

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**



**Métodos de Avaliação, Níveis de Resistência à Murcha de
Ceratocystis e Diversidade Genética de Cultivares Locais de
Cacau da Bahia**

ALBERTO MONTEJO DIAZ

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Novembro de 2020**

**Métodos de Avaliação, Níveis de Resistência à Murcha de
Ceratocystis e Diversidade Genética de Cultivares Locais de
Cacau da Bahia**

Tese apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de doutor em
Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e
Biologia Molecular

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
Novembro de 2020**

Dedicat3ria

Dedicado a mi madre la Prof.^a REMEDIOS DIAZ BAYONA, a mi hermano el Prof. BENJAMIN MONTEJO DIAZ y en especial a la memoria de mi tía la Prof.^a DOMINGA DIAZ BAYONA. Gracitas por su amor incondicional.

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente a minha família, a minha mamãe a Prof.^a Remédios Diaz Bayona e a meu irmão o Prof. Benjamin Montejo Diaz, por todo o apoio e o amor mostrado durante toda minha vida, obrigado por tudo sem vocês nada disto teria sido possível.

Agradeço a minha enamorada a Med. Lily Karina Jimenez Hernandez, que tem-me apoiado sempre em todos meus sonhos.

Agradeço também a meu orientador o Dr. Ronan Xavier Corrêa pelo apoio mostrado durante toda minha pesquisa e pela oportunidade de ser seu orientado, obrigado por todo aprendizado.

A toda a equipe de trabalho do laboratório de marcadores moleculares, especialmente a Dr.^a. Alice Lichs Marssaro, minha eterna parceira na pesquisa e grande amiga, obrigado por todos os bons momentos e por todas as risadas, ao Dr. Clausio Antônio Ferreira de Melo, obrigado pela paciência e por tirar tantas dúvidas.

Agradeço de igual forma a meus grandes amigos, a Dr.^a Irma Yuliana Mora Ocampo e ao Bio. Andres David Sarmiento, quem tem-me brindado sua amizade e apoio.

Agradeço também a minha coorientadora a Dr.^a Edna Dora Martins Newman Luz e a toda sua equipe de trabalho da CEPLAC, assim como as técnicas do laboratório que disponibilizaram seu tempo para me orientar em todo momento no laboratório de *Phytophthora*.

Agradeço ao Conselho Nacional de Ciência y Tecnología do México, pela concessão a mim da bolsa de doutorado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Por último agradeço a todos meus colegas e amigos que me acompanharam durante esta aventura. Obrigado a todas as pessoas envolvidas no desenvolvimento de minha pesquisa, sem vocês nada disto teria sido possível, muito obrigado!!!!

ÍNDICE

EXTRATO.....	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
Ceratocystis	16
Ceratocystis fimbriata	18
Ceratocystis cacaofunesta.....	21
Associação de marcadores moleculares a resistência a murcha de ceratocystis	25
Capítulo I	28
1. Introdução	29
2. Métodos de Avaliação da Resistência do Cacaueiro à Murcha de <i>Ceratocystis</i>	33
2.2 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em ramos destacados (Soria & Salazar, 1965)	33
2.2.1 Análise estatística.....	33
2.2.2 Aplicações.....	33
2.3 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em ramos no campo (ECHANDI, 1965)	34
2.3.1 Análise estatística.....	35
2.3.2 Aplicações.....	35
2.4 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> por incisão em mudas em casas de vegetação (SILVA et al., 2012).....	36
2.4.1 Análise estatística.....	36
2.4.2 Aplicações.....	37
2.5 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> por miniestaquia em espuma fenólica (MAGALHAES et al, 2015).....	37
2.5.1 Análises estatística	38
2.5.2 Aplicações.....	39
2.6 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em disco foliar (MAGALHAES et al, 2016)	39
2.6.1 Análise estatística.....	40

2.6.2 Aplicações.....	40
2.2 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em ramos destacados (Soria & Salazar, 1965)	41
2.2.1 Análise estatística.....	41
2.2.2 Aplicações.....	42
2.3 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em ramos no campo (ECHANDI, 1965)	42
2.3.1 Análise estatística.....	43
2.3.2 Aplicações.....	43
2.4 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> por incisão em mudas em casas de vegetação (SILVA et al., 2012).....	44
2.4.1 Análise estatística.....	45
2.4.2 Aplicações.....	45
2.5 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> por miniestaquia em espuma fenólica (MAGALHAES et al, 2015).....	46
2.5.1 Análises estatística	47
2.5.2 Aplicações.....	47
2.6 Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em disco foliar (MAGALHAES et al, 2016)	47
2.6.1 Análise estatística.....	48
2.6.2 Aplicações.....	48
3. DISCUSSÃO	49
4. CONCLUSÃO	51
Apoio Financeiro	52
REFERÊNCIAS.....	55
Capítulo II	57
Resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i> em acessos de cacauzeiros comum da Bahia	57
1.Introdução.....	58
2.Metodologia	60
2.1 Material biológico	60
2.2Avaliação da resistência à Murcha de <i>Ceratocystis</i>	61
2.3 Análises estatísticas.....	62
3. Resultados	63
4.Discussão.....	67
5.Conclusões	69
Agradecimentos	!Error! Marcador no definido.
REFERÊNCIAS.....	70

Capítulo III	74
Caracterização da Diversidade Genética em Variedades Locais de Cacau da Bahia com Marcadores Microssatélites	74
1. Introdução	74
2. Metodologia	75
2.1 Genotipagem de cacauzeiros marcadores moleculares	76
2.2 Análises moleculares	76
3. Resultados	77
4. Discussões e perspectivas	78
REFERÊNCIAS	79
CONCLUSÃO GERAL	82
REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES	83

EXTRATO

Alberto Montejo Diaz, Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, novembro de 2020. **Métodos de Avaliação, Níveis de Resistência à Murcha de *Ceratocystis* e Diversidade Genética de Cultivares Locais de Cacau da Bahia**. Orientador: Dr. Ronan Xavier Corrêa. Co-orientadora: Dr.^a Edna Dora Martins Newman Luz.

O fungo *Ceratocystis cacaofunesta* é um patógeno oportunista que infecta o cacauero através de ferimentos ocasionados pelo homem ou insetos, provocando a doença denominada Murcha de *Ceratocystis*. Essa é uma das principais doenças na região de plantio de cacau no Brasil, principalmente em plantações onde não se aplicam métodos de controle fitossanitário e por práticas mal conduzidas pelos agricultores. O uso de cultivares resistentes constitui um método mais eficiente para o controle da doença. A seleção de genótipos resistentes mediante o uso de marcadores moleculares pode ser aplicada em programas de melhoramento genético. No entanto, a identificação de marcadores moleculares que sejam estreitamente relacionados com loci de resistência às doenças pode ser uma grande ferramenta para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Assim, três objetivos foram definidos no presente trabalho. O primeiro objetivo consistiu em revisar os diversos métodos de inoculação para facilitar a escolha do método que melhor se adequa a diferentes situações de estudo, para isso no capítulo I com base na literatura, foi realizada uma análise comparativa de cinco diferentes métodos de inoculação do cacauero com o fungo causador da murcha vascular, *C. cacaofunesta*. Ficou evidente que existem diferenças marcantes entre eles, principalmente quanto à forma e ao local de inoculação. Outros fatos que influenciam a tomada de decisão sobre qual método deve ser utilizado são o material vegetal e o tempo disponíveis para a obtenção de dados. Assim, os métodos descritos neste trabalho apresentam vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento de sua aplicação. O segundo objetivo foi caracterizar amostras de variedades locais de cacau da Bahia quanto a seus níveis de resistência à Murcha de *Ceratocystis*, visando identificar fontes de resistência a essa doença. Nesta caracterização, as amostras de folhas de cada planta foram inoculadas com uma suspensão de esporos de *C. cacaofunesta*. Com base no teste de Scott Knott, foram identificados 4 grupos (A1 com a menor intensidade de sintomas, A2, A3, e A4 com a maior intensidade de sintomas) representando os

diferentes níveis de resistência. A variedade Maranhão (MA) apresentou a maior proporção de plantas avaliadas no grupo A1 (71,8%), a variedade Pará (PA) teve a maior proporção de plantas avaliada como A2 (36,3%), e a variedade Comum (CO) como A3 (32,6%), todas as variedades apresentaram plantas avaliadas no grupo A4 sendo a variedade Comum (CO) quem teve a maior proporção de plantas avaliadas como A4 (16,6%). Portanto, foram encontradas plantas que apresentam resistência a essa doença, as quais podem ser úteis como fontes de resistência, bem como confirmar associações entre marcadores moleculares e o fenótipo de resistência. O terceiro objetivo visou amplificar DNA de cada acesso amostrado no campo com marcadores microssatélites para analisar a diversidade genética dessas variedades locais de cacau e lançar as bases para um estudo de associação marcador-fenótipo. Assim, para investigar se o cacau local possui variação nos locos previamente associados com resistência à murcha de *Ceratocystis*, uma amostra de DNA de cada planta foi amplificada com primers SSR. Até o momento, foram genotipados cinco locos, em 92 plantas assim como os genótipos CCN-51 e o cacau Jaca que são os controles suscetíveis e resistente respectivamente. Além dos controles, também foram acrescentados os clones Sca6 e o Cep1, totalizando 96 plantas genotipadas. A análise de diversidade e os testes de associação para investigar a validade desses locos como marcadores de resistência nessa população serão feitas posteriormente.

Palavras chaves: *Ceratocystis cacaofunesta*, Genotipagem, Fonte de resistência, *Theobroma cacao*.

1. INTRODUÇÃO

A murcha de *Ceratocystis* foi detectada em cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) pela primeira vez em 1918, no Equador, adquirindo importância epidemiológica nas décadas dos 1950 e 60 (DELGADO & SUÁREZ., 2003). No Brasil, foi detectada pela primeira vez em 1978 em Rondônia; logo depois, foi encontrada em 1997 na Bahia em mudas enxertadas em viveiros e em plantas adultas no campo (BASTOS, 1978; BEZERRA et al., 1998 BEZERRA, 1997,1998). Essa é uma murcha vascular que é causada por *Ceratocystis cacaofunesta* (ELLIS & HALSTED, 1957) e continuou sendo uma das maiores preocupações na região tropical produtora de cacauzeiro do sudeste da Bahia (SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2018). Essa doença encontra-se disseminada em plantios da variedade Theobahia seminal (Sca6 x ICS-1), uma variedade que foi amplamente plantada na Bahia para controlar a disseminação da doença bassoura de bruxa. Infelizmente a variedade Theobahia tem sido reportada como suscetível ao ataque de *Ceratocystis* (ASHA RAM et al., 2004), mas que atualmente não existem dados sobre novos plantios com a variedade Theobahia na região.

O fungo *C. cacaofunesta* é descrito como um parasita secundário e oportunista que infecta o cacauzeiro através de ferimentos ocasionados pelo homem ou insetos (ASHA RAM et al., 2004). Este tipo de fungo é considerado oportunista já que não tem um sistema próprio de penetração na planta e só podem infectá-la através de ferimentos. Os sintomas ocasionados posteriormente à penetração da planta por esse patógeno variam muito dependendo da fitossanidade da planta no momento da infecção. Geralmente esse fungo penetra por ferimentos provocados por práticas culturais na planta, tais como, podas e colheitas, ocasionando cancro no tronco, murcha e seca dos ramos de toda planta e podridão dos frutos (SILVA et al., 2004). O fungo *C.*

cacaofunesta ataca o xilema das plantas afetando sistema vascular, impedindo o fluxo correto de nutrientes e de água. Esse patógeno aproveita que o xilema tem uma baixa pressão osmótica o que facilita a penetração (ENGELBRECHT & HARRINGTON., 2007). O fungo movimenta-se na planta através do xilema secundário (meristemático secundário ou vascular) que é um tecido vascular responsável pela distribuição de água e nutrientes na planta, provocando a murcha das folhas e a posterior morte da planta (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005).

A proliferação da doença é feita por galerias produzidas no tecido da planta viva por insetos vectores dos gêneros *Xyleborus* e *Xylosandrus*, que disseminam propágulos do fungo de plantas doentes para sadias, assim como pelo homem com o uso de ferramentas infetadas (SAUNDERS, 1965; OLIVEIRA, 2005).

Devido ao curto espaço de tempo entre os sintomas aparentes da doença e a morte da planta, ainda não é possível fazer qualquer tipo de controle em plantas infectadas. Portanto, o uso de cultivares resistentes e o tratamento preventivo tornam-se de grande importância no controle da disseminação da doença, sendo estas as medidas mais eficientes, econômica e ecologicamente corretas de manejo da doença (SILVA et al., 2007). A dificuldade de usar uma metodologia que avalie um número maior de genótipos em menor tempo tem limitado a seleção de material genético resistente. Esta dificuldade encontra-se principalmente na Bahia e deve-se à agressividade associada ao patógeno, (SILVA et al., 2007). Foram relatadas que a doença encontra-se em toda a região cacauera da Bahia, do Espírito Santo e do Pará. Assim, a busca de fenótipos que possam ser fonte de resistência a murcha de *Ceratocystis* torna-se de vital importância na região cacauera da Bahia (ALMEIDA et al., 2005).

A avaliação fenotípica da resistência à murcha de *Ceratocystis* é baseada em métodos que requerem o uso de plantas cultivadas, porém esses métodos dificultam a determinação do tipo de herança envolvida neste tipo de patossistema (SANTOS et al., 2012). A identificação de marcadores moleculares que sejam estreitamente relacionados a loci de resistência a doenças pode ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de cultivares resistentes. A seleção de genótipos resistentes mediante o uso de marcadores moleculares pode ser aplicada em programas de melhoramento genético (SANTOS et al., 2012).

Pesquisadores já têm desenvolvido mapas de ligação para o cacaueteiro, utilizando diferentes populações e diferentes marcadores moleculares (FALEIRO et al., 2006; PUGH et al., 2004; SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2018).

O primeiro mapa genético do cacaueteiro no Brasil foi criado na CEPLAC (Comissão executiva do plano da lavoura cacaueteira), utilizando população resultante da autopolinização do clone híbrido TSH 516 (selecionado em Trinidad e Tobago para a resistência a Vassoura de Bruxa) (ASLAM et al., 2011). Nesta população já foram realizados diversos estudos quantitativos (LANAUD et al., 2009). Pelas características muito agressivas do patógeno, a resistência genética pode ser a estratégia mais adequada para o controle desta doença. Porém os programas de melhoramento precisam avaliar e desenvolver os genótipos de cacaueteiro que possam ser resistentes à murcha de *Ceratocystis* da maneira mais rápida e confiável (SANTOS et al., 2012). Anteriormente, demonstrou-se que a doença pode variar de intensidade em diversos clones de cacaueteiro (SILVA et al., 2006). Porém, existem diversas regiões no genoma que podem explicar a variação fenotípica para resistência, estas regiões devem ser pesquisadas para identificar os genes que conferem resistência (SANCHES., 2006; SANTOS et al., 2012; FERNANDES et al., 2018).

A utilização de marcadores moleculares para a caracterização genética tem demonstrado ser uma ferramenta de grande eficácia na quantificação da diversidade genética de plantas. Tem sido observado que 4,04 % das tecnologias relacionadas com marcadores microssatélites também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido associadas com resistências a doença, desse 4% até 20,69%, estão relacionadas com respostas a fungos patogênicos, porém este tipo de marcadores pode ter aplicações no mapeamento genético visando o melhoramento do cultivo do cacaueteiro (SANTOS et al., 2012). O aumento na densidade de marcadores SSR no mapa genético facilitará a associação de estudos e mapeamento com o objetivo de identificar associações marcadores/fenótipo (SANTOS et al., 2012).

Os mapas genéticos existentes para resistência do cacaueteiro à murcha de *Ceratocystis* referem-se a clones cuja genealogia difere das variedades locais de cacaueteiro, deixando a dúvida sobre a validade desses marcadores nas populações locais (SANTOS et al., 2012). Uma pesquisa em 2014 utilizou os genótipos TSH-1188 e CCN-51, os quais têm origem em Trinidad e Venezuela

respectivamente (FERNANDES, 2014). Esses materiais têm sido descritos como resistente (TSH-1188) e suscetível (CCN-51) a essa doença. Em outro estudo em 2015, foram utilizados os genótipos Sca-6 e ICS-1, os quais têm origem no Peru e Equador, respectivamente. Esses materiais têm sido descritos como resistente e suscetível respectivamente (SANTOS, 2012). Outros clones de cacau como BB115, BS1319, e SJ02 também tem sido utilizado em diversos estudos (SILVA, 2012).

Um estudo recente utilizando a técnica de mapeamento de QTL identificado no cromossoma IX, possíveis genes relacionados a resistência a murcha de *Ceratocystis* e no cromossoma IV, foram identificados oito genes, estes genes têm sido relacionados com a codificação de proteínas ricas em leucina (LRR) que são proteínas que interagem com o patógeno ao reconhecer os efetores (FERNANDES et al., 2018).

Os estudos de diversidade genética de materiais locais indicam que com o tempo os cruzamentos naturais e artificiais entre as diversas variedades de cacauero podem ter contribuído na diversidade gênica do cacauero da região, dando origem a variedades que podem ser usadas como fonte de resistência a doenças em programas de melhoramento (SANTOS et al., 2015). Outros estudos realizados na Bahia têm demonstrado que a diversidade genética nas plantações comerciais de cacauero é mais ampla que a encontrada entre os genótipos do banco de germoplasma (BOTELHO et al., 2008). Considerando-se essas três constatações, pelo fato do cacauero da Bahia ter sido pouco pesquisado quanto a diversidade genética, é possível que existam acessos de cacauero que apresentem resistência a doença que ainda não foi descrita. Portanto, estas fontes de resistência poderiam ser utilizadas para o melhoramento e criação de novas variedades resistentes a doenças. Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho revisar os diversos métodos de inoculação para facilitar a escolha do método que melhor se adeque a diferentes situações de estudo, caracterizar variedades locais de cacau da Bahia quanto a seus níveis de resistência à Murcha de *Ceratocystis*, visando identificar fontes de resistência a essa doença, assim como amplificar DNA de cada acesso amostrado no campo com marcadores microssatélites para analisar a diversidade genética dessas variedades locais de cacau.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Theobroma cacao L.

O cacauzeiro (*Theobroma cacao L.*) é uma espécie apreciada por suas amêndoas, que são utilizados para a produção de vários produtos, principalmente para produção de chocolate, cosméticos e farmacêuticos (CUATRECASAS, 1964). Trata-se de uma espécie alógama, típica de clima tropical, com centro de origem na bacia amazônica (SOUZA & DIAS, 2001). No ano 1746, o cacauzeiro foi introduzido no sul da Bahia, no município de Canavieiras (DIAS, 2001; GRAMACHO et al., 1992). Com as condições de plantio ideais para o cultivo de cacauzeiro encontradas na Bahia, a lavoura cacauzeira tornou-se o maior fator de crescimento econômico na região sul desse Estado.

De acordo com as características morfoagronômicas, foram considerados como grupos geográficos distintos: crioulo, forasteiro e trinitário, com centros de origem no ocidente dos Andes para o crioulo e no oriente para o forasteiro, a variedade denominada trinitário surge do cruzamento entre forasteiro e crioulo (DIAS, 2001; GRAMACHO et al., 1992). O genótipo denominado crioulo foi das primeiras variedades a serem domesticadas e cultivadas (MOTAMAYOR et al., 2002), por suas características sensoriais é considerado uma das melhores variedades para a produção de chocolate fino. Infelizmente, esta variedade de cacauzeiro apresenta baixo desempenho agrônomico e mostra-se susceptível a diversas doenças (MOTAMAYOR et al., 2003).

