADA, M. M. . **Estabilidade da resistência de progenitores de clones de cacauero a *Phytophthora* spp..** In: XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1987, Londrina - PR. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília - DF : Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1987. v. 12. p. 13-13.
- PINTO, L. R. M. ; SILVA, S. D. V. M. ; YAMADA, M. M. . **Estabilidade fenotípica para resistência a *Phytophthora* spp. em clones de cacauero..** In: XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996, Campo Grande - MS. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília - DF : Sociedade Brasileira de Fitopatologia., 1996. v. 21. p. 404-404;
- PINTO, L. R. M. ; SILVA, S. D. V. M. ; YAMADA, M. M. . **Seleção de progenitores de híbridos de cacauero resistentes a *Phytophthora* spp..** *Agrotropica*, Ilhéus - BA, v. 1, p. 104-107, 1989).
- PINTO, L. R. M.; PIRES, J. L.. Seleção de Plantas de Cacau Resistentes à Vassoura-de-bruxa. *Boletim Técnico* n. 181 – Ministério da Agricultura e do Abastecimento. CEPLAC/CEPEC. Ilhéus-BA, 1998.
- PRABHU, A.S.; ZIMMERMANN, F.J.P.; SOAVE, J.; SOUZA, N.R.G.; CURVO, R.C.V.; LOPES.A.M.; SOBRAL, C.A.M.; FERREIRA,R.P.; KOBAYASHI,J.; GALVÃO,E.L.P. 1991. **Estabilidade de resistência a brusone, mancha parda, escaldadura e mancha estreita nas folhas em arroz.** In: III Reunião Nacional de Pesquisa de arroz. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP. P. 438-58. Documento 25.
- RESENDE, M.L.V. **Vascular wilt of cocoa (*Theobroma cacao* L.), caused by *Verticillium dahliae* Kleb.: Studies on pathogenicity and resistance.** Bath, U.K., University of Bath. 1994. 216p. (Tese de Ph.D.).

- SAUNDERS, J. L. **Scolytidae end platypodidae associated with Ceratocystis wilt or Theobroma cacao L. in Costa Rica.** Ph. D. Thesis. Madison, University of Wisconsin, 1963. 67p.
- SILVA, S. D. V. M. ; PINTO L.R.M ; YAMADA, M. M. . **Estabilidade fenotípica e previsibilidade da resistência de cacauero.** Fitopatologia Brasileira., Brasília - DF, v. 20, p. 416-421, 1995;
- SILVA, S.D.V.M. et al. Indicações de resistência à murcha-de-ceratocystis em genótipos de cacaueros no sul da Bahia, Brasil. 15a. Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau. 2006.
- SILVA, S.D.V.M. 2003. **Ensaio para avaliação do cacauero à murcha-de-Ceratocystis na Bahia, Brasil.** 14ª Conferência Internacional de Pesquisas do Cacau. 1-11p.
- SILVA, S.D.V.M.; E.D.M.N LUZ. 2000. **Ceratocystis fimbriata em cacaueros das variedades Theobahia cultivadas na Bahia.** Fitopatologia Brasileira, 25 (Suplemento), 424p.
- STEIMEL, J.; ENGELBRECHT, C. J. B.; HERRINGTON, T. C.. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. Molecular Ecology, notes 4, 215-218. 2004.
- WINGFIELD, M. J.; DE BEER, C.; VISSER, C.; WINGFIELD, B. D.. A new *Ceratocystis* species defined using morphological and ribosomal DNA sequence comparisons. Systematic and applied microbiology (Syst. appl. microbiol.), v. 19, n° 2, pp. 191-202 (1 p.) 1996.
- WITTHUHN, R. C.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; HARRINGTON, T. C.. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis* sensu stricto. **Mycol. Res.** 103 (6): 743-749, 1999.
- WOOD, G.A.R.; R.A. LAR. 1985. **Diseases of cocoa.** Oxford: Clarendon Press.
- YAMADA, M. M. ; SILVA, S. D. V. M. ; PINTO, L. R. M. . **Evaluation of phenotypic stability of resistance to *Phytophthora* spp. in cocoa clones.** In: 12 Conferência Internacional de Pesquisas do Cacau, 1999, Salvador - BA. Anais 12 Conferência Internacional de Pesquisas do Cacau. London - England : Cocoa Producers'Alliance, 1999. p. 509-514) e.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; HARRINGTON, T. C. Silva, J. F.. Resistance of *Eucalyptus* Clones to *Ceratocystis fimbriata*. **Plant disease** / v. 88 n.7, p. 758-760. July 2004.