A produção de cacauzeiro ocupava o terceiro lugar nos produtos agrícolas em nível mundial até o ano de 2007, só depois do açúcar e café (ANON, 2007). A América do Sul produz aproximadamente 14% da produção mundial, sendo o Brasil o maior produtor da região (LIMA et al., 2011). Essa produção se concentra

principalmente nos estados da Bahia, Pará, Espírito Santo e Rondônia. Até a década de 1950, o Brasil foi considerado o principal produtor a nível mundial, atualmente o maior produtor de cacaueteiro a nível mundial é a África, principalmente Costa de Marfim e Gana, com uma produção de 60% e 20% respetivamente (SCHWAN & WHEALS, 2004; LIMA et al., 2011). A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) divulgou os dados de produção 2016, mostrando a Bahia como principal produtor de cacaueteiro, com até 54% da produção nacional em 2016, para o ano 2017 a produção foi maior no Estado do Pará (49%) e da Bahia (45% da produção nacional).

Em 1987 uma série de fatores como a queda de preços e descapitalização dos produtores provocou uma forte crise na região sul da Bahia, que foi fortemente agravada pela disseminação do fungo *Moniliophthora perniciosa* causador da doença denominada Vassoura de Bruxa no ano 1989 (PEREIRA et al., 1989; AIME & PHILLIPS-MORA, 2005; CROZIER, 2006). Todos esses fatos fizeram cair a produção de 400.000 toneladas por ano para menos de 150.000 toneladas por ano (DIAS, 2001).

No Brasil, mais de 3 milhões de pessoas dependem da comercialização do cacaueteiro, sendo uma espécie de grande importância na economia nacional (SOUZA & DIAS, 2001). A região Sul da Bahia é onde se concentra a maior produção de cacau do Brasil. Em torno de 100 municípios, com uma área total maior de 700 mil hectares, baseiam suas economias na produção e comercialização de cacaueteiro (SOUZA & DIAS, 2001).

Ceratocystis

Os fungos do gênero *Ceratocystis* encontram-se distribuídos em diversos locais do mundo. As espécies *C. paradoxa*, *C. cacaofunesta* e *C. fimbriata* têm sido descritas no Brasil afetando cultivos de cana de açúcar, cacaueteiro, figo, manga, eucalipto e seringueira (BAKER, 2004; FIRMINO & FURTADO, 2014). *Ceratocystis* é um gênero que ocasiona grandes perdas econômicas, pois provoca a doença Murcha de *Ceratocystis* em cultivares de grande importância econômica (SOANES et al., 2008).

Ceratocystis abriga espécies homotáticas que podem se reproduzir sexuada e assexuadamente. Quando os ascósporos são liberados, o fungo

produz compostos voláteis que atraem insetos do gênero *Ambrosia* (WITTHUHN et al., 2000; ENGELBRECHT et al., 2004; WILKEN et al., 2014). Esses insetos funcionam como vetores, levando os ascósporos até uma nova planta hospedeira. Esta espécie pode infectar todos os tecidos da planta, o que a difere de outros fungos vasculares que só podem infectar tecidos vasculares (BEAVER, 1989; ENGELBRECHT et al., 2005).

Este gênero é descrito como tendo um genoma pequeno e menor conteúdo gênico quando são comparados com outras famílias de fungos filamentosos (FLICK et al., 1993; MOLANO et al., 2018). Estudos sugerem que no gênero *Ceratocystis* o crescimento da família Fosfoinositida-Fosfolipase C (PI-PLC), está estreitamente relacionado com sua patogenicidade. Estudos comparativos entre diversas isolados de *Ceratocystis* revelaram que os isolados com mais genes codificadores de PI-PLC são mais agressivas o que pode indicar também um processo de especiação (MOLANO et al., 2018). No genoma de *Ceratocystis* existe um grande número de proteínas extintas comparados com outros genomas (MOLANO et al., 2018).

Seu principal modo de infecção é através dos ferimentos ocasionados nas plantas seja pela manipulação pelo homem ou por insetos (HARRINGTON et al., 2011; MAZÓN et al., 2013). Quando o esporo consegue ingressar na planta este germina, infectando as células do parênquima do xilema em forma radial, as hifas geradas pelo fungo infectam os vasos xilemáticos das plantas (ARAÚJO et al., 2014). Nessa etapa são produzidos conídios de menor tamanho pelo fungo, que infectam a planta em sua totalidade. Posteriormente, géis de polissacarídeos e compostos fenólicos invadem os tecidos vasculares da planta, ocasionando a obstrução vascular, murcha, necrose e posterior morte da planta (SANTOS et al., 2013; CABRERA et al., 2016).

Para que um fungo possa infectar uma planta é necessário o reconhecimento entre o patógeno e hospedeiro, denominado gene a gene, para que esse reconhecimento seja possível são ativadas vias metabólicas no patógeno e no hospedeiro, estas vias iniciam o intercâmbio de sinalizações químicas e físicas entre planta e patógeno (PASCHOLATI et al., 2008). Para que este reconhecimento possa acontecer algumas vias metabólicas precisam ser ativadas. Estas vias iniciam uma troca de sinalizações químicas e físicas entre a planta e o patógeno (FIRMINO & FURTADO, 2014). As sinalizações químicas

do patógeno são em grande maioria enzimáticas, tendo como função a degradação das paredes celulares da planta (PASCHOLATI et al., 2008).

Ceratocystis fimbriata

Ceratocystis fimbriata é descrito como um patógeno fúngico que ataca principalmente plantas de regiões tropicais (BAKER et al., 2003; BARNES & COLS, 2001; MARIN & COLS, 2003; STEIMEL & COLS, 2004). Acredita-se que o gênero *Ceratocystis* contém muitas espécies ainda não descritas na literatura (BAKER et al., 2003; HARRINGTON, 2001). Três clados geográficos foram achados para *C. fimbriata* usando a técnica de análises filogenéticas: América latina, Centro da Ásia e América do Norte (HARRINGTON, 2000). Os clados descritos na América latina se caracterizam por serem altamente especializados em cada hospedeiro (BAKER et al., 2003). Patógenos como *C. fimbriata* que atacam a área foliar da planta afetam a fisiologia da planta, pois a perda de folhas nas árvores infetadas reduzem sua capacidade de trocar gases e nutrientes com o ambiente (SHTIENBERG et al., 1992).

As características fisiológicas de *C. fimbriata* são peritécio imerso ou superficial no substrato, pescoço de cor escura ou preta, globoso, altura 120-250 µm, largura de 110-250µm, com hifas ostiolares divergentes, asseptadas e de paredes lisas (CHRISTINE et al., 2005). Os ascósporos são unicelulares 5,0 – 7,5 µm (HALSTED & FAIRCHILD, 189; HALSTED, 1890). Isolados de *Ceratocystis* provenientes de batata doce, sicômoro e cacauero têm demonstrado que a produção de híbridos por compatibilidade sexual é pouco comum (CHRISTINE et al., 2005), apesar de que estudos moleculares mostraram correlação por microssatélites e sequências ITS (BAKER et al., 2003; STEIMEL et al., 2004). Isso é uma evidência de que são patógenos que divergiram há pouco tempo ou que estão em um processo de especiação, apesar de estarem tão profundamente ligados (CHRISTINE et al., 2005).

Quanto à morfologia do fungo, os isolados de cacauero apresentam diferenças nos ascósporos, pois são mais longos e possuem maior comprimento do pescoço do peritécio quando comparados com outros patógenos do complexo

C. fimbriata. Estudos morfológicos deste complexo descreveram *C. cacaofunesta* como uma nova espécie (CHRISTINE et al., 2005).

A diminuição do fluxo de água, ocasionado pela infecção por *C. fimbriata*, ocasiona um estresse hídrico nas folhas reduzindo a abertura dos estômatos, que por sua vez diminui a capacidade de absorção de CO₂ ao reduzir a taxa de transporte de elétrons, interferindo em todo o processo fotossintético da planta (SILVA et al., 2018). Tanto o metabolismo primário quanto secundário são afetados ao serem colonizadas pelo fungo (SILVA et al., 2018).

Estudos de evolução gênica comparando *C. cacaofunesta* e *C. fimbriata* revelaram uma alta similaridade entre os dois genomas. O aumento no número de genes codificadores de PI-PLC no gênero *Ceratocystis* indica um processo de diversificação adaptável ao patógeno, sugestivo de um processo de coevolução (MOLANO et al., 2018). Estudos recentes mostram que a linhagem *Ceratocystis* pode ter utilizado os genes de PLC como pré-evolução para ser um patógeno necrotrófico (MOLANO et al., 2018). Os genes PI-PLC do *C. cacaofunesta* têm a estrutura para desempenhar funções de PI-PLC bacteriano, ou seja, são capazes de interagir com moléculas de fosfatidilinositol (GRIFFITH et al., 1999; MOLANO et al., 2018; 31).

O fato de as duas espécies de fungos patogênicos apresentarem alta especificidade em seus hospedeiros e compartilharem alta similaridade genômica deve-se a aglomerados de loci ligados intimamente ou a variações em um único local do genoma (MOLANO et al., 2018). *Ceratocystis cacaofunesta* apresenta um conjunto de Tes (elementos transponíveis) cinco vezes maior quando comparada com *C. fimbriata*, isto pode sugerir que a concentração de Tes tem um papel importante na adaptação, estrutura, e evolução do genoma. Esse aumento de Tes pode estar relacionado com um aumento da virulência do fungo. Este tipo de aumento de Tes foi anteriormente relatado em outras espécies fúngicas patogênicas. Enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) são relacionadas com fungos patogênicos, os CAZymes são enzimas geralmente associadas a degradação na parede celular das plantas, propiciando desse modo a infecção; o gênero *Ceratocystis* curiosamente apresenta um número pequeno de CAZymes em comparação com outros fungos (WANG et al., 2015). A família de genes AA4 CAZymes tem sido descrita como ampla nas espécies

de *Ceratocystis*, esses genes contêm vanilina-álcool oxidases que ajudam na decomposição de compostos fenólicos.

Estes compostos são produzidos pela planta mediante a ativação do mecanismo de defesa (AL-SADI et al., 2010). Enzimas das famílias GH5, GH11, GH16, GH43 e GH 61 foram detectadas no secretoma de *C. cacaofunesta*. CAZymes estão relacionadas a degradação de celulose e hemiceluloses (MOLANO et al., 2018).

Todos esses mecanismos de ataque que o fungo possui conferem sua virulência. Em plantas susceptíveis o micélio penetra nas células próximas do xilema e do parênquima, superando com facilidade barreiras de resistência estruturais como os tilos (DE MICCO et al., 2016). Os vasos que contêm o fungo ficam livres de tilos (SANTOS et al., 2013).

O sistema besouro-fungo e como eles interagem ainda não foi descrito em sua totalidade, mas é sabido que ambos os organismos podem superar as defesas do hospedeiro (FRANCESCHI et al., 2005). Estas defesas podem ser tanto químicas quanto físicas, como o acúmulo de compostos fenólicos nas células do parênquima (LI et al., 2012). Nos canais constitutivos de resina os níveis de terpenoides se elevam, ocasionando o fechamento dos ductos (KROKENE et al., 2008; ZULAK & BOHLMANN, 2010). Tem sido relatado na literatura que este tipo de defesa pode servir para inibir o ataque de besouros (ZHAO et al., 2011; SCHIEBE et al., 2012). Estudos têm associado o aumento de monoterpenos nas árvores de abetos quando são infectadas por *C. polonica* (BAIER et al., 2002; ZHAO et al., 2011). Pesquisas tem demonstrado *C. polonica* pode ocasionar o secamento da planta, sem precisar do besouro (CHRISTIANSEN & SOLHEIM, 1986).

A geração de tiloses em doenças fúngicas é considerada um mecanismo de defesa, este mecanismo baseia-se na obstrução completa ou parcial dos vasos do xilema, para isolar o fungo e evitar a propagação para o resto da planta (BECKMAN, 1987; VANDERMOLEN et al., 1987; OUELLETTE & RIOUX, 1992).

O nível de resistência da planta a doenças vasculares é definido pela capacidade da planta de reagir á infecção de tecidos vasculares (BECKMAN, 1987). Um mecanismo primário de defesa é a diferenciação de tilos. Tilo de forma globular obstaculizam a propagação do patógeno mediante a oclusão dos

vasos do xilema (BECKMAN & TALBOYS, 1981; VANDERMOLEN et al., 1987; BELL, 1992; OUELLETTE & RIOUX, 1992).

Já que ainda não existe um fungicida que seja considerado eficiente no tratamento e erradicação dessa doença no Brasil, a estratégia mais adequada até o momento pode ser a propagação de cultivares resistentes a *C. fimbriata* (RIBEIRO, 2005; BATISTA et al., 2008). Porém, o desenvolvimento de cultivares resistentes pode se tornar difícil devido a grande variabilidade genética de *C. fimbriata* (RIBEIRO et al., 1986; RIBEIRO, 2005). A resistência ao patógeno depende da capacidade do hospedeiro para conseguir isolar o fungo (DUCHESNE et al., 1992).

Ceratocystis cacaofunesta

Ceratocystis cacaofunesta é o agente causal da doença de Murcha de *Ceratocystis* no cacau. Nativo da América do sul e central, o fungo pertence a classe *sordariomycetes* e o complexo *Ceratocystis fimbriata* (BAKER et al., 2003; JOHNSON et al., 2005). Os fungos classificados dentro deste grupo taxonômico apresentam grande variabilidade genética (BARNES et al., 2001; ENGELBRECHT et al., 2004). O fungo *C. cacaofunesta* é diferenciado de *C. fimbriata* por características morfológicas e patogênicas (BAKER et al., 2003; ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005). A murcha de *Ceratocystis* do cacau foi descrita no Brasil pela primeira vez na região do Amazonas e constatada no sul da Bahia na década de 1990 (BASTOS, 1978; BEZERRA, 1952). É uma doença caracterizada por danificar a totalidade das plantas e não só os galhos e frutos como a Vassoura de Bruxa (HARRINGTON, 2000). Devido a esta peculiar característica esta doença tem ocasionado grandes perdas econômicas nas regiões produtoras de cacau da Venezuela, Trinidad e Colômbia (SPENCE, 1958; THOROLD, 1975).

Ceratocystis cacaofunesta forma parte do complexo *C. fimbriata* que atinge uma grande variedade de hospedeiros. Porém, considera-se uma espécie com uma grande variação genética (BAKER et al., 2003; STEIMEL et al., 2004; ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005). Estudos descreveram *C. cacaofunesta* como uma nova espécie diferenciando-se de *C. fimbriata*, pela patogenicidade apresentada no cacau, diferenças morfológicas, inter-

esterilidade com outros fungos da mesma família na América Latina e diferenças em espaçadores transcritos (ITS) (BAKER et al, 2003).

Ceratocystis cacaofunesta foi reportada a partir da década de 1950 em países produtores de cacauzeiro como México e República Dominicana (SILVA et al., 2004, 2007; ENGELBRECHT et al., 2007). No Brasil foi reportada pela primeira vez em no estado de Rondônia em 1978 (BASTOS & EVANS, 1978). Como o aparecimento dos sintomas e a morte da planta acontecem em um período demasiado curto medidas de controles tradicionais têm sido pouco eficientes (LEAL et al, 2008), portanto o plantio de material resistente torna-se a melhor escolha para o controle de *C. cacaofunesta* (OLIVEIRA et al., 2009; SANCHES et Al., 2008; SILVA et al., 2004, 2007; RAM et al., 2004).

Os sintomas ocasionados na planta pelo fungo são escurecimento dos caules e galhos, clorose, murcha das folhas e posterior morte da planta em um período de duas a quatro semanas (DELGADO & SUÁREZ, 2003; SILVA et al., 2004). No estado da Bahia, o fungo pode se tornar um grave problema pois é uma região onde genótipos selecionados por programas de melhoramento de resistência Vassoura de Bruxa são abundantes (SILVA & LUZ, 2000; RAM et al., 2004). Estes genótipos são denominados theobahia e surgem do cruzamento de clones Sca-6 e ICS-1, os clones resultados deste cruzamento apresentam uma clara resistência à Vassoura de Bruxa, porém já têm apresentado, em estudos anteriores, susceptibilidade a *C. cacaofunesta* (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005). Porém, programas de melhoramento com foco na resistência a *C. cacaofunesta* devem ser desenvolvidos antes que esta doença possa se tornar um problema ainda maior para a região (MATA, 1991; DELGADO, 2003).

A murcha causada por *C. cacaofunesta* deve-se à morte das células do hospedeiro pelo acúmulo de metabólitos secundários (COLEMAN et al., 2010; CALVO et al., 2012). O fungo apresenta uma grande produção de enzimas lactase, que está relacionada com fungos fitopatogênicos, pois ajuda na degradação da lignina (LEONOWICZ et al., 2001; GIESE et al., 2004). A produção de enzimas como protease, lignina peroxidase lactase e amilase já tem sido descrita na literatura como produzidas por *C. cacaofunesta* (FIRMINO & FURTADO, 2014).

O fungo secreta proteínas que têm como função a obtenção de nutrientes para o patógeno, porém estas proteínas colonizam os tecidos do hospedeiro,

desenvolvendo assim os sintomas na planta. Uma grande variedade de proteínas pode ser identificada como fatores de virulência relacionadas com fungos patogênicos, sendo que a presença de algumas proteínas pode modificar a agressividade do patógeno (KIM et al., 2016). Em sua maioria, essas secreções fúngicas são enzimas ativas de carboidratos como lipases e óxido redutases (KRIJGER et al., 2014; KIM et al., 2016). Enzimas como extracelulares-fosfolipases são denominadas como universais em fungos patogênicos, já que sua atividade hidrolítica facilita a invasão do tecido do hospedeiro, mediante a ruptura de fosfolipídios da membrana (GHANNOUM, 2000). As fosfolipases produzidas pelos fungos patogênicos têm sido associadas também com diversas funções como transdução de sinal, patogenicidade, desenvolvimento do fungo (SALYERS & WITT, 1994).

Dois grandes populações de *C. cacaofunesta* são descritas na literatura. Uma na região do alto Amazonas e outra no Equador, por serem ambas populações de patógenos de cacauzeiro, apresentam interfertilidade entre elas (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005). Têm sido detectadas diferenças no DNA nuclear e mitocondrial, cariótipo, sequências ITS e marcadores microssatélites entre estas duas populações (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005; ENGELBRECHT et al., 2007).

As variações genéticas detectadas em populações de fungos coletados na Colômbia, Costa Rica e Bahia, sugerem que o fungo foi introduzido do alto Amazonas para estas regiões (ENGELBRECHT et al., 2007). A introdução deste patógeno se deu pela chegada de novo germoplasma propagativo resistente a outras doenças (BEZERRA, 1997; ENGELBRECHT et al., 2007). Grande parte dos germoplasmas resistentes a doenças como Vassoura de Bruxa e outras tem demonstrado apresentar susceptibilidade a *C. cacaofunesta* (ENGELBRECHT et al., 2007).

Estudos histopatológicos evidenciam que os sintomas em plantas suscetíveis e resistentes são os mesmos, o que varia é a virulência ou intensidade da infecção. O escurecimento vascular causado pela infecção é ocasionado pela captura de conídios nas paredes laterais e terminais dos vasos xilemáticos. A captura de conídios é um sistema de defesa da planta, já que ao serem retidos impedem a liberação no fluxo de seiva, evitando a propagação da doença (SANTOS et al., 2013). Em plantas suscetíveis este sistema pode

ocasionar a morte do hospedeiro por não poder reestabelecer as vias de comunicação no xilema (TALBOYS, 1972).

Proteínas fitotóxicas (cerato-platanin) têm sido identificadas em culturas de *Ceratocystis platani* (PAZZAGLI et al., 1999). Isto pode sugerir que na interação entre *C. cacaofunesta* e *Theobroma cacao* esteja envolvida uma produção de elicitores que ainda não foram descritos ou caracterizados (SANTOS et al., 2013). Os sintomas ocasionados por *C. cacaofunesta* ocorrem pela ação conjunta de toxinas e obstrução de vasos. Os genótipos resistentes, por sua vez conseguem inibir a infecção nos tecidos dos troncos (SANTOS et al., 2013). A velocidade com a que a planta responde ao patógeno é essencial para a resistência. Uma liberação de compostos fenólicos deve ser feita para induzir a formação de géis e tilos, estruturas que restringirão a movimentação do patógeno no sistema vascular da planta (BECKMAN, 1987). Compostos fenólicos já foram anteriormente descritos no cacaueteiro, como substâncias que conferem resistência em interações fúngicas (COOPER et al., 1996; RESENDE et al., 1996).

Uma metodologia que foi estudada para o combate do fungo é a indução de resistência na planta e tem sido relatado que moléculas reativas de oxigênio (ROS) podem impossibilitar o crescimento do patógeno (DOKE et al., 1996). Estudos onde as plantas foram tratadas com glicose, sacarose e acibenzolar-metílico, têm demonstrado certa efetividade para o controle de *C. cacaofunesta* sendo este último composto o de melhores resultados, mantendo hospedeiro com vida após 60 dias (ANTONIO et al., 2018). Os compostos glicoses e sacarose têm demonstrado a indução de resistência a Vassoura de Bruxa (VIEIRA et al., 2015). Comparando estes dois experimentos semelhantes é possível supor que a propagação do fungo na planta esteja propiciada pela absorção e transporte de sacarose e glicose originadas pelo hospedeiro, mediante a parede da célula e invertases vasculares de *C. cacaofunesta* (ANTONIO et al., 2018). Na interação planta-patógeno, tem se demonstrado que hóspede e hospedeiro apresentam interações para o processamento do açúcar, resposta ao estresse e defesa da planta são ativadas mediante as quebras do açúcares por enzimas, por sua vez o fungo converte em açúcares intracelulares e extracelulares em nutrientes, assegurando sua nutrição (ANTONIO et al., 2018).

O fungo *C. cacaofunesta* originário do Brasil apresenta diferente nível de agressividade quando comparado com os patógenos isolados de outros países (BARBA, 1961; MIÑO, 1994; SUÁREZ, 1993). Estudos no Estado da Bahia mostram uma importante incidência da doença, principalmente no município de Uruçuca onde a incidência foi de 30%. Dentre as plantas diagnosticadas como doentes, só se identificou o fungo da variedade denominada Theobahia (ALMEIDA et al., 2005).

O período curto entre o aparecimento dos sintomas e a morte da planta impossibilita a recuperação da mesma, isto faz com que este fungo apresente uma grave ameaça para regiões produtoras do cacau (HARRINGTON, 2004). Estudos mostraram que clones como TSH-1188 podem mostrar resistência e ICS-1 pode ser identificado como susceptíveis ao fungo, portanto estes genótipos poderiam ser usados como padrões de resistência e susceptibilidade em estudos posteriores. Grupos clonais como CEPEC-2008 e CEPEC-2002 tem mostrado diferentes níveis de suscetibilidade ao patógeno (SANCHES et al., 2008). Clones de cacau como TSH516, CCN-51 e VB618 também foram diagnosticados com Murcha de *Ceratocystis* (ALMEIDA et al., 2005).

Devido à grande agressividade apresentada por isolados brasileiros, principalmente na região cacauzeira da Bahia, a seleção de cultivares resistentes torna-se complicada e uma metodologia que possa identificar genótipos resistentes em menor tempo é de vital importância para a região (SILVA et al., 2004; SILVA, 2007). A ocorrência de Murcha de *Ceratocystis* está atingindo a totalidade da região cacauzeira da Bahia (ALMEIDA et al., 2005), e os cultivos desta região têm sido comprometidos pelo o fungo *Moniliophthora perniciosa* desde a década de 1990 (PEREIRA et al, 1989). Desta forma, o estabelecimento de genótipos nativos de cacauzeiro que apresentem resistência ao patógeno tornou-se uma necessidade (SANCHES et al., 2008).

Marcadores moleculares a resistência a murcha de ceratocystis

Existem regiões no genoma que são encarregadas da expressão fenotípica de um organismo, como peso e altura, produção de grãos em plantas, entre outras características, estas regiões são denominadas QTLs (quantitative trait loci) (LANDER & BOLSTEIN, 1989). Graças aos desenvolvimentos das

técnicas de mapeamento molecular é possível na atualidade identificar aquelas regiões cromossômicas relacionadas a características quantitativas (QTLs).

Programas de melhoramento genético do cacaueteiro com foco na resistência a *C. cacaofunesta* podem ser baseados na identificação de regiões genéticas (marcadores) relacionadas a loci de resistência a doenças (FALEIRO et al., 2006; LANAUD et al., 1995; PUGH et al., 2004). A comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) desenvolveu um dos primeiros mapas genéticos de cacaueteiro. Esse mapa foi feito utilizando um cacaueteiro híbrido denominado TSH-516 com origem em Trinidad e Tobago, que é o resultado de um cruzamento entre as variedades Sca-6 e ICS-1 (LANAUD et al., 1995).

Em 1995, o primeiro mapa de ligações gênicas do cacaueteiro foi publicado com apenas 202 marcadores (LANAUD et al., 1995). Este mapa foi utilizado como referência para novas pesquisas e tendo sido melhorado com o passar dos anos aumentando a densidade de marcadores nele (RISTERUCCI et al., 2000). O mapa genético com maior número de marcadores tem uma densidade de marcadores de 1.262 marcadores e um comprimento de 7333,6 centiMorgan (ALLEGRE et al., 2012).

A variedade denominada theobahia surge de um cruzamento entre Sca-6 e ICS-1, na década de 1990, a qual foi distribuída seminalmente na região junto com variedades clonais como TSH1188, TSH516, CEPEC42, EET397, e TSH565, todas estas variedades têm como fonte de resistência a Vassoura de Bruxa o Sca-6 (PINTO & PIRES, 1998). Mediante a técnica de mapeamento genético tem se observado que Sca-6 possui genes que são responsáveis por conferir a resistência ao patógeno (QUEIROS et al., 2003; FALEIRO et al., 2006). Além disso plantas descendentes de Sca-6 têm apresentado sintomas de Vassoura no Brasil (FALEIRO et al., 2004). Porém estudos sobre diversidade genética relacionados a resistência vêm sendo feitos na região como a pesquisa feita por Silva (2012) sobre diversidade foi feita utilizando genótipos da região cacaueira da Bahia, visto que houve múltiplas introduções de material genético na região que são plantadas em conjunto com as variedades de introdução antiga (SANTOS et al., 2015).

A seleção e caracterização de material genético no Estado da Bahia torna-se indispensável para a produção de variedades de cacaueteiro que apresentem uma resistência mais duradoura contra patógenos (FALEIRO et al., 2004).

Estudos realizados por Faleiro (2004) e Yamada (2009), sobre diversidade genética e molecular em plantas originárias da Bahia, mostrou-se que muito material genético considerado resistente apresentava uma alta similaridade com Scavina-6. Por sua vez, estudos com uma variedade maior de plantas, mostrou-se que na região produtora de cacaueteiro da Bahia existem de fato plantas que possui resistência a doenças e que são geneticamente distantes de Sca-6, inferindo-se que existem na região variedades que podem ser de grande relevância para o comércio e para o desenvolvimento de clones resistentes a doença (LEAL et al., 2008).

Ferramentas como mapeamento QTLs, construção de mapas gênicos, mapeamentos de genes de resistência, estudos de expressão gênica, aplicação de ferramentas informáticas, entre outras, estão sendo utilizadas pra melhorar a seleção de material vegetal (GRATTAPAGLIA et al., 2004; POKE et al., 2005; SILVEIRA, 2014). O uso de marcadores microssatélites pode ser uma grande ferramenta para a seleção de cultivares resistentes pois se caracterizam por ser multialélicos codominantes e são relativamente abundantes no genoma, por essas características esses foram os marcadores mais utilizados na construção de mapas genéticos até 2008 (GRATTAPAGLIA & KIRST, 2008).

Capítulo I

Metodologias de avaliação sintomática na interação planta patógeno do patossistema *Theobroma cacao* - *Ceratocystis cacaofunesta*

Alberto Montejo Diaz, Ronan Xavier Corrêa

RESUMO. Com o aparecimento da murcha no cacauzeiro causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* em muitos países produtores de cacau, essa doença tem se tornado de importância epidemiológica. Diversas metodologias têm sido desenvolvidas para avaliar a resistência de genótipos de cacauzeiro a essa doença. Estas metodologias foram desenvolvidas no âmbito de variados desafios de pesquisa, por isso apresentam diferenças entre si, por exemplo, no tempo de obtenção de dados, local de inoculação, material vegetal e reagentes. Estas variáveis podem revelar vantagem a desvantagem na escolha da metodologia adequada para avaliar um grupo de plantas. Neste capítulo apresenta-se uma revisão da literatura sobre cinco metodologias previamente utilizadas com sucesso na avaliação da patogenicidade de diversos isolados desse patógeno, assim como na avaliação e seleção de genótipos de cacauzeiro. O objetivo neste capítulo foi analisar e apresentar estas metodologias para definir em que situação pode ser usada cada uma com o maior sucesso. De um modo geral, as metodologias diferem no local de aplicação (campo, casa de vegetação e laboratório), na parte da planta que é inoculada (folha, caule ou raiz), na forma de avaliação (medir sinais ou sintomas), e tempo de avaliação após aplicação do método (4 a 60 dias). Os objetivos e as aplicações dos estudos podem influenciar na escolha da metodologia, destacando-se aqueles voltados a analisar a agressividade, patogenicidade ou seleção de plantas para o melhoramento.

Palavras chaves: metodologia, genótipos, variáveis, avaliação, inoculação.

1. Introdução

Ceratocystis cacaofunesta é o fungo causador da murcha de *Ceratocystis* no cacauero. Essa doença foi descrita pela primeira vez no Equador no ano 1918 e posteriormente, nas décadas de 1950 e 1960 a doença ganhou importância epidemiológica. A murcha de *Ceratocystis* foi relatada pela primeira vez na Bahia no ano de 1997 e, desde então, as perdas na produção de cacauero foram aumentadas devido às mortes de milhares de árvores por causa dessa doença, afetando especialmente a variedade Theobahia bem como plantas que têm como origem o clone ICS-1 (SILVA & LUZ, 2000). *C. cacaofunesta* caracteriza-se por ser um patógeno de difícil controle, que ocasiona danos graves e irreversíveis no sistema vascular da planta (SILVA et al., 2004; TUMURA et al., 2012).

Depois da chegada do fungo *Moniliophthora perniciosa* (causador de Vassoura de Bruxa) na região cacauicultora baiana (PEREIRA et al., 1989), os programas de melhoramento genético de cacauero foram focados no desenvolvimento de variedades resistentes à Vassoura de Bruxa. Entre os genótipos selecionados para esses programas, plantas com genes originários do clone ICS-1 foram escolhidas, da mesma forma que outros clones que apresentaram suscetibilidade a *C. cacaofunesta* (OLIVEIRA & LUZ, 2005).

A infecção com *C. cacaofunesta* no campo acontece principalmente através de ferimentos na planta, ocasionados pelas ferramentas utilizadas nas práticas de manejo do cacauero, como poda e colheita, e por alguns insetos como *Xyleborus sp.* (MARIN et al., 2003; DELGADO & SUARES, 2003; COITA & ROSALES, 2001). Tem-se reportado que esse fungo também pode penetrar pelas raízes da planta, já que pode sobreviver no solo (FERREIRA & MILANI, 2002; FIRMINO et al., 2013). Além disso, a murcha de *Ceratocystis* tem ocasionado a morte de milhares de plantas em diferentes estágios de desenvolvimento (LUZ et al., 2013).

Uma vez que *C. cacaofunesta* apresenta um grande risco para a cultura do cacau em escala mundial, e devido às grandes dificuldades que se têm apresentado para o controle químico ou cultural do mesmo, programas de melhoramento genéticos apresentam-se como importantes para obter o controle dessa doença (MAGALHÃES et al., 2019). Objetivando-se a avaliação de material genético que possa ser parte de um programa de melhoramento, diversos métodos de inoculação e avaliação dos sintomas em plantas têm sido desenvolvidos (MAGALHÃES et al., 2016; SANCHES et al., 2008; SANCHES, 2007; SILVA, 2005, SILVA e LUZ, 2000; BEZERRA et al., 1998; ALARCON, 1994; GUERRERO 1975; DOMINGUEZ e VELÁSQUEZ, 1972; DELGADO & ECHANDI, 1965). O desenvolvimento destes métodos torna-se importante para a criação de um programa de melhoramento exitoso (SILVA et al., 2004).

Algumas metodologias, como a inoculação em mudas, já mostraram resultados promissores, porém é uma metodologia que demanda muito tempo para a obtenção de resultados. O desenvolvimento de métodos que possibilitem avaliar um número maior de genótipos em menor tempo tem limitado a seleção de material genético adequado para um programa de melhoramento (Almeida et al., 2005).

Com o aparecimento da doença murcha de *Ceratocystis* no cacau desde o ano de 1918 (GUERRERO, 1975; CHONG, 1961), diversas metodologias para avaliação e seleção de cultivares que possam ser considerados resistentes a essa doença têm sido desenvolvidas (Figura 1).

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

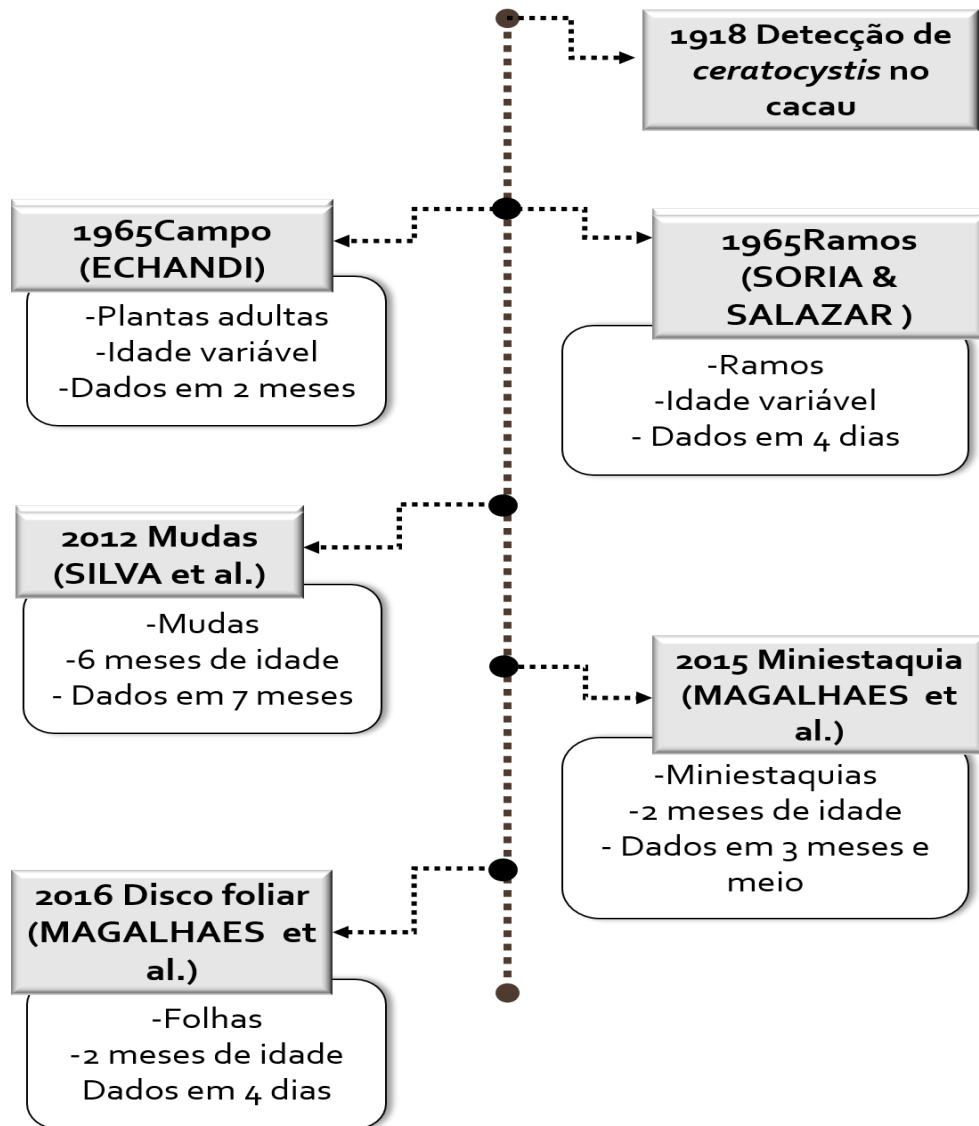


Figura 1. Evolução de métodos de avaliação fenotípica da interação Cacaú-*Ceratocystis* em campo, ramos, mudas, miniestaquia e discos foliares.

Porém essas metodologias de avaliação apresentam variação nas técnicas e procedimentos aplicados. Neste capítulo foram analisadas e discutidas cinco metodologias: a) avaliação da resistência à murcha de *Ceratocystis* em ramos (SORIA & SALAZAR, 1965), que consiste na utilização de ramos de cacau para a avaliação rápida dos sintomas em quatro dias nos genótipos de cacau; b) avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* em campo (ECHANDI, 1965), que permite avaliar o comportamento dos genótipos de cacau diretamente em campo, porém apresenta uma grande complexidade ao ser realizado devido a variáveis não controláveis como o clima e requer cerca de dois meses para ser concluída; c) avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* por incisão no caule de mudas em casas de vegetação (SILVA et al., 2012), que permite avaliar um grande número de mudas de distintos genótipos em um ambiente controlado, porém o desenvolvimento das mudas é demorado e esta metodologia requer até sete meses para ser realizada; d) avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* por miniestaquia em espuma fenólica (MAGALHAES et al., 2015), a qual permite a avaliação de vários genótipos em um período relativamente curto de tempo, porém requer uma grande quantidade de reagentes e sua realização pode ser complexa, além de requerer um mínimo de 75 dias para ser realizada; e) avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* por disco foliar (MAGALHAES et al., 2016), que permite a avaliação de muitos genótipos em um espaço de trabalho relativamente pequeno e em um período curto de tempo, requerendo apenas quatro dias para ser realizada. O objetivo deste capítulo é apresentar e analisar estas metodologias, com base na revisão de literatura, para definir em que situação cada metodologia poderia ser a mais adequada para o caso de estudo apresentado.

2. Métodos de Avaliação da Resistência do Cacaueiro à Murcha de *Ceratocystis*

2.1 Avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* em ramos destacados (Soria & Salazar, 1965)

A inoculação é feita em ramos coletados nas plantas adultas, os quais devem apresentar 1,5 cm de diâmetro, selecionados e cortados, devidamente marcados e levados imediatamente ao laboratório, onde a casca é retirada e o ramo é cortado longitudinalmente em fragmentos de 4 cm de comprimento. Cada fragmento é inoculado com uma suspensão do patógeno ajustada a 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Posteriormente, os fragmentos inoculados são colocados em uma caixa de madeira forrada com polietileno, para formar uma câmara úmida. Quatro dias após a inoculação, deve ser feita avaliação visual.

Para a avaliação efetiva do grau de desenvolvimento do micélio e peritécio, deve-se utilizar a seguinte escala de notas: Para micélio: 0= ausência de crescimento; 1 = muito pouco; 2 = pouco; 3 = muito; 4 = totalmente coberto. Para peritécio: 0 = ausência; 1 = muito pouco (1 a 5); 2= pouco (6 a 15); 3 = muito (maior de 16); 4 = totalmente coberto.

2.1.1 Análise estatística

A análise estatística é feita calculando a média das notas obtidas na avaliação para cada genótipo testado. Para isso a seguinte escala é utilizada: Resistente (R) = 0 a 1,0; Medianamente Resistente (MR) = 1,1 a 2,0; Suscetível (S) = 2,1 a 3,0; Altamente Suscetível (MS) = 3,1 a 4,0.

2.1.2 Aplicações

Esta metodologia, por ser uma das mais antigas, tem sido adaptada em diversas ocasiões para avaliar diferentes fatores de interesse, como avaliação de clones comerciais com respeito da resistência a *C. cacaofunesta* ou avaliação de agressividade em diferentes isolados de *C. cacaofunesta* provenientes de diversas regiões geográficas (DELGADO & SUARES, 2003). Esta metodologia tem identificado a existência de três grupos principais de clones: os

moderadamente resistentes como IMC-47 e VENCE-4, os suscetíveis como IMC-67 e GU-255P e os altamente suscetíveis como SCA-24, AMAZ-15, ICS-43 e SCA-6 (DELGADO & SUARES, 2003). O uso deste método tem permitido identificar o patógeno de origem brasileira como sendo o mais agressivo (HARRINGTON et al., 2001); estes resultados têm levado ao estudo molecular de *C. cacaofunesta*, e comprovou-se que existem diferenças genéticas entre os isolados do patógenos provenientes de diferentes regiões geográficas (AMBROSIO et al., 2013). Ao utilizar adaptações específicas nesta metodologia, são detectadas certas atividades enzimáticas por parte do fungo como a produção de protease, lactase e lignina peroxidase (FIRMIO & FURTADO, 2014).

2.2 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis em ramos no campo (ECHANDI, 1965)

A inoculação é feita em lesão artificial nos ramos mantidos na planta em campo. Duas plantas de cada genótipo devem ser selecionadas e cinco ramos lenhosos de cada uma com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro são escolhidos para os testes, sendo inoculados 4 ramos por planta e deixado um ramo que será o controle não inoculado. Para o preparo do inóculo o isolado deve de ser reativado, pincelando uma suspensão de suas estruturas em fragmentos de 4 cm de ramos de cacauzeiros cortados ao meio longitudinalmente. Após quatro dias de incubação em câmara úmida, os ascósporos são transferidos para tubo de ensaio contendo meio BDA. Aos oito dias de crescimento do fungo, o mesmo é colocado no tubo de ensaio contendo água destilada estéril e, com auxílio de um pincel, são retiradas as suas estruturas. A suspensão obtida é filtrada em gaze para eliminar os peritécios. A suspensão final composta de ascósporos, conídios e fragmentos de hifas é ajustada para $3,0 \times 10^4$ UFC/mL. Posteriormente, um corte é feito com auxílio de um bisturi estéril nos ramos previamente selecionados, em sentido horizontal, para priorizar o desprendimento das cascas e o lenho ficar exposto. No local do corte, 30 μ L do inóculo são adicionados e nos ramos controles, 30 μ L de AA (água/ágar) são inoculados. Logo em seguida um algodão umedecido com água estéril deve ser colocado e o local de inoculação junto com o algodão devem ser envolvidos com

fita vedante para formar uma câmara úmida e manter as condições ótimas de crescimento do patógeno e propiciar a infecção na planta.

A avaliação deve ser feita 60 dias após a inoculação, cortando-se os ramos 20 cm abaixo do ponto de incisão (inoculação) e colocado-os em sacos plásticos devidamente identificados para sua posterior análise. No laboratório, a casca dos ramos é retirada para possibilitar a medida de comprimento e largura da lesão.

2.2.1 Análise estatística

Uma vez obtidas as medidas de largura e altura da lesão, pode-se obter a área da lesão causada pelo patógeno no ramo. Uma análise de variância e estimação de coeficiente de correlação Pearson e componentes de variância pode ser feita como no agrupamento de medidas pelo método de Scott-Knott.

2.2.2 Aplicações

Esta metodologia tem sido aplicada quase que exclusivamente para a secção de cacaveiros que possam ser considerados resistentes a *C. cacaofunesta*; em um ensaio feito em 2013 um total de 65 clones foram testados (SILVA et al., 2013), e esta metodologia de inoculação mostrou ser eficiente na identificação e definição de grupos de clones de cacaveiros adultos em relação a sua resistência apresentada a *C. cacaofunesta* (SILVA et al., 2013). Em outros estudos a aplicação da metodologia de inoculação em campo tem sido utilizada para analisar a resistência a *C. cacaofunesta* em progênie de cacau para posterior estudo dos parâmetros genéticos que condicionam a resposta ao patógeno (YAMADA et al., 2015). Assim, foi comprovado a resistência de clones como VB-1151, TSH-1188 CSG-70 E MAC-01, que também tem sido descrito como resistentes por Silva et al. (2012). O resultado deste tipo de estudo tem comprovado que o cruzamento de clones TSH-1188 x VB-1151 pode ser um ótimo porta-enxerto (YAMADA et al., 2015).

2.3 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis por incisão em mudas em casas de vegetação (SILVA et al., 2012)

Mudas de origem de estacas de 2 meses de idade devem ser lavadas e transplantadas em sacolas plásticas de um 1L de capacidade com uma proporção 1:1 de substrato comercial e solo previamente autoclavados; as mudas deverão permanecer em casa de vegetação por 4 meses a uma temperatura entre 25 e 27°C, sendo molhadas uma vez por dia e adubadas a cada 15 dias, até atingir um tamanho de 1 a 1,5 cm de espessura no caule, que é a espessura ideal para ser inoculada. Após cerca de 6 meses, as plantas mais homogêneas em tamanho são selecionadas visualmente e uma secção desse grupo deve ser reservada como grupo controle; as plantas que não se adequem ao tamanho desejado serão descartadas.

O inóculo deve ser ajustado para uma concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); as mudas previamente selecionadas com caules de 1 a 1,5 cm de espessura serão inoculadas. Uma incisão no caule deve ser feita com ajuda de um bisturi estéril, em sentido horizontal, 15 cm acima do substrato. Em seguida, utilizando uma pipeta autoclavada, são inoculados 30 µL da suspensão do inóculo. Na parte inferior da incisão uma mecha de algodão umedecido com água estéril deve ser colocada e o local de inoculação junto com o algodão devem ser envolvidos com fita vedante para formar uma câmara úmida e manter as condições ótimas de crescimento do patógeno e propiciar a infecção na planta. No grupo controle, será feito o mesmo procedimento, com a diferença que nele será inoculado 30 µL de água destilada esterilizada.

2.3.1 Análise estatística

Quarenta e oito horas após a inoculação, o algodão e a fita vedante são retirados e 32 dias após a inoculação deve ser feita a contagem de plantas vivas e mortas, e o percentual de mudas mortas deve ser avaliado. A análise estatística é feita através do ANOVA e, para o agrupamento da população, o teste *t* de Student deve ser feito definindo padrões de resistência e suscetibilidade.

Uma forma diferenciada de avaliar os sintomas foi proposta por Branco 2006 (dissertação de mestrado, Mapeamento Molecular de Genes de Resistência de Cacau a Murcha de *Ceratocystis*). Nessa avaliação, diferentes níveis de sintomas são descritos, com base na seguinte escala de notas: 0 - aspecto normal sem sintomas; 1- perda de turgidez da folha, ou amarelecimento de apenas uma folha; 2 - amarelecimento de duas ou mais folhas; 3 - aproximadamente metade do número total de folhas com amarelecimento; 4 - metade das folhas com amarelecimento; 5 -aproximadamente todas as folhas com sintomas; 6 - todas as folhas com sintomas, com ramo vivo; 7 - morte da planta

2.3.2 Aplicações

Esta metodologia tem sido usada principalmente em programas de melhoramento genético para a identificação de genótipos de cacauzeiros resistentes (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2012 b; SANCHES et al., 2008), e tem possibilitado a identificação da existência de diversos grupos de progênies susceptíveis e resistentes (SILVA et al., 2012). Em outros estudos feitos com esta mesma metodologia, genótipos como CCN51, CCN10, PH16 e SJ02 têm sido identificados como suscetíveis a *C. cacaofunesta* (SANCHES et al., 2008), porém diversos autores também têm identificado genótipos que apresentam resistência ao fungo, como VB-1151, TSH-1188 e PS-1319 (OLIVEIRA et al., 2009). O uso deste método também tem identificado o genótipo VB-1159 como uma fonte de resistência que pode ser utilizada como porta-enxerto pelos produtores (SILVA et al., 2008).

2.4 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis por miniestacquia em espuma fenólica (MAGALHAES et al, 2015)

Hastes apicais são coletadas de ramos plagiotrópicos e transportadas para a casa de vegetação onde são posteriormente preparadas as miniestacas; cada miniestaca é deixada com 4 a 5 folhas e com um comprimento de 6 a 10 centímetros, as bases são cortadas transversalmente 2mm por debaixo de gema foliar, as folhas são reduzidas utilizando tesoura, a primeira folha da base é reduzida em 50% o restante das folhas são reduzidas em 20%. As miniestacas

já prontas são colocadas em um béquer com água destilada para mantê-las hidratadas.

Posteriormente a base da miniestaca é imersa por 5 segundos em ácido indolbutírico (AIB) diluído em solução hidroalcoólica em uma concentração de 6.000mg.L⁻¹. Em seguida, as miniestacas são inseridas em 2cm de profundidade em espuma fenólica, previamente cortadas em retângulos de 2,5cm x 2,5cm x 5cm; estas espumas são previamente umedecidas e fixadas na vertical em bandejas plásticas.

Uma vez que as miniestacas encontram-se nas espumas fenólicas, as mesmas são levadas a uma câmara de nebulização, que deve ser programada para microaspersão diária por 10 segundos a cada 10 minutos das 6 às 18 horas. Para garantir a nutrição mineral das estacas, 5mL de uma solução de Hoagland (¼ de força iônica) é inoculada na espuma aos 30 e 45 dias. Após 60 dias da permanência das miniestacas em espumas fenólicas, a inoculação de *C. cacaofunesta* é realizada. Antes da inoculação as estacas com sistema radicular maior são separadas e as raízes são podadas com a finalidade de obter lesões para facilitar a penetração do fungo.

O inóculo de *C. cacaofunesta* é preparado a uma concentração de 3x10⁴ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); de imediato, as bandejas contendo as estacas são colocadas em caixas plásticas e 1L do inóculo foi colocado em cada caixa, deixando o sistema radicular de cada planta imerso na suspensão do inóculo por um período de 24 horas em câmara úmida. Após esse período, o inóculo é drenado e as bandejas levadas novamente para a câmara de nebulização. Após 15 dias, é feita a avaliação mediante a contagem de estacas vivas e mortas.

2.4.1 Análises estatística

Os dados obtidos são submetidos à análise de variância, e em caso de não apresentarem distribuição normal são transformados em raiz quadrada de X + 0,5. As médias são comparadas pelo teste Tukey (P<0,05).

2.4.2 Aplicações

O uso desta técnica tem auxiliado e facilitado a avaliação de diversos genótipos de cacauzeiros no que diz respeito à resistência a *C. cacaofunesta*, permitindo avaliar não só a resistência a *C. cacaofunesta*, mas também a taxa de enraizamento de diversos genótipos (MAGALHAES et al., 2015). Esta técnica é pouco conhecida e pouco desenvolvida, mas tem mostrado eficiência diferenciando os genótipos resistentes dos suscetíveis. O cacau Jaca foi avaliado como resistente, o CEPEC-2002 e PS-1319 foram avaliados como medianamente suscetíveis e o CCN-51 foi avaliado como suscetível (MAGALHAES et al., 2015). Esses resultados coincidem com estudos feitos em ramos no campo e em mudas (SILVA et al., 2004; LUZ et al., 2000).

2.5 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis em disco foliar (MAGALHAES et al, 2016)

A técnica de avaliação por disco de folhas foi desenvolvida e utilizada na CEPLAC para a avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis*. Consiste na utilização de folhas de aproximadamente dois meses de idade (40 a 50 dias). As folhas são selecionadas visualmente no campo por estarem em boas condições fisiológicas, sem lesões e sem depósito de sujeiras visíveis. Posteriormente no laboratório, as folhas são lavadas com água destilada para remover eventuais impurezas. Em seguida um corte longitudinal é feito pela nervura central das folhas, as quais são cortadas em discos (40 discos por planta) com um diâmetro de 1,5 cm. Os discos são colocados com a superfície abaxial da folha para cima, em uma caixa plástica de 32,5 cm x 22,0 cm, sobre uma espuma umedecida com água destilada e previamente ajustada dentro da caixa plástica. Esse sistema gera uma câmara úmida o suficiente para criar um ambiente favorável ao crescimento do fungo; os discos são dispostos em fileiras de 10 e são feitas um total de quatro repetições por planta.

Uma suspensão de *Ceratocystis cacaofunesta* é preparada a uma concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); cada disco foliar é inoculado com 20 microlitros (μL) da suspensão com a ajuda de uma pipeta. As caixas são fechadas e deixadas em completa escuridão por 4

dias, revisando paulatinamente a umidade das espumas. Quatro dias após a inoculação, o número de peritécios germinados em cada disco foliar é contado, com auxílio de uma lupa para a contagem de colônias bacterianas (lupa trinocular mod. IBD-45T).

2.5.1 Análise estatística

Os dados obtidos pela contagem de esporos germinados foram analisados por análise de variância e por agrupamento de Tocher. Os dados relacionados ao número de esporos germinados por planta são submetidos à análise de variância, considerando-se quatro blocos casualizados, em que cada caixa representa um bloco. Para uma estimação adequada da resistência dos genótipos avaliados é realizado um teste estatístico de Scott-Knott, baseado na razão de verossimilhança para testar a significância de um número n de tratamentos que se podem agrupar em dois ou mais grupos (RAMALHO et al, 2000). O teste permite o agrupamento das variedades estudadas em subgrupos, de acordo com o grau de resistência apresentado.

2.5.2 Aplicações

Avaliação fitopatológica de inoculação de discos foliares com *C. cacaofunesta* está sendo amplamente utilizada, já que o tempo e o pouco material requerido para ser feita oferece uma clara vantagem quando comparada com técnicas de avaliação que requerem maior tempo e mais insumos. Esta técnica foi utilizada para encontrar métodos de biocontrole que possam antagonizar com *C. cacaofunesta* (RODRIGUES et al., 2017); nesse estudo mostrou-se que os esporos de *C. cacaofunesta* podem ser inibidos em presenças de secretomas de *Trichoderma spp.*, inibindo a germinação dos esporos patogênicos entre 67% e 100% (RODRIGUES et al., 2017).

Essa metodologia de inoculação é eficiente na comprovação de diversidades patogênica de isolados de *C. cacaofunesta*. Em um estudo onde 42 isolados de *C. cacaofunesta* foi observada uma variação significativa da agressividade dos diversos patógenos (MAGALHÃES et al., 2019). Essa diversidade de agressividade entre patógenos de *C. cacaofunesta* também tem

sido comprovada em outros estudos (MAGALHÃES et al., 2016, 2015, SILVA et al., 2013).

A inoculação em discos foliares também tem sido eficiente para a seleção de clones de cacau que podem ser considerados resistentes e que podem ser parte de um programa de melhoramento genético (SANTOS et al., 2015). Esse tipo de estudo tem possibilitado identificar três grandes grupos nos quais podem ser classificadas as variedades de cacau: suscetíveis, como CP477, CP486 e CCN51; medianamente suscetíveis, como CP230, CP47 e CP201; e resistentes, como Jaca, CEPEC2002, HB15, CP40 e PS1319 (SANTOS et al. 2015).

Xxxxxxxxxx Parece que voltou a repetir aqui; checar qual é texto válido, se os anteriores que corrigi ou esses a seguir que saltei e fui para discussão..

2.2 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis em ramos destacados (Soria & Salazar, 1965)

Ramos de 1,5 cm de diâmetro são selecionados e cortados, devidamente marcados e levados imediatamente ao laboratório, onde a casca é retirada e o ramo é cortado longitudinalmente em fragmentos de 4 cm de comprimento; cada fragmento é inoculado com uma suspensão do patógeno ajustada a 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Posteriormente, os fragmentos inoculados são colocados em uma caixa de madeira forrada com polietileno, para formar uma câmara úmida. Quatro dias após a inoculação, deve ser feita avaliação visual.

Para a avaliação efetiva do grau de desenvolvimento do micélio e peritécio, deve-se utilizar a seguinte escala de notas: Para micélio: 0= ausência de crescimento, 1= muito pouco, 2= pouco, 3= muito, 4= totalmente coberto. Para peritécio: 0= ausência, 1= muito pouco (1 a 5), 2= pouco (6 a 15), 3= muito (maior de 16), 4= totalmente coberto.

2.2.1 Análise estatística

A análise estatística é feita calculando a média das notas obtidas na avaliação para cada genótipo testado. Para isso a seguinte escala é utilizada: Resistente (R) = 0 - 1,0; Medianamente Resistente (MR); = 1,1 – 2,0; Suscetível (S) = 2,1-3,0; Altamente Suscetível (MS) = 3,1 - 4,0.

2.2.2 Aplicações

Esta metodologia, por ser uma das mais antigas, tem sido adaptada em diversas ocasiões para avaliar diferentes fatores de interesse, como avaliação de clones comerciais com respeito da resistência a *C. cacaofunesta* ou avaliação de agressividade em diferentes isolados de *C. cacaofunesta* provenientes de diversas regiões geográficas (DELGADO & SUARES, 2003). Esta metodologia tem identificado a existência de três grupos principais de clones: os moderadamente resistentes como IMC-47 e VENCE-4, os suscetíveis como IMC-67 e GU-255P e os altamente suscetíveis como SCA-24, AMAZ-15, ICS-43 e SCA-6 (DELGADO & SUARES, 2003). O uso deste método tem permitido identificar o patógeno de origem brasileira como sendo o mais agressivo (HARRIGTON et al., 2001); estes resultados têm levado ao estudo molecular de *C. cacaofunesta*, e comprovou-se que existem diferenças genéticas entre os isolados do patógenos provenientes de diferentes regiões geográficas (AMBROSIO et al., 2013). Ao utilizar adaptações específicas nesta metodologia, são detectadas certas atividades enzimáticas por parte do fungo como a produção de protease, lactase e lignina peroxidase (FIRMIO & FURTADO, 2014).

2.3 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis em ramos no campo (ECHANDI, 1965)

Duas plantas de cada genótipo devem ser selecionadas e cinco ramos lenhosos de cada uma com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro são escolhidos para serem inoculados, um em cada 5 ramos será o controle não inoculado. Para o preparo do inóculo o isolado deve de ser reativado, pincelando uma suspensão de suas estruturas em fragmentos de 4 cm de ramos de

cacaueiros cortados ao meio longitudinalmente. Após quatro dias de incubação em câmara úmida, os ascósporos são transferidos para tubo de ensaio contendo meio BDA. Aos oito dias de crescimento do fungo, o mesmo é colocado no tubo de ensaio contendo água destilada estéril e, com auxílio de um pincel, são retiradas as suas estruturas. A suspensão obtida é filtrada em gaze para eliminar os peritécios. A suspensão final composta de ascósporos, conídios e fragmentos de hifas é ajustada para $3,0 \times 10^4$ UFC/mL. Posteriormente, um corte é feito com auxílio de um bisturi estéril nos ramos previamente selecionados, em sentido horizontal, para priorizar o desprendimento das cascas e o lenho ficar exposto. No local do corte, 30µL do inóculo são adicionados e nos ramos controles, 30µL de AA (água/ágar) são inoculados. Logo em seguida um algodão umedecido com água estéril deve ser colocado e o local de inoculação junto com o algodão devem ser envolvidos com fita vedante para formar uma câmara úmida e manter as condições ótimas de crescimento do patógeno e propiciar a infecção na planta.

A avaliação deve ser feita 60 dias após a inoculação, para isso os ramos devem ser cortados 20 cm abaixo do ponto de incisão e colocados em sacos plásticos devidamente identificados para sua posterior análise. No laboratório, a casca dos ramos é retirada para possibilitar a medida de comprimento e largura da lesão.

2.3.1 Análise estatística

Uma vez obtidas as medidas de largura e altura da lesão, pode-se obter a área da lesão causada pelo patógeno no ramo. Uma análise de variância e estimação de coeficiente de correlação Pearson e componentes de variância pode ser feita como no agrupamento de medidas pelo método de Scott-Knott.

2.3.2 Aplicações

Esta metodologia tem sido aplicada quase que exclusivamente para a secção de cacaueiros que possam ser considerados resistentes a *C. cacaofunesta*; em um ensaio feito em 2013 um total de 65 clones foram testados

(SILVA et al., 2013), e esta metodologia de inoculação mostrou ser eficiente na identificação e definição de grupos de clones de cacauzeiros adultos em relação a sua resistência apresentada a *C. cacaofunesta* (SILVA et al., 2013). Em outros estudos a aplicação da metodologia de inoculação em campo tem sido utilizada para analisar a resistência a *C. cacaofunesta* em progênie de cacau para posterior estudo dos parâmetros genéticos que condicionam a resposta ao patógeno (YAMADA et al., 2015). Este trabalho tem comprovado a resistência de clones como VB-1151, TSH-1188 CSG-70 E MAC-01, que também tem sido descrito como resistentes por Silva et al. (2012). O resultado deste tipo de estudo tem comprovado que o cruzamento de clones TSH-1188 x VB-1151 pode ser um ótimo porta-enxerto (YAMADA et al., 2015).

2.4 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis por incisão em mudas em casas de vegetação (SILVA et al., 2012)

Mudas de origem de estacas de 2 meses de idade devem ser lavadas e transplantadas em sacolas plásticas de um 1L de capacidade com uma proporção 1:1 de substrato comercial e solo previamente autoclavados; as mudas deverão permanecer em casa de vegetação por 4 meses a uma temperatura entre 25 e 27°C, sendo molhadas uma vez por dia e adubadas a cada 15 dias, até atingir um tamanho de 1 a 1,5cm de espessura no caule, que é a espessura ideal para ser inoculada. Após cerca de 6 meses as plantas mais homogêneas em tamanho são selecionadas visualmente e uma seção desse grupo deve ser reservada como grupo controle; as plantas que não se adequem ao tamanho desejado serão descartadas.

O inóculo deve ser ajustado para uma concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); as mudas previamente selecionadas com caules de 1 a 1,5 cm de espessura serão inoculadas. Uma incisão no caule deve ser feita com ajuda de um bisturi estéril, em sentido horizontal, 15 cm acima do substrato. Em seguida, utilizando uma pipeta autoclavada, são inoculados 30 µL da suspensão do inóculo. Na parte inferior da incisão uma mecha de algodão umedecido com água estéril deve ser colocada e o local de inoculação junto com o algodão devem ser envolvidos com fita vedante para formar uma câmara úmida e manter as condições ótimas de

crescimento do patógeno e propiciar a infecção na planta. No grupo controle será feito o mesmo procedimento, com a diferença que nele será inoculado 30 µL de água destilada esterilizada.

2.4.1 Análise estatística

Quarenta e oito horas após a inoculação, o algodão e a fita vedante são retirados e 32 dias após a inoculação deve ser feita a contagem de plantas vivas e mortas, e o percentual de mudas mortas deve ser avaliado. A análise estatística é feita através do ANOVA e, para o agrupamento da população, o teste *t* de Dunst deve ser feito definindo padrões de resistência e suscetibilidade.

Uma forma diferenciada de avaliar os sintomas foi proposta por Branco 2006 (dissertação de mestrado, Mapeamento Molecular de Genes de Resistência de Cacaú a Murcha de *Ceratocystis*). Nessa avaliação, diferentes níveis de sintomas são descritos, com base na seguinte escala de notas: 0 - aspecto normal sem sintomas; 1- perda de turgidez da folha, ou amarelecimento de apenas uma folha; 2 - amarelecimento de duas ou mais folhas; 3 - aproximadamente metade do número total de folhas com amarelecimento; 4 - metade das folhas com amarelecimento; 5 -aproximadamente todas as folhas com sintomas; 6 - todas as folhas com sintomas, com ramo vivo; 7 - morte da planta

2.4.2 Aplicações

Esta metodologia tem sido usada principalmente em programas de melhoramento genético para a identificação de genótipos resistentes (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2012 b; SANCHES et al., 2008), e tem possibilitado a identificação da existência de diversos grupos de progênies susceptíveis e resistentes (SILVA et al., 2012). Em outros estudos feitos com esta mesma metodologia, genótipos como CCN51, CCN10, PH16 e SJ02 têm sido identificados como susceptíveis a *C. cacaofunesta* (SANCHES et al., 2008), porém diversos autores também têm identificado genótipos que apresentam

resistência ao fungo, como VB-1151, TSH-1188 e PS-1319 (OLIVEIRA et al., 2009). O uso deste método também tem identificado o genótipo VB-1159 como uma fonte de resistência que pode ser utilizada como porta-enxerto pelos produtores (SILVA et al., 2008).

2.5 Avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis por miniestacua* em espuma fenólica (MAGALHAES et al, 2015)

Hastes apicais são coletadas de ramos plagiotrópicos e transportadas para a casa de vegetação onde são posteriormente preparadas as miniestacas; cada miniestaca é deixada com 4 a 5 folhas e com um comprimento de 6 a 10 centímetros, as bases são cortadas transversalmente 2mm por debaixo de gema foliar, as folhas são reduzidas utilizando umas tesouras, a primeira folha da base é reduzida em 50% o restante das folhas são reduzidas em 20%. As miniestacas já prontas são colocadas em um béquer com água destilada para mantê-las hidratadas.

Posteriormente a base da miniestaca é imersa por 5 segundos em ácido indolbutírico (AIB) diluído em solução hidroalcoólica em uma concentração de 6.000mg.L⁻¹. Em seguida, as miniestacas são inseridas em 2cm de profundidade em espuma fenólica, previamente cortadas em retângulos de 2,5cm x 2,5cm x 5cm; estas espumas são previamente umedecidas e fixadas na vertical em bandejas plásticas.

Uma vez que as miniestacas encontram-se nas espumas fenólicas, as mesmas são levadas a uma câmara de nebulização, que deve ser programada para microaspersão diária por 10 segundos a cada 10 minutos das 6 às 18 horas. Para garantir a nutrição mineral das estacas, 5mL de uma solução de Hoagland (¼ de força iônica) é inoculada na espuma aos 30 e 45 dias. Após 60 dias da permanência das miniestacas em espumas fenólicas, a inoculação de *C. cacaofunesta* é realizada. Antes da inoculação as estacas com sistemas radiculares maior são separadas e as raízes são podadas com a finalidade de obter lesões para facilitar a penetração do fungo.

O inóculo de *C. cacaofunesta* é preparado a uma concentração de 3x10⁴ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); de imediato, as bandejas contendo as estacas foram colocadas em caixas plásticas e 1L do inóculo foi colocado em cada caixa, deixando o sistema radicular de cada planta imerso na

suspensão do inóculo por um período de 24 horas em câmara úmida. Após esse período, o inóculo é drenado e as bandejas levadas novamente para a câmara de nebulização. Após 15 dias, é feita a avaliação mediante a contagem de estacas vivas e mortas.

2.5.1 Análises estatística

Os dados obtidos são submetidos à análise de variância, e em caso de não apresentarem distribuição normal são transformados em raiz quadrada de $X + 0,5$. As médias são comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

2.5.2 Aplicações

O uso desta técnica tem auxiliado e facilitado a avaliação de diversos genótipos de cacauzeiros no que diz respeito à resistência a *C. cacaofunesta*, permitindo avaliar não só a resistência a *C. cacaofunesta*, mas também a taxa de enraizamento de diversos genótipos (MAGALHAES et al., 2015). Esta técnica é pouco conhecida e pouco desenvolvida, mas já tem mostrado eficiência diferenciando genótipos resistentes de suscetíveis; genótipos como o cacau Jaca foi identificado como resistente, o CEPEC-2002 e PS-1319 foram identificados como medianamente suscetíveis e o CCN-51 foi identificado com padrão de suscetibilidade (MAGALHAES et al., 2015), resultados que coincidem com estudos feitos em campo e em mudas (SILVA et al., 2004; LUZ et al., 2000).

2.6 Avaliação da resistência à Murcha de Ceratocystis em disco foliar (MAGALHAES et al, 2016)

A técnica de avaliação por disco de folhas foi desenvolvida e utilizada na CEPLAC para a avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis*. Consiste na utilização de folhas de aproximadamente dois meses de idade (40 a 50 dias). As folhas são selecionadas visualmente no campo por estarem em boas condições fisiológicas, sem lesões e sem depósito de sujeiras visíveis. Posteriormente no laboratório, as folhas são lavadas com água destilada para remover eventuais impurezas, em seguida um corte longitudinal é feito pela nervura central das

folhas e as mesmas são cortadas em discos (40 discos por planta) com um diâmetro de 1,5 cm. Os discos são colocados com a superfície abaxial da folha para cima, em uma caixa plástica de 32,5cm x 22,0cm, sobre uma espuma umedecida com água destilada e previamente ajustada dentro da caixa plástica. Esse sistema gera uma câmara úmida o suficiente para criar um ambiente favorável ao crescimento do fungo; os discos são dispostos em fileiras de 10 e são feitas um total de quatro repetições por planta.

Uma suspensão de *Ceratocystis cacaofunesta* é preparada a uma concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); cada disco foliar é inoculado com 20 microlitros (μL) da suspensão com a ajuda de uma pipeta. As caixas são fechadas e deixadas em completa escuridão por 4 dias, revisando paulatinamente a umidade das espumas. Quatro dias após a inoculação, o número de peritécios germinados em cada disco foliar é contado, com auxílio de uma lupa para a contagem de colônias bacterianas (lupa trinocular mod. IBD-45T).

2.6.1 Análise estatística

Os dados obtidos pela contagem de esporos germinados foram analisados por análise de variância e por agrupamento de Tocher.

Os dados relacionados ao número de esporos germinados por planta são submetidos à análise de variância, considerando-se quatro blocos casualizados, em que cada caixa representa um bloco. Para uma estimativa adequada da resistência dos genótipos avaliados é realizado um teste estatístico de Scott-Knott, baseado na razão de verossimilhança para testar a significância de um número n de tratamentos que podem-se agrupar em dois ou mais grupos (RAMALHO et al, 2000). O teste permite o agrupamento das variedades estudadas em subgrupos, de acordo com o grau de resistência apresentado.

2.6.2 Aplicações

Essa metodologia está sendo amplamente utilizada, já que o tempo e o pouco material requerido para ser feita oferece uma clara vantagem quando comparada com técnicas de avaliação que requerem maior tempo e mais

insumos. Esta técnica foi utilizada para encontrar métodos de biocontrole que possam antagonizar com *C. cacaofunesta* (RODRIGUES et al., 2017); nesse estudo mostrou-se que os esporos de *C. cacaofunesta* podem ser inibidos em presenças de secretomas de *Trichoderma spp.*, inibindo a germinação dos esporos patógenos entre 67% e 100% (RODRIGUES et al., 2017).

Essa metodologia tem se mostrado eficiente na comprovação de diversidades patogênica de isolados de *C. cacaofunesta* (MAGALHÃES et al., 2019), em um estudo onde 42 clones de *C. cacaofunesta* foram testados foi observada uma variação significativa da agressividade dos diversos patógenos (MAGALHÃES et al., 2019), e essa diversidade de agressividade entre patógenos de *C. cacaofunesta* também tem sido comprovada por outro estudos (MAGALHÃES et al., 2016, 2015, SILVA et al., 2013). Esta técnica também tem sido eficiente para a seleção de clones de cacau que podem ser considerados resistentes e que podem ser parte de um programa de melhoramento genético (SANTOS et al., 2015); esse tipo de estudo tem mostrado que existem três grandes grupos nos quais podem ser classificadas as variedades de cacau suscetíveis, como CP-477, CP-486 e CCN-51; medianamente suscetíveis, como CP-230, CP-47 e CP-201; e resistentes, como Jaca, CEPEC-2002, HB-15, CP-40 e PS-1319 (SANTOS et al 2015).

3. DISCUSSÃO

As metodologias analisadas neste capítulo de revisão apresentam claras diferenças entre elas (**Tabela 1**), estas diferenças podem ser de vital importância na escolha do método adequado para a avaliação de um grupo de plantas ou de isolados do patógenos. O tempo requerido para a obtenção de dados relevantes pode ser o fator que mais importância pode ter para selecionar o método adequado, o método de Mudas (SILVA et al 2012) é o método que mais tempo requer para a obtenção de dados, até sete meses, os métodos de Miniestaquia (MAGALHAES et al 2015) e Ramos no campo (DELGADO & ECHANDI 1965) requerem 75 dias e 2 meses respectivamente, sendo os métodos de Disco foliar (MAGALHAES et al 2016) e o método de Ramos no laboratório (SORIA & SALAZAR 1965), os que requerem um menor tempo para a obtenção de dados, porem visando a rápida obtenção de dados estes dos últimos poderiam ser a melhor escola.

O material vegetal disponível pode ser limitante no desenho do experimento, ou tornar-se um fator que influa na escolha do método de avaliação adequado. Nesse sentido, o método de avaliação de ramos no campo (DELGADO & ECHANDI, 1965) requer plantas adultas em condições de cultivo, apresentando grandes riscos de contaminação no campo em caso de falhas na condução dos ensaios. Os métodos de inoculação em mudas provenientes de estacas enraizadas (SILVA et al 2012) e de miniestaquia (MAGALHAES et al 2015) requerem a produção e crescimento de mudas porém e consomem uma grande quantidade de materiais na condução do experimento, o que pode aumentar significativamente o custo do experimento. Os métodos de inoculação em disco foliar (MAGALHAES et al 2016) e de fragmentos de ramos destacados (SORIA & SALAZAR 1965), ambos realizados no laboratório requerem material vegetal prontamente disponível em qualquer época do ano, nas plantações a serem avaliadas, o que pode ser considerado uma grande vantagem. Além disso, esses métodos requerem espaço laboratorial relativamente pequeno para poder ser executado.

Os cinco métodos analisados neste capítulo têm sido aplicados a diversos isolados do patógeno e em diversos clones de cacauero (**Tabela 2**). De um modo geral, os métodos de ramos destacados (SORIA & SALAZAR 1965), ramos no campo (DELGADO & ECHANDI 1965) e miniestaquia (MAGALHAES et al 2015) foram utilizados para identificação de três grupos principais de clones de acordo com o seu nível de resistência a *C. cacaofunesta*: resistente (R); medianamente resistente (MR); e suscetíveis (S). Por sua vez, os métodos de inoculação em disco foliar (MAGALHAES et al 2016) e mudas (SILVA et al 2012) foram utilizados para classificar os genótipos em dois grupos: suscetíveis (S) ou resistentes (R). No entanto, como as classificações em grupos advém da análise estatística dos dados obtidos com diferentes isolados do patógeno e múltiplos genótipos de cacau, o número de grupos vai depender da variabilidade disponível e no tamanho da amostragem de isolados e plantas.

De um modo geral, os múltiplos métodos podem ser adotados de uma forma dependente da aplicação: análise molecular da patogênese em nível de raiz, recomenda-se o método de miniestaquia, ao passo que em nível de caule, recomenda-se o método de avaliação em mudas. A análise dos níveis de resistência de genótipos em grandes populações para seleção massal, bem

como em testes de novas variedades e avaliação de progênies, recomenda-se avaliação dos discos foliares, por ser mais prático, rápido e poder ser feito em qualquer época do ano.

4. CONCLUSÃO

Os métodos de avaliação que foram apresentados neste trabalho apresentam diferenças evidentes entre eles, sendo tais diferenças principalmente no método de avaliação de sintomas e no local de inoculação, porém todos os métodos podem ser utilizados em programas de melhoramento de cacauero, a depender de cada situação concreta de estudo. As diferenças existentes em cada um dos métodos permitem que possam ser utilizado e adaptado para diferentes propósitos.

Para a avaliação de isolados de *C. cacaofunesta* os métodos desenvolvidos por Soria & Salazar (1965) e Magalhaes et al., (2016), são os que têm mostrado melhores resultados na identificação dos isolados de *C. cacaofunesta* que possam apresentar o maior risco para o cacauero.

Os métodos desenvolvidos por Echandi (1965), Silva et al. (2005) e Magalhaes et al. (2015), têm se mostrado muito eficientes na seleção de genótipos resistentes a *C. cacaofunesta*. Através destes métodos também tem identificado três grandes grupos de cacaueros que podem ser classificados como: resistentes, medianamente resistente e suscetíveis, de acordo com os graus de sintomas apresentados ao serem inoculados com *C. cacaofunesta*.

Apoio Financeiro

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq do Brasil (Processo 309841/2015-1), e o primeiro autor recebeu a bolsa de doutorado financiada pelo Consejo Nacional de Ciencias y Tecnologia de México – CONACYT (Processo 32709/382417).

Tabela 1. Principais características dos métodos de avaliação da resistência do cacauero à murcha de *Ceratocystis* por meio de inoculação artificial com suspensão de esporos na concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro

Método	Forma de inoculação (ambiente)	Idade para inocular	Quantidade de inóculo	Tempo avaliação (dias após inoculação)	Amostragem	Autor
Ramos destacados	Gota em lesão no ramo destacado da planta (laboratório)	Variável	30 μ L	4	5 ramos por genótipo	SORIA & SALAZAR (1965)
Ramos no campo	Gota em lesão do ramo na planta (campo)	Variável	30 μ L	60	12 ramos por planta	DELGADO & ECHANDI (1965)
Mudas	Gota em incisão pequena do caule (casa de vegetação)	6 meses	30 μ L	60	6 mudas por genótipo	SILVA et al (2012)
Miniestaquia	Embebição das raízes na espuma fenólica (casa de vegetação)	2 meses	1 L	15	10 mudas por genótipo	MAGALHAES et al (2015)
Disco foliar	Gota em disco foliar (laboratório)	45 dias	20 μ L	4	40 discos por genótipo	MAGALHAES et al (2016)

Tabela 2. Classificação dos níveis de resistência de cultivares de cacau com base em diferentes métodos de avaliação da resistência do cacauzeiro à murcha de *Ceratocystis*

Cultivar	Isolado	Nível* de Resistência obtido em cada Método					Autor
		Disco foliar	Miniestaquia	Mudas	Ramos no Campo	Ramos no laboratório	
CCN51	Cc20, ALF-78, Cf20	S	S	S	.	.	SANCHES 2008, SILVA 2012 MAGALHÃES 2015, 2019,
TSH1188	Cc20., ALF-78, Cf20	R	.	R	R	R	SANCHES 2008, SILVA 2012, 2013, MAGALHÃES 2019.
Jaca	Cc20	R	R	.	.	R	MAGALHÃES 2015, 2019,
CEPEC -2002	Cc20	.	MR	.	.	.	MAGALHÃES 2015,
PH16	Cc20	.	.	S	.	.	MAGALHÃES 2015,
PS1319	Cc20, Cf20	.	MR	.	.	.	SILVA 2012, MAGALHÃES 2015,
ICS43	LH3	S	DELGADO & CAPELLO
SCA6	LH3	.	.	.	MR	S	DELGADO & CAPELLO
SCA24	LH3	S	DELGADO & CAPELLO
AMAZ15-15	LH3	.	.	.	S	.	DELGADO & CAPELLO
UF 676	LH3	.	.	.	MR	.	DELGADO & CAPELLO
VB 309	Cc20	S	SILVA 2013
SCS 18	Cc20	MR	SILVA 2013
FSU 127	S	SILVA 2013
ICS 1	Cf 2, Cf15, Cf17, Cf20, ALF-78	.	.	S	S	S	SANCHES 2008, SILVA 2007, 2012.

*R, resistente; MR, mediamente resistente; S, suscetível.

REFERÊNCIAS

AMBROSIO A.B, COSTA DO NASCIMENTO L, OLIVEIRA B.V, TEIXEIRA P.J.P.L, TIBURCIO R.A, THOMAZELLA D.P.T, LEME A.F.P, CARAZZOLLE M.F, VIDAL R.O, MIECZKOWSKI P, MEINHARDT L.W. Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria. BMC Genomics, v.14, p.91. 2013.

FIRMIN A.C, EDSON LUIZ FURTADO E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. SP Brasil. Summa Phytopathol, v. 40, p. 371-374. 2014.

MAGALHÃES L.A, MAGALHÃES D.M.A, LUZ E.D.M.N, SODRÉ G.A. Diversidade Patogênica de Isolados de *Ceratocystis Cacaofunesta* na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, Bahia. Agrotropica, v. 31, p. 27-36. 2019.

RODRIGUES, G.S.; MAGALHÃES, D.M.A.; COSTA, A.M.; LUZ, E.D.M.N. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. *Summa Phytopathologica*, v.44, p.72-78, 2018.

SANCHES C.L.G, PINTO L.R.M, POMELLA A.W.V, SILVA S. D.V.M, LOGUERCIO L.L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. Euro J Plant Pathol, v.122, p.517–528, 2008.

SANTOS R.M.F, CLEMENT D, LEMOS L.S.L, LEGRAVRE, T, PIRES J.L, LOPES U.V, MICHELI F, GRAMACHO K.P. Identification, characterization and mapping of EST-derived SSRs from the cacao–*Ceratocystis cacaofunesta* interaction. Tree Genetics & Genomes, v.9, p.117-127, 2012.

SANTOS R.M.F, SILVA S.D.V.M, SENA K, MICHELI F. GRAMACHO, K.P. Kinetics and Histopathology of the Cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. Tropical Plan Biol, v.6, p.37-45, 2013.

SILVA S.D.V.M, MANDARINO E.P, DAMACENO V.O, SANTOS FILHOS L.P. BB
Reação de Genótipos de Cacaueiros a Isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*.
Brasil. Fitopatol, v.32, p.6, 2007.

SILVA S.D.V.M, LOPES U.V, DAMACENO V.O, JÚNIOR A.W.O.R. Selection of
cacao genotypes resistant to *Ceratocystis* wilt under field conditions. *Agrotrópica*,
Ilhéus, Bahia, v.25, p.163-170. 2013.

SILVA S.D.V.M, PINTO L.R.M, OLIVEIRAB.F, DAMACENO V.O, PIRES J.L,
DIAS C.T.S. Resistência de progênies de cacaueiro à murcha-de-*Ceratocystis*.
Brasília d f. *Tropical plant pathology*, v.37 p.191-195, 2012.

YAMADA M.M, FALEIRO F.G, LOPES U.V, PIRES J.L. Genetic Parameters and
Resistance of Cacao Progenies to *Ceratocystis* Wilt Under Natural Infection.
Agrotrópica. Ilhéus, Bahia, v.27, p.215-218. 2015.

Capítulo II

Resistência à Murcha de *Ceratocystis* em acessos de cacauzeiros comum da Bahia

Alberto Montejo Diaz, Alice Lichs Marssaro, Dilze Maria Argolo Magalhaes,
Edna Dora Martins Newman Luz, Ronan Xavier Corrêa

RESUMO. As variedades locais de cacau predominantes na região de Mata Atlântica no estado da Bahia, vêm sendo multiplicadas pelos agricultores por mudas seminais produzidas a partir das plantas mais produtivas. No entanto, a resistência desses materiais locais à murcha causada por *Ceratocystis cacaofunesta* não tem sido testada nessa seleção. Adicionalmente, algumas cultivares modernas também apresentam suscetibilidade a esta doença. Desta forma, foram avaliados nesta pesquisa os níveis de resistência de diferentes genótipos de cacauzeiro, visando definir a estratégia de melhoramento genético dessas variedades locais. Amostras foliares de 119 acessos de cacauzeiro, localmente denominados de variedade Comum (CO), Maranhão (MA) e Pará (PA), foram inoculadas com *Ceratocystis cacaofunesta* por meio da técnica de discos foliares. Com base nos níveis de resistência detectados, quatro grupos genéticos de cacau foram definidos por meio do teste de Scott-Knott. A variedade MA destacou-se com a maioria dos acessos classificados no grupo A1 (73,52%), juntamente com a variedade controle de resistência. PA apresentou maior proporção de seus acessos no grupo A2 (41,66%). CO apresentou maior proporção de seus acessos no grupo A3 (31,25%) juntamente com a variedade CCN-51 (41,6%) controle suscetível. Portanto, existe variabilidade para resistência a essa doença nas áreas cultivadas com variedades locais de cacau, cujos acessos resistentes à murcha de *Ceratocystis* serão selecionados para melhoramento visando resistência a essa doença.

Palavras chaves: resistência a doença, melhoramento genético, seleção em fazenda, *Theobroma cacao* L

1.Introdução

Os cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) que são conhecidos como forasteiros são responsáveis pela produção de 90% de cacau no Brasil, Equador, Colômbia, e oeste de África. A partir desse tipo de cacauzeiro é produzida a maioria do cacau comercializado no mundo (MOTAMAYOR et al, 2008). Dentre estes, os forasteiros do alto Amazonas possuem frutos de diversas formas e amêndoas de cor violeta, enquanto os forasteiros do baixo Amazonas possuem frutos de forma amelonada e amêndoas de cor rosa (EFOMBAGN et al, 2009). O cacauzeiro trinitário é uma variedade que surge do cruzamento de crioulo esses forasteiros (POWIS et al, 2011). Alguns exemplos representativos dos trinitários são os clones denominados ICS (*Imperial College Selection*), os quais são avaliados como suscetíveis ao *Ceratocystis cacaofunesta* (ENGELBRECHT & HARRINGTON, 2005). Devido à origem híbrida desta variedade, a forma dos frutos pode variar muito (ARÁNZAZU et al, 2009).

Theobroma cacao possui uma dispersão geográfica ampla na América Latina e conta com populações discretas em cada região, porém variedades distintas têm sido associadas a regiões geográficas distintas (BARTLEY, 1994). Essa particularidade do cacauzeiro foi aproveitada pelos programas de melhoramento que em sua maioria, na década de 1990, eram baseados na procura de variedades de origens geográficas diferentes para a criação de híbridos de interesse agrônômico (PAULIN et al, 1996).

O cacauzeiro apresenta intercruzamento (plantas preferencialmente alógamas), os genótipos crioulos geralmente são auto compatíveis e os genótipos forasteiros apresentam auto incompatibilidade. No entanto, ocorre segregação entre estes dois sistemas de polinização em ambos os grupos (VÁZQUEZ et al, 2012). Nas plantações antigas de cacau da Bahia predominam variedades locais descendentes dos forasteiros baixo-amazônicos (Santos et al.,

2015). No entanto, essas plantações sendo enriquecidas ou substituídas por híbridos e novas variedades por métodos que favorecem intercruzamento com os materiais antigos.

Programas de melhoramento por seleção genealógica tem como resultado descendentes muito heterogêneos, uma consequência da heterozigosidade apresentada pelos pais, o que é considerado um problema. Além disso, é requerido tempo muito prolongado em um programa de melhoramento desse tipo para gerar híbridos de interesses comercial (AGAMA, 2005). A seleção clonal por sua vez é utilizada desde a década de 1940, e tem aumentado o rendimento e a homogeneidade das plantações pois consiste em disseminar, por meio da propagação vegetativa, os clones de híbridos previamente selecionados (BOWMAN, 1949).

Com a proliferação da Vassoura de Bruxa na década de 1990, a região produtora de cacau na Bahia adotou o plantio de clones considerados resistentes como estratégia para combater a doença (PEREIRA, 2001). No entanto, existe pouca informação da origem desses clones, embora se saiba que a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) usou 18 progenitores para a criação desses híbridos que foram amplamente distribuídos na região cacaueira (YAMADA et al., 2003; FALEIRO et al., 2004). A maioria desses clones originam-se de seleção local feita por agricultores em suas fazendas em cooperação com pesquisadores (LOPES et al. 2004). Estudos sobre a diversidade genética dessas seleções, baseado em marcadores moleculares, mostrou uma ampla diversidade existente nas fazendas, evidenciando potencial de encontrar genótipos como fonte promissora para o melhoramento, e com elevada diversidade genética, distinta daquela existente nos bancos de germoplasmas (LEAL, 2008).

Considerando-se que são utilizadas as variedades locais em parte dos cultivos de cacau da Bahia, associado ao histórico de distribuição de materiais híbridos nessa região, bem como ao fato de que o cacaueiro foi introduzido nessa região a mais de dois séculos (SANTOS et al, 2015), nossa hipótese foi que existiria materiais com níveis de resistência à Murcha de *Ceratocystis* nos cultivos de cacaueiro comum. O longo tempo de cultivo e a promoção de cruzamentos entre material local e híbridos, provavelmente proporcionam misturas de genes na população. Nesse contexto, o presente trabalho foi

desenvolvido com o objetivo de descrever os níveis de resistência à murcha de *Ceratocystis* em diferentes genótipos de cacauero em cultivo de variedades locais de cacau, visando avaliar o potencial de sua utilização no melhoramento visando resistência a essa doença.

2. Metodologia

2.1 Material biológico

As plantas utilizadas nesse estudo foram provenientes da Fazenda Novo Horizonte, em Uruçuca, BA, as quais são cultivadas em sistema agroflorestal tipo cabruca a partir de mudas seminais, implantadas há mais de 30 anos. Foram coletadas 3 folhas fisiologicamente maduras por planta adulta, com o pecíolo na cor de transição entre verde e marrom. Um total de 119 plantas adultas (genótipos) foram avaliadas no presente trabalho, as quais foram plantadas na fazenda a mais de 30 anos a partir de mudas seminais. Cada grupo de genótipos ficou assim representado na amostragem: 34 plantas da variedade localmente denominada de Maranhão (MA), 36 plantas Pará (PA), 49 plantas Comum (CO). Adicionalmente, duas variedades foram proporcionadas pela CEPLAC como controles, a variedade mutante Jaca foi utilizada como padrão de resistência, e a variedade clonal CCN-51 foi utilizada como padrão de suscetibilidade, porque foram previamente avaliadas em ensaios de inoculação por diferentes métodos e tipos de isolados do patógeno (SILVA et al., 2004; 2007; SANCHES et al., 2008).

O isolado de *C. cacaofunesta* denominado de Cc-20, pertencente à coleção de *Ceratocystis* da micoteca da seção de fitopatologia do Centro de Pesquisa de Cacau (CEPEC), foi utilizado para a inoculação. Esse isolado foi obtido em plantações locais da Bahia e pertence ao grupo de isolados identificados previamente como os mais virulentos (Silva et al., 2007).

2.2 Avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis*

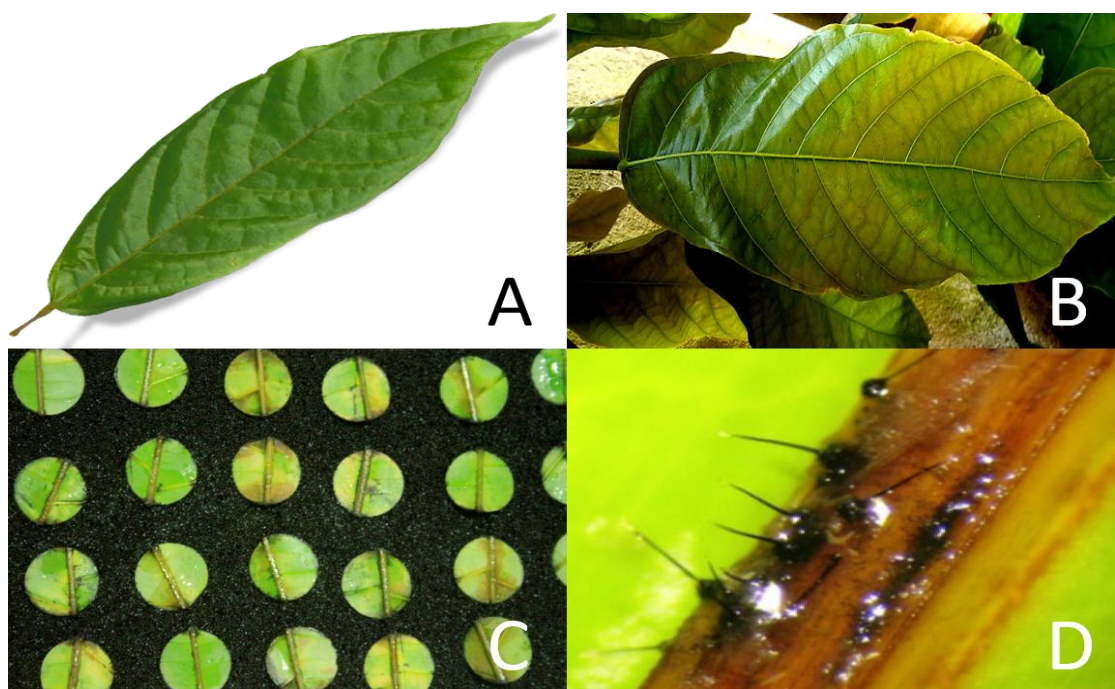


Figura 1. Metodologia de avaliação por disco; (A) seleção de folhas em bom estado, (B) nervura central onde e feito o corte longitudinal, (C) disco foliares prontos para serem inoculados, (D) peritécios formados na nervura central.

A técnica de avaliação por disco de folhas foi utilizada para a avaliação da resistência à Murcha de *Ceratocystis* (MAGALHAES et al., 2016) (Figura 1). As folhas foram selecionadas visualmente no campo por estarem em boas condições fisiológicas (Figura 1A), sem lesões e sem depósito de sujeiras visíveis. No laboratório, as folhas foram lavadas com água destilada para remover eventuais impurezas, posteriormente um corte longitudinal foi feito pela nervura central das folhas e em seguida foram cortadas em discos, com um diâmetro de 1,5 cm (Figura 1B, C).

Os discos foram colocados com a superfície abaxial da folha para cima, sobre uma espuma umedecida com água e previamente ajustada dentro de caixa plástica (32,5cm X 22,0cm). Para cada planta, foram organizadas fileiras de 10 discos em cada caixa, sendo quatro repetições por planta, totalizando 40 discos por planta. Após cobrir a caixa com a tampa, esse sistema gerou uma câmara úmida suficiente para criar um ambiente favorável ao crescimento do fungo.

Cada disco foliar foi inoculado com uma gota de 20 microlitros (mL) da suspensão de esporos do isolado Cc-20 de *C. cacaofunesta*, na concentração de 3×10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC / mL). Quatro dias após a inoculação, o número de peritécios germinados em cada disco foliar foi contado (Figura 1D), com auxílio de uma lupa trinocular (mod. IBD-45T).

2.3 Análises estatísticas

Os dados de número médio de peritécios germinados por planta foram submetidos à análise de variância, considerando-se quatro blocos casualizados, em que cada caixa representa um bloco. Para uma distinção adequada da resistência dos genótipos avaliados, foi realizado o teste estatístico de Scott-Knott, baseado na razão de verossimilhança para testar a significância de um número n de tratamentos que podem-se agrupar em dois ou mais grupos (RAMALHO et al., 2000).

Essas análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SISVAR, com base nos 119 genótipos de variedades locais e os dois clones controle.

3. Resultados

Com base na contagem de peritécios de *C. cacaofunesta* germinados nos discos foliares, conforme método desenvolvido por Magalhães et al. (2016), foram constatadas diferenças significativas entre os 119 acessos de variedades locais de cacauzeiros avaliados no presente trabalho (Tabela 1). Desta forma, com base no teste de Scott Knott das médias apresentadas pelos 119 genótipos, foram identificados quatro agrupamentos de genótipos de cacauzeiro (Tabela 2).

Tabela 1. Análise de variância no teste Scott Knott do número médio de peritécios germinados de *Ceratocystis cacaofunesta*, em 119 genótipos de variedades locais de cacau.

FV	GL	QM	Fc	Pr>Fc
Genótipo	119	475.150	9.307	0.000
Erro	375	51.055		
Total Corrigido	499			
CV (%)	48.91			
Média Geral	14.608			

De acordo com os resultados do teste Scott Knott, foi possível dividir a população de 119 plantas das variedades CO, PA e MA em quatro grupos principais (Tabela 2). O Grupo A1: formado por plantas com uma contagem de peritécios notavelmente inferior ao controle resistente (Jaca). Grupo A2: formado pelas plantas com uma contagem de peritécios similar ao de o controle resistente (Jaca). Grupo A3: um grupo formado por plantas que apresenta uma contagem de peritécios inferior ao controle suscetível (CCN 51) porém maior que o controle resistente (Jaca). Grupo A4: formado por plantas com número de peritécios contabilizados superior ao genótipo suscetível (CCN 51).

Tabela 2. Número médio de peritécios germinados de *Ceratocystis cacaofunesta* pôr o teste Scott Knott, em 119 genótipos de variedades locais de cacau.

ID	VAR	GRU	MED	ID	VAR	GRU	MED	ID	VAR	GRU	MED
4065	CO	A1	2,12	4133	MA	A1	7,55	4031	PA	A3	24,07
4096	CO	A1	2,85	4119	MA	A1	0,27	4007	PA	A3	19,87
4094	CO	A1	6,75	4043	MA	A1	7,3	4063	CO	A3	22,72
4155	PA	A1	5,57	4117	MA	A1	5	4032	CO	A3	23,9
4178	CO	A1	5,22	4083	CO	A1	1,27	4006	PA	A3	30,7
4179	CO	A1	2,07	4118	MA	A1	2,57	4059	CO	A3	19,07
4151	PA	A1	2,3	4132	MA	A1	8,15	4125	MA	A3	17,65
4176	CO	A1	4,22	4060	CO	A2	10,67	4070A	CO	A3	28
4163	PA	A1	8,42	4047	PA	A2	16,67	4181	CO	A3	29,15
4177A	CO	A1	0,97	4121	MA	A2	17,05	4005	PA	A3	17,5
4180	CO	A1	4,97	4152	PA	A2	12,15	4054	CO	A3	17,47
4153	PA	A1	6,3	4157	PA	A2	8,22	4115	MA	A3	21,02
4103	MA	A1	10,47	4095	CO	A2	15,72	4085	CO	A3	25,4
4110	MA	A1	2,25	4188	CO	A2	13,17	4056	CO	A3	18,27
4114	MA	A1	3,22	4105	MA	A2	8,77	4010	CO	A3	28,15
4112	MA	A1	3,07	4187	CAT/CO	A2	14,9	4033	PA	A3	22,45
4139	MA	A1	4,45	4071	CO	A2	15,15	4036	PA	A3	27,12
4185	CO	A1	5,82	4037	PA	A2	9,6	4089	CO	A3	16,92
4108	MA	A1	6,02	4035	PA	A2	9,85	4091	CO	A3	25,52
4135	MA	A1	4,62	4077	CO	A2	9,3	4090	CO	A3	21,1
4193	CO	A1	7,45	4012	PA	A2	14,82	4183	CO	A3	17,02
4137	MA	A1	2,15	4015	PA	A2	12,47	4104	MA	A3	25,75
4140	MA	A1	3,3	4087	CO	A2	12,72	4186	CO	A3	30,12
4134	MA	A1	5,82	4158	PA	A2	13,02	4017	PA	A3	20,5
4053	CO	A1	9,47	4162	PA	A2	17,85	4107	MA	A3	24,27
4009	PA	A1	8,07	4165	PA	A2	9,55	4001	PA	A4	37,32
4039	PA	A1	7,32	4099	CO	A2	10,8	4154	PA	A4	38,77
4101	MA	A1	2,12	4086	CO	A2	15,57	4131	MA	A4	32,5
4102	MA	A1	8,22	4127	MA	A2	11,62	4076	CO	A4	37,2
4184	CO	A1	7,85	4042	PA	A2	12,02	4016	PA	A4	33,05
4106	MA	A1	6,17	4156	PA	A2	14,02	4075	CO	A4	33,17
4141	MA	A1	0,75	4092	CO	A2	12,97	4116	MA	A4	34,35
4161	PA	A1	2,3	4045	PA	A2	10,97	4062	CO	A4	30,02
4126	MA	A1	4,32	4100	MA	A2	17,35	4070B	CO	A4	43,87
4177B	CO	A1	5,97	4019	PA	A2	12,47	4057	CO	A4	28,5
4109	MA	A1	0,9	4084	CO	A2	10,87	4058	CO	A4	31,75
4111	MA	A1	7,72	4026	PA	A2	9,95	HC	CO	A4	29,8
4107	MA	A1	5,35	4064	CO	A2	11,17	4044	PA	A4	30,17
4113	MA	A1	3,22	4060	CO	A2	10,67	4050	PA	A4	33,7
4138	MA	A1	0,46	4067	CO	A3	23,12	4069	CO	A4	29,02

Uma parte dos acessos de cacau amostrados no campo apresentou um número de contagem de peritécios semelhantes ao CCN51 (padrão de suscetibilidade), bem como acessos que apresentam número semelhante ao cacau Jaca (padrão de resistência) (Figura 2). Com esses resultados foi possível identificar as plantas com padrão semelhante ao controle resistente bem como plantas com padrão semelhante ao susceptível. Além disso, foram identificadas as plantas que apresentaram número de peritécios germinados

significativamente inferior ao controle resistente, bem como plantas que apresentaram número superior ao controle suscetível.

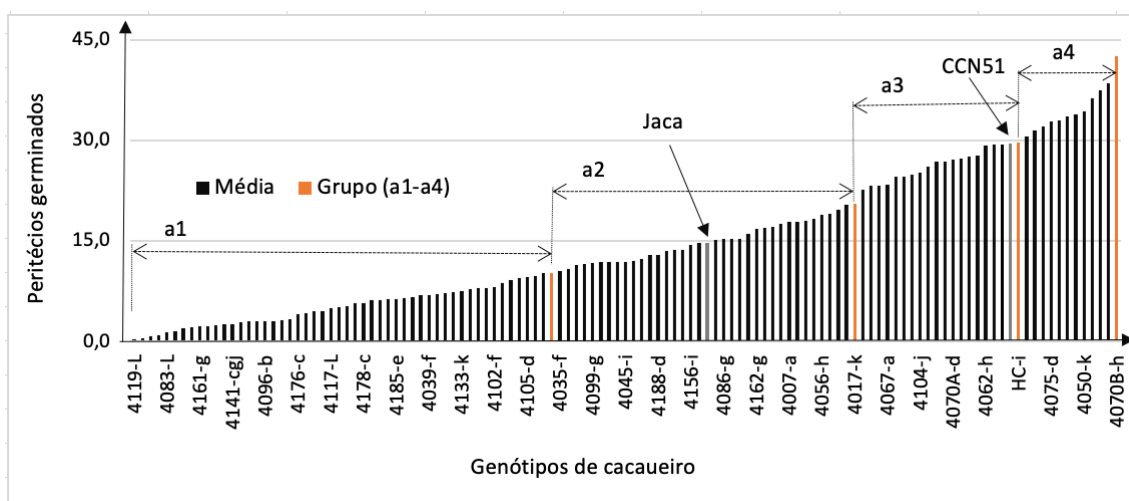


Figura 2. Número médio de peritécios germinados de *Ceratocystis cacaofunesta*, em diferentes genótipos de cacauero. O cacau Jaca é o controle resistente e CCN51 é o suscetível. As setas a1 até a4 representam os grupos de genótipos definidos pelo teste Scot-Knott a 5% de probabilidade.

Com base no teste de Scott Knott, a amostra populacional original de 119 acessos foi reorganizada em subgrupos com as denominações de variedades locais CO, MA e PA, comprovando-se que existe indivíduos distribuídos nos quatro grupos A1, A2, A3 e A4 (Tabela 2). Portanto, apresenta variabilidade de acordo com o grau resistência dentro de variedades, sendo A1 e A2 os grupos que apresentam menor número de peritécios germinados (maior resistência), e os grupos A3 e A4 os que apresentam maior número de peritécios germinados (menor resistência) (Tabela 2).

As plantas foram distribuídas em diferentes grupos (A1, A2, A3 e A4) de acordo com a intensidade de sintomas (contagem de peritécios) observado nos discos inoculados, comprovando-se a existência de variabilidade genética dentro das amostras de cada variedade usada no estudo (Tabela 2). A variedade MA apresentou a maior quantidade de acessos avaliadas como A1 (nota mais alta para resistência) um total de 25 acesso, enquanto CO e PA apresentaram os menores números de acessos avaliados nesse grupo um total de 13 e 7 acessos respectivamente. No outro extremo, os acessos avaliados com A4 (susceptíveis), a variedade CO exibiu o maior número de acessos um total de 8, enquanto PA e MA exibiram os menores números de acesso avaliadas nesse grupo um total de 5 e 2 respectivamente. Porém fica evidente que , na variedade MA predominam plantas resistentes e na variedade CO predominam plantas suscetíveis (Tabela 5).

Tabela 3. Dimensão dos grupos de genótipos obtidos para cada variedade analisada, a partir do número médio de peritécios, definidos com base no teste Scott Knott.

Variedades	Número e % de plantas por grupo				Total de Plantas
	A1	A2	A3	A4	
CO	13 (27,08)	12 (25,0)	15 (31,25)	8 (16,66)	48
PA	7 (19,44)	15 (41,66)	9 (25,0)	5 (13,88)	36
MA	25 (73,52)	4 (11,76)	3 (8,88)	2 (5,88)	34
Jaca	5 (41,7)	5 (41,7)	2 (16,6)	0	12
CCN-51	2 (16,7)	2 (16,7)	3(25,0)	5 (41,6)	12

Quando a taxa porcentual obtida por cada variedade (MA, PA, CO) são contrastados com as porcentagem obtidos pelos controles (Tabela 3), a variedade MA tem um maior porcentagem de acesos avaliadas como A1 (73,5%), sendo este maior que o porcentagem obtido por o cacau Jaca (50%) (controle resistente). As variedades CO e PA por sua vez apresentaram 27,1% e 29,4% respectivamente com nota A1, ambas variedades obtiveram porcentagem inferior ao controle resistente (Jaca). As duas variedades CO e PA obtiveram uma porcentagem maior que o CCN-51 (controle susceptível) que obteve 16,6%. Dentre os acessos avaliados com nota A2, a variedade PA obteve a maior

porcentagem (41,6%), seguida pelas variedades CO e MA com 25% e 11,7% respectivamente, todas as variedades analisadas (CO, MA, PA) apresentaram porcentagem menor de acessos avaliados como A2 que os controles resistentes (Jaca) e suscetível (CCN-51), ambos controles obtiverem 50% de acessos avaliados como nota A2. Dos acessos avaliadas como A3, a variedade CO obteve a maior porcentagem (31,2%) seguida pelas variedades PA e MA com 25% e 8,8% respectivamente todas os porcentagem foram inferiores ao de CCN-51 33,3%, o cacau Jaca não apresentou acessos avaliados como A3. Dos acessos avaliadas como A4 a variedade CO obteve uma porcentagem 16,6% seguidas pelas variedades PA e MA com 13,8% e 5,8% respectivamente, os dos controles apresentarem 0% de acessos avaliadas com A4. A **Tabela 3** evidencia que a única variedade que supera em resistência ao cacau Jaca (controle resistente) é a variedade Maranhão (MA), as outras duas variedades analisadas de fato possuem genótipos que apresentam uma maior resistência que o cacau CCN-51 (controle susceptível), mais não maior que o cacau Jaca. Porém a variedade MA pode ser uma grande fonte de resistência contra *C. cacaofunesta*, além disso as variedades CO e PA possuem grupos de plantas que apresentam resistência contra *C. cacaofunesta* e que não devem de ser deixados de lado.

4. Discussão

Os dados obtidos na avaliação de resistência a *C. cacaofunesta* mostram que existem plantas que possuem uma elevada resistência que ainda não tem sido estudada. Isto torna-se de grande relevância pois na literatura não tem sido descrita ainda o nível de resistência a *C. cacaofunesta* por genótipos das variedades locais da Bahia. Esses resultados tornam-se de grande importância pois estudos tem mostrado que clones que são amplamente utilizados na região como CEPEC-2009, CCN-51, CCN-10, PH-16, SJ-02, entre outros apresentam uma grande susceptibilidade a *C. cacaofunesta* (SANCHEZ et al., 2008; SILVA et al., 2012). Porém a procura de genótipos que possam ser utilizados como nova fonte de resistência na região é primordial para evitar e prevenir a propagação da doença ocasionada por *C. cacaofunesta*.

Os resultados do índice da taxa porcentual mostrados na Tabela 3, evidenciam que uma porcentagem importante de genótipos testados se encontra

classificados como A1 ou A2, podendo ser estes acessos os de maior interesse, pois poderiam ser usados como material que forneça resistência num programa de melhoramento genético do cacauzeiro. É importante notar que as três variedades estudadas (MA, PA e CO) possuem plantas classificadas como resistentes (A1 e A2), o que tem um significado prático muito importante: permite o melhoramento ser realizado dentro de cada variedade. Os programas de melhoramento precisam de plantas com características e qualidades diferentes entre elas como produtividade, resistência a doenças e variabilidade genética (FARIÑAS et al., 2002; MARTINEZ, 2016). Dentre as 12 plantas de CCN51 coletadas em dias diferentes, quatro foram classificadas nos grupos A1 e A2. Isso se deve a diferenças que ocorreram provavelmente causadas por diferenças fisiológicas das folhas utilizadas. Da mesma forma, as duas plantas do cultivar resistente Jaca ficaram no grupo 3. Mesmo assim, ao considerar os valores médios dos genótipos, foi possível distinguir claramente os grupos que representam diferentes níveis de resistência (Figura 1).

Fica evidente na Figura 4 e na Tabela 5, que a variedade Maranhão (MA) possui um grande potencial ainda não explorado como fonte de resistência a *C. cacaofunesta*, uma vez que esta variedade apresentou o maior número de acessos avaliados como resistentes com um total de 25 como A1, do total de 35 plantas dessa variedade, 73,5% foram classificadas como A1 (resistentes) uma porcentagem ainda maior que o controle resistente (Jaca). Adicionalmente, as variedades Comum (CO) e Pará (PA) não devem ser deixadas de lado pois também possuem acessos que apresentam potencial como fonte de resistência.

Das variedades estudadas CO, PA e MA ainda não tem sido reportado seus níveis de resistência a *C. cacaofunesta*, isso torna relevante nossa pesquisa já que clones que são considerados resistente para Vassoura de Bruxa como CCN-51, ICS-1, CEPEC-2008, TSH-516, CEPEC-2002 entre outros tem mostrado algum nível de susceptibilidade a *C. cacaofunesta*, com exceção de TSH-1188 que tem sido descrito como resistente (SANCHEZ et al., 2008; SILVA et al., 2012).

Devido a que as variedades MA, CO e PA foram introduzidas a mais de dois séculos na região, elas possuem uma aclimação as condições de cultivos da região, além de ser consideradas pelos agricultores como produtivas pois apresentam grande rendimento de sementes, porem podem ter um grande

potencial para formar parte de um programa de melhoramento focado na resistência a *C. cacaofunesta* nesta região de cultivo (SANTOS et al., 2015).

5. Conclusões

Há variação nos níveis de resistência à murcha de *Ceratocystis* dentro de cada variedade local amostrada que comprova viabilidade para realizar melhoramento genético dessas variedades.

Os acessos de cacauzeiro amostrados que se mostraram resistentes à murcha de *Ceratocystis* são úteis como fonte de resistência adaptadas às condições climáticas e agronômicas adotadas na Bahia.

A variedade local denominada pelos agricultores de MA possui a maior proporção de plantas resistentes à murcha de *Ceratocystis* do que as variedades CO e PA.

Agradecimentos

Os autores são gratos aos proprietários da Fazenda Novo Horizonte, especialmente ao Prof. Luiz Augusto Grimaldi Sampaio, pela autorização da coleta das amostras foliares. Agradecem também ao Centro de Pesquisas do Cacau, pelo uso do laboratório de *Ceratocystis* na etapa de inoculação. Esta pesquisa foi financiada pelo *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – CNPq do Brasil (Processo 309841/2015-1), e o primeiro autor recebeu a bolsa de doutorado financiada pelo *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México* – CONACYT (Processo 32709/382417).

REFERÊNCIAS

AFOAKWA E, PATERSON A, FOWLER M, RYAN A. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, v.48, p. 840-857, 2008.

AGAMA J. Selección de progenies y plantas elites de cacao *Theobroma cacao* L., mediante la evaluación de características agronómicas y de resistencia a enfermedades, Quevedo. Los ríos. Trabajo de grado. Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. P.6-20. 2005.

ARANZAZU F, MARTÍNEZ N, PALENCIA G, CORONADO R, RINCÓN D. Manejo del recurso genético para incrementar la producción y productividad del sistema de cacao en Colombia. Unión Temporal Cacao de Colombia. FEDECACAO, CORPOICA y Ministerio de Agricultura y Desarrollo. Agrosavia, v.20, p.128, 2009.

BARTLEY C, COPE F. Practical aspects of self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. Moav, R., ed. *Agricultural Genetics*. New York, Wiley. p.09-134, 1973.

BOWMAN G. Desarrollo de plantaciones clonales de cacao con material superior. *Cocoa Information Bolletin*, v.1, p.1-4, 1947.

EFOMBAGN M, SOUNIGO O, ESKES A, MOTAMAYOR J, MANZANARES M, SCHNELL R, NYASSÉ S. Parentage analysis and outcrossing patterns in cacao *Theobroma cacao* L. farms in Cameroon. *Heredity*, v.103, p.46-53, 2009.

EFOMBAGN M. I. B, SOUNIGO O, NYASSÉ S, MANZANARES-DAULEUX M, ESKES A.B. Phenotypic variation of cacao (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*. v.1, p.258-264. 2009.

FALEIRO F.G, LOPES U.V, YAMADA M.M, MELO G.R.P, MONTEIRO W.R, PIRES J.L, ROCHA J.B, BAHIA R.C.S, GOMES L.M.C, ARAÚJO I.S, FALEIRO A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.12-17, 2004.

FALEIRO F.G, LOPES U.V, YAMADA M.M, MELO G.R.P, MONTEIRO W.R, PIRES J.L, ROCHA J.B, BAHIA R.C.S, GOMES L.M.C, ARAÚJO I.S, FALEIRO A.S.G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.12-17. 2004.

FALQUE L.M, LESDALONS C, ESKES A.B. Comparison of two cacao (*Theobroma cacao* L.) clones for the effect of pollination intensity on fruit set and seed content. *Sex Plant Reprod*, v.9, p.221–227. 1996.

FARIÑAS L.G, BERTORELLI L.O, ANGULO J, PARRA .P. Características físicas del fruto de cacao tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de cumboto, Venezuela. *Agronomía Trop*, v.52, p.3. 2002.

JAIMES, Y. & ARANZAZU, F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao *Theobroma cacao* L., en Colombia con énfasis en *Monilia Moniliophthora roreri*. Bogotá; CORPOICA, FEDECACAO y Ministerio de Agricultura. pp 13 – 22.

JOHNSON E, BEKELE F, BROWN S, SONG Q, ZHANG D, MEINHARDT L, SCHNELL R. Population structure and genetic diversity of the Trinitario cacao *Theobroma cacao* L. from Trinidad and Tobago. In: *Crop Sci*, v.49 p.564-572, 2009.

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

LOPES U.V, MONTEIRO W.R, PIRES J.L, ROCHA J.B, PINTO L.R.M. On farm selection for witches' broom resistance in Bahia, Brazil: a historical retrospective. *Agrotrópica*, v.16, p.61-66, 2004.

MAGALHÃES M.A, NEWMAN LUZ E.D.M, LOPES U.V, SILVA S.D.V.M, DAMACENO V.O, NIELLA A.R.R. A new method for early detection of *Ceratocystis* spp. on various hosts. *Agrotrópica*, v.27, p.209-214. 2015.

MOTAMAYOR J, LACHNEAUD P, DA SILVA E MOTA J, LOOR R, KUHN D, BROWN J, SCHNELL R. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *Plos one*, v.3, p.3311, 2008.

MOTAMAYOR J, RISTERUCCI A, LÓPEZ P, ORTIZ C, MORENO A, LANAUD C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, v.89, p.380-386, 2002.

MOTAMAYOR J.C, LACHENAUD P, D.A, SILVA E, MOTA J.W, LOOR R, KUHN D.N. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, v.3, p.3311. 2008.

PAULIN D, CLEMENT D, NGORAN J, ESKES A. Preliminary results of the selection of individual clones. *International Cocoa Research Conference, Salvador Bahía*, v.12, p.342, 1996.

PEREIRA A.B. Melhoramento clonal. Melhoramento genético do cacauero. Viçosa: Funape, p.361-384, 2001.

POWIS T, CYPHERS A, GAIKWAD N, GRIVETTI L, CHEONG K. 2011. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*, v.108, p.8595-8600, 2011.

POWIS T.G, CYPHERS A, GAIKWAD N.W, GRIVETTI L, CHEONG K. Cacao use and the San Lorenzo Olmec. *PNAS*, v.108, p8595-8600. 2011.

RAMALHO M.A.P, FERREIRA D.F, OLIVEIRA A.C. A experimentação em genética e melhoramento de plantas. *Lavras*, p.326. 2000.

RONDON J. Mejoramiento genético del cacao *Theobroma cacao* L. En: *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Bucaramanga, Corpoica, p.37-38, 2000.

SANCHES C. L. G, PINTO L. R. M, POMELLA A. W. V, SILVA S. D. V. M, LOGUERCIO L. L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. Eur J Plant Pathol, v.122. p.517–528, 2008.

SANTOS D.R & SILVA M.M. Agrobiodiversidade em áreas cultivadas com cacau em altamira-para. Amazonia oriental. Agroecologia, v12, p.210-22. 2015.

SANTOS E.S.L, CERQUEIRA-SILVA C.B.M, GUSTAVO M, MORI G.M, AHNERT D MELLO D.L.N, PIRES J.L, CORRÊA R.X, SOUZA A.P. Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil, Plos one, v.10, p.1371, 2015.

SILVA S.D.V.M, MANDARINO E.P, DAMACENO V.O, SANTOS FILHO L.P. Reaction of cocoa genotypes to isolates of *Ceratocystis cacaofunesta*. Brasília. Fitopatol, v.32 p.6, 2007.

SILVA S.D.V.M, PINTO L.R.M, OLIVEIRA B.F, DAMACENO V.O, PIRES J.L, DIAS C.T.S. Resistencia de progenis de cacauero a Murcha-de-*ceratocystis*. Tropical Plant Pathology, v.37, p.191-195, 2012.

SILVA, S.D.V.M, PAIM, M.C, CASTRO, W.M. Cacau ‘Jaca’ Resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacaueira da Bahia, Brasil. Fitopatologia Brasileira, v.29, p.538-540. 2004.

YAMADA, M.M.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V.; FLORES, A.B.; MELO, G.R.P. Diversidade e origem de seleções de cacau (*Theobroma cacao* L.) feitas em fazendas para resistência à vassoura-de-bruxa. Anais, v3. 2003.

Capítulo III

Nota científica: Caracterização da Diversidade Genética em Variedades Locais de Cacau da Bahia com Marcadores Microsatélites

1. Introdução

O sistema agro florestal denominado Cabruca é o mais predominante na região sul da Bahia, até um 70% das plantações de cacau são de esse sistema (ARAUJO et al., 2012). Este sistema tem permitido a conservação da fauna e flora local (FARIA et al., 2007, SAMBUICHI et al., 2006). As principais variedades plantadas neste sistema de cultivo são Maranhão (MA), Para (PA) e comum (CO), estas variedades apresentam diferenças entre si principalmente na forma dos frutos (VELLO et al., 1971, BARTLEY et al., 2005). Considerando o longo tempo que estas variedades vêm sendo cultivadas na região e a suas diversas características, atualmente são consideradas como variedades baianas, porém a região é considerado um local importante de diversidade de cacau (BARTLEY et al., 2005, VELLO et al., 1972). Estudos tem avaliado estas variedades mediante diâmetro do fruto, peso e número de sementes e foram caracterizadas como altamente produtivas e de grande importância agrônômica (CRESTE et al., 2001, PRITCHARD et al., 2000).

Em 1989, devido ao surgimento da doença Vassoura de Bruxa, causada pelo o fungo *Moniliophthora perniciosa* o desenvolvimento de material vegetal híbrido foi deixado de lado e a introdução de clones foi priorizada na região (EARL, 2012). Antes da chegada da Vassoura de Bruxa na região as variedades MA, PA e CO foram as variedades predominantemente plantadas na Bahia. (CRESTE et al., 2001).

Já que o cacau baiano possui uma longa história, pode ser usado como um grande recurso genético adaptado na Bahia, porém a caracterização

molecular torna-se importante para identificar a diversidade genética de plantas que poderiam ser utilizadas em programas de melhoramento genético (SANTOS, 2015).

Estudos recentes têm mostrado uma baixa relação genética entre a maioria das variedades e clones adaptados na Bahia, porém estas plantas podem ser utilizadas por programa de melhoramento para aumentar a resistência e produtividade assim como a qualidade do cacau da Bahia (SANTOS, 2015).

Para o desenvolvimento de cultivares resistente é importante a identificação de marcadores genéticos que estejam ligados a loci de resistência (FALEIRO et al., 2006). Diferentes mapas de ligações têm sido desenvolvidos para o cacau, por diversos grupos de pesquisa, utilizando-se diferentes populações e vários tipos de marcadores moleculares (LANAUD et al., 1995).

Para um programa de melhoramento de resistência com foco em *Ceratocystis cacaofunesta*, a seleção de acesso por meio de marcadores moleculares pode ser um fator determinante para a eficiência do programa (PUGH et al., 2004, FALEIRO et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que em uma população F₂ o padrão de segregação de genes resistente a *C. cacaofunesta* apresentam uma distribuição contínua, evidenciando que a resistência a este patógeno não está em loco único do genoma ou em um único gene (SANTOS R.M.F et al., 2012, FERNANDES et al. 2018). Tem-se reportado que a resistência a *C. cacaofunesta* é poligênica e recessiva (SORIA & SALAZAR., 1978, SANTOS R.M.F et al., 2012). Os genes relacionados com resistência a *C. cacaofunesta* apresentam um tipo de segregação transgressiva, o qual pode ser uma grande vantagem na criação de cultivares resistentes, pois este tipo de segregação permite a seleção de indivíduos que transfiram ainda mais genes de interesse que seus pais (RAMALHO et al 2000).

2. Metodologia

2.1 Genotipagem de cacauzeiros marcadores moleculares

Uma amostra de 96 plantas de cacau com diferentes níveis de resistência à Murcha de *Ceratocystis*, dentre as quais 94 são provenientes da Fazenda Novo Horizonte localizada em Uruçuca, BA, e as quatro demais são os clones Jaca, Sca6, CCN51 e Cep1, foram genotipadas com os marcadores moleculares, identificando-se os padrões alélicos. Esses dados foram utilizados no cálculo das distâncias genéticas e análise de agrupamento.

2.2 Análises moleculares

Os 96 acessos foram amplificados com cinco locos de microssatélites. Esses locos foram selecionados na literatura por terem sido relacionados a resistência a *Murcha de Ceratocystis* (SANTOS et al., 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos locos microssatélites utilizados na análise molecular (SANTOS et al., 2013)

Nome do primer	Sequência	T (°C)
MTCCEPEC14 R	AAGAGGAAGAAAGGGAAGG	60-48
MTCCEPEC14 F	GCTTTGAAACCCAGTTGTAG	60-48
CIR19 R	GCTTTGAAACCCAGTTGTAG	60-48
CIR19 F	CACAACCCGTGCTGATTA	60-48
MTCCEPEC13 R	GCAACCTTTCCAGCTAC	60-48
MTCCEPEC13 F	TTTGGTGTGGGGCT	60-48
MTCCEPEC28 R	CGGACTGAACTGGAGAAAG	60-48
MTCCEPEC28 F	CCCACCTCCATGTGCT	60-48
MTCCEPEC17 R	GCTTCTCTCCGCTTGTT	60-48
MTCCEPEC17 F	CTTTTGAGGCAAAGGGT	60-48

Três folhas foram coletadas no campo por cada acesso, posteriormente foram lavadas, secadas e cortadas para seu armazenamento em papel alumínio a -60 °C, para sua posterior extração de DNA (DOYLE & DOYLE., 1990).

As ampliações do DNA extraído foram feitas com o seguinte protocolo; 35 ciclos de 94° por 45 segundos, temperatura de hibridação 60° por 45 segundos, 72° por 45 segundos, 72° por cinco minutos e concluindo com 4° por 10 minutos. Posteriormente o produto da amplificação foi analisado em eletroforeses em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR, para certificar a qualidade das ampliações.

Para o genotipagem foi utilizado o Analisador Genético ABI 3500XL (Appliedbiosystems). O comprimento de banda de cada alelo foi determinado através do tamanho padrão do GeneScan TM – LIZ® com auxílio do programa Genemapper® (Appliedbiosystems)

Com os dados obtidos da distância genética foi feito um dendrograma (Neighbor-joining). A análise de agrupamento foi realizada utilizando o programa Past e o método do vizinho mais próximo (HAMMER et al., 2001).

3. Resultados

Os 96 acessos genotipados com cinco locos microssatélites distribuíram-se em seis diferentes grupos (a maioria dos acessos) ou ficaram sobre a linha de base do dendrograma (Figura 1). Observa-se que o dendrograma construído com esse conjunto de dados apresenta baixa resolução (muitos genótipos não diferenciados em grupos). De fato, os estudos de diversidade do cacauero devem ser realizados com maior número de marcadores. Em todo caso, esses dados preliminares evidenciam que há diversidade entre os materiais analisados por causa da formação dos seis grupos.

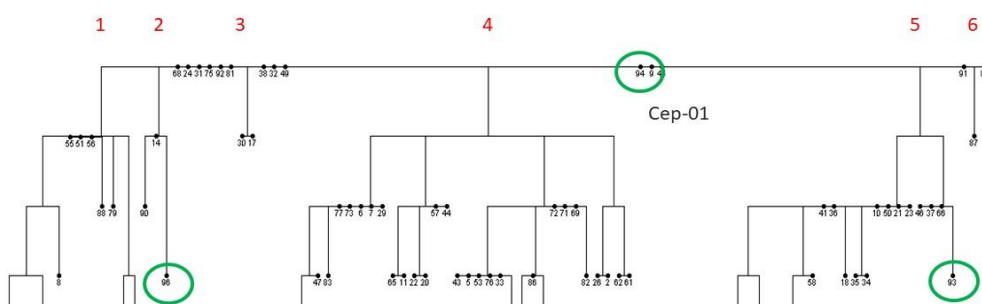


Figura 1. Agrupamento da população de plantas de acordo com os dados de genotipagem de 95 plantas com os cinco locos microssatélites.

Dentre os indivíduos distribuídos nos 6 grupos diferentes da população, encontram-se identificados os cacauzeiros Jaca, CCN51, Sca6 e Cep1. Em futuros estudos com uma genotipagem mais abrangente, maior número de locos e maior número de plantas, será possível fazer a análise estatística de associação para checar a hipótese de associação desses marcadores com a resistência à murcha de *Ceratocystis*.

No grupo quatro foi onde a maior quantidade de acessos foi agrupada, porém nem um controle foi agrupado nesse grupo, isto pode indicar que são plantas que apresentam maiores distâncias genéticas com os genótipos controles utilizados nesta pesquisa. No grupo cinco, muitos acessos também foram agrupados juntos com o controle Sca6, isso pode indicar que este grupo possui acessos que apresentam maior proximidade genética com Sca6..

Dentre os 119 acessos utilizados no capítulo anterior, um total de 27 acessos faltam de ser genotipados e adicionados às análises moleculares.

4. Discussões e perspectivas

Os resultados apresentados neste capítulo são preliminares. Por exemplo, o dendrograma ainda não distingue claramente todos os indivíduos em

grupos. Para melhorar a destinação dos grupos, um número maior de primers deverá ser utilizado. Além disso, não envolveu todos os indivíduos amostrados, uma vez que as primeiras amplificações revelaram alguns DNA com amplificação limitada. Adicionalmente, análises estatísticas adicionais serão realizadas para testar a hipótese de validação de QTL previamente identificados na literatura, visando detectar se essa população amostrada apresenta polimorfismo nessas regiões de QTL.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO M, ALGER K, ROCHA R, MESQUITA CAB. A Mata Atlântica do sul da Bahia: situação atual, ações e perspectivas. Costa JPO, Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. MAB UNESCO, 1998.

BARTLEY BGD. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford. CABI Publishing, 2005.

CRESTE S, TULMANN NETO A, FIGUEIRA A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reports*, v.19 p.299–306, 2001.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v.4, n.1, p. 1- 9, 2001.

FALEIRO F.G, QUEIROZ V.T, LOPES U.V, GUIMARAES C.T, PIRES J.L, YAMADA M.M, ARAUJO I.S, PEREIRA M.G, SOUZA F.G.A, BROWN J.S, SCHNELL R, FERREIRA C.F, BARROS E.G, MOREIRA M.A. Mapeamento genético molecular do cacauzeiro (*Theobroma cacao*) e QTLs associados a resistência a *vassoura-de-bruxa*. *Euphytica*, v.149, p.227–235, 2006.

FARIA D, PACIENCIA M.L.B, DIXO M, LAPS R.R, BAUMGARTEN J. Ferns, frogs, lizards, birds and bats in forest fragments and shade cacao plantations in

two contrasting landscapes in the Atlantic forest, Brazil. *Biodivers Conserv*, v.16, p.2335-2357, 2007.

LANAUD C, FOUET O, CLEMENT D, BOCCARA M, RISTERUCCI AM, SURUJDEO MAHARAJ S, LEGAVRE T, ARGOUT X, A meta-QTL analysis of disease resistance traits of *Theobroma cacao* L. *Mol Breed*, v.24 p.361–374, 2009.

PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460, 2012.

PRITCHARD J.K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v.155, p.945-959, 2000

PUGH T, FOUET O, RISTERUCCI A.M, BROTTIER P, ABOULADZE M, A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical Applied Genetics*, v.108, p.1151–1161, 2004.

SAMBUICHI R.H.R. Estrutura e dinâmica do componente arbóreo em área de cabruca na região cacauieira do sul da Bahia, Brasil. *Acta botanica Brasiliensis*, v.20, p.943-954, 2006.

SANTOS E.S.L, CERQUEIRA-SILVA C.B.M, GUSTAVO M, MORI G.M, AHNERT D MELLO D.L.N, PIRES J.L, CORRÊA R.X, SOUZA A.P. Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic, History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil, *Plos one*, v.10, p.1371, 2015.

SANTOS M.F.R. LOPES V.U. SILVA D.V.M.S. MICHELI F, CLEMENT D, GRAMACHO K.P. Identification of quantitative trait loci linked to *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. *Mol Breeding*, v.30, p. 1563-1571, 2012.

VELLO F, GARCIA J.R, MAGALHÃES W.S. Produção e Seleção de Híbridos na Bahia. Theobroma, v.2, p.15-35, 1972.

VELLO F, GARCIA JR. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. Theobroma, v.1, p.3-10, 1971.

CONCLUSÃO GERAL

Pode se concluir que os métodos de inoculação de cacauzeiros com *Ceratocystis cacaofunesta*, revisados a partir da literatura, podem se adaptar melhor a algumas situações de pesquisa que outros. Tomado como prioridade o tempo de obtenção de dados e o material necessário para ser realizado, os métodos que empregam discos de folhas e ramos destacados são mais adequados. Para análises moleculares dos efeitos diretos do fungo no caule e na raiz, os métodos que empregam mudas obtidas por estacas enraizadas ou miniestaquia são os mais apropriados.

Com tudo isso em conta recomendasse que para a seleção de genótipos resistentes que pousam formar parte de um programa de melhoramento o mais indicado poderia ser o uso de pelo menos dos métodos de avaliação, podendo usar os métodos desenvolvidos por Soria & Zalazar (1965) ou Magalhaes et al. (2016) para uma pré-seleção dos genótipos candidatos a formar parte de um programa de melhoramento, posteriormente utilizar os métodos desenvolvidos por Echandi (1965), Silva et al. (2005) e Magalhaes et al. (2015) para avaliar aqueles genótipos que já foram previamente selecionados.

Da população avaliada nesta pesquisa para resistência a *C. cacaofunesta* pode se concluir que existem acesos que apresentam um maior nível de resistência que os genótipos usados como controles (Jaca e CCN-51). Dentre as variedades locais amostradas, a variedade denominada Maranhão (MA) é a mais promissora para formar parte de um programa de melhoramento, pois apresentou o maior números de acesos classificados como resistentes, porém as outras duas variedades testadas, Comum (CO) e Pará (PA), não devem ser deixadas de lado pois também possuem acesos classificados como resistente que podem formar parte de um programa de melhoramento.

REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES
(RELATIVAS À REVISÃO DE LITERATURA)

AIME, M.C, PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, v. 97, p. 1012-22, 2005.

ALLEGRE M, ARGOUT X, BOCCARA M, FOUET O, ROGUET Y, BERARD A, et al. Discovery and mapping of a new expressed sequence tag-single nucleotide polymorphism and simple sequence repeat panel for large-scale genetic studies and breeding of *Theobroma cacao* L. *DNA Research*, v.19, p. 23-35, 2012.

ALMEIDA, L.C.C, COSTA, A.Z.M, LOPES, J.R.M. & BEZERRA, J.L. Distribuição geográfica da murcha-de-ceratocystis do cacauero na Bahia, Brasil. *Agrotrópica*, v.17, p.83-86, 2005.

AL-SADI AM. Histological changes in mango seedlings following infection with *Ceratocystis manginecans*, the cause of mango decline. *Journal of Phytopathology*, v.158, p.738-43, 2010.

ALVES, A.A, GUIMARÃES, L.M.S, CHAVES, A.R.M, DAMATTA, F.M., ALFENAS, A.C. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologica*, V.33, p.1831-1839, 2011.

ANTONIO, G.L, DONATO, R.L, IOSSI, M.R, FIRMINO, A.C. Ação de indutores de resistência em cacauero infectados com *Ceratocystis cacaofunesta*. *Summa Phytopathologica*, v.45, p.104-106, 2019.

ARAUJO, L, BISPO, W.M.S, CACIQUE, I.S, CRUZ, M.F.A, RODRIGUES, F.A. Histopathological aspects of mango resistance to the infection process of *Ceratocystis fimbriata*. Plant Pathology, V.63, p.1282-1295, 2014.

BAIER P, FUHRER E, KIRISITS T, ROSNER S. Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus *Ceratocystis polonica* in secondary pure and mixed speciesstands. For Ecol Manage, v.159, p.73-86, 2002.

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, V.93, p.1274-1284, 2003.

BAKER, C. J, HARRINGTON, T. C. *Ceratocystis fimbriata*. In: Crop protection compendium. Kew: CABI Publishing, 2004.

BALESDENT M-H, et al. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards Brassica rapa. New Phytologist, v.198, p.887-98, 2013.

BARBA, C. Estudio morfológico y pruebas de patogenicidad de varias cepas de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. Tesis M. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, p.59, 1961.

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, v.2, p.319-325. 2001.

BASTOS C.N, EVANS H.C. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. na região Amazônica Brasileira. Acta Amazônica, v.8 p.543-544, 1978.

BATISTA D.C, TERAO D, BARBOSA M.A.G, BARBOSA F.R. Seca da mangueira: detecção, sintomatologia e controle. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v.138. 2008.

BEAVER R.A. Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles. London: Academic Press, p. 121-43, 1989.

BECKMAN C.H. The nature of wilt diseases of plants. APS Press, St. Paul, p.175, 1987.

BECKMAN C.H, TALBOYS P.W. Anatomy of resistance. Fungal wilt diseases of plants. Academic Press, New York, pp 487-521, 1981

BERGER, S, SINHA, A.K, ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. Journal of Experimental Botany, v.58, p.4019-4026, 2007.

BERNALES, G.R.K. Remoción de tejidos enfermos y la aplicación de *Trichoderma* sp., para el control de Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif. & Par) y Escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso* (Stahel Singer) del Cacao (*Theobroma cacao* L.) en Tarapoto - San Martín. 2001.

BEZERRA J. L. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. Incoped Newsl, v.1, p.6. 1997.

BISPO W.M.S, ARAUJO L, CACIQUE, I.S, DAMATTA F.M, RODRIGUES, F.A. Photosynthesis impairments precede noticeable changes in leaf water status of mango plants infected by *Ceratocystis fimbriata*. Plant Pathology, v.146, p.419-433, 2016.

BOONE C.K, AUKEMA B.H, BOHLMANN J, CARROLL A.L, RAFFA K.F (2011) Efficacy of tree defense physiology varies with bark beetle population density: a basis for positive feedback in eruptive species. Canadian Journal of Forest Research, v.41, p.1174-1188, 2011.

BOWDEN R.L, ROUSE D.I, SHARKEY T.D. Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahlia* in potato. Plant Physiology, v.94, p.1048-1055, 1990.

CLÉRIVET A, DÉON V, LOPEZ I.A.F, JEAN-PAUL GEIGER J.P, MICHEL N, Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are

responses of plane tree seedlings (*Platanus X acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* Trees. ResearchGate, v.15 p.25-31, 2000.

Cabrera OG, et al. *Ceratocystis* wilt pathogens: history and biology—highlighting *C. cacaofunesta*, the causal agent of wilt disease of cacao. In: Bailey AB, Meinhardt WL, editors. Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters. Cham. Springer International Publishing, p. 383-428, 2016.

CARVAJAL J.E.V, ROSERO S.E.V, OROZCO W.L.V. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, v.68, p.7441-7450, 2015.

CHEN G, GENG JF, RAHMAN M, LIU XP, TU JX. Identification of QTL for oil content, seed yield, and flowering time in oilseed rape (*Brassica napus*). Euphytica, v.175, p.161-174, 2010.

CHRISTIANSEN E. *Ceratocystis polonica* inoculated in Norway spruce: blues taining in relation to inoculum density, resinosis and tree growth. Forest Pathology, v.15, p.160-167, 1985.

CHRISTIANSEN E, BAKKE A. The spruce bark beetle of Eurasia. In: Dynamics of forest insect populations: patterns, causes, implications. Plenum Press, New York, 1988

CHRISTINE J. BAKER ENGELBRECHT THOMAS C. HARRINGTON. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore Mycologia, v.97, p. 57-69, 2005.

ENGELBRECHT C.J, HARRINGTON T.C, ALFENAS A. *Ceratocystis* Wilt of Cacao A Disease of Increasing Importance. Phytopathology, v.97, p.1648-1649. 2007.

CLÉRIVET A, EL MODAFAR C. Vascular modifications in *Platanus acerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. Eur J For Pathol, v.24, p.1-10, 1994.

CLÉRIVET A, DÉON V, ALAMI I, LOPEZ F, GEIGER J.P, NICOLE M. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus x acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *Trees*, v.15, p.25-31, 2000.

COLEMAN J.J, WHITE G.J, RODRIGUEZ-CARRES M, VANETTEN H.D. An ABC transporter and a cytochrome P450 of *nectria haematococca* MPVI Are virulence factors on Pea and Are the major tolerance mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, v.24, p.368, 2011.

COOPER R.M, FLOOD J, ROWAN M.G, RESENDE MLV, BEALE M.H. The role of tannins and phytoalexins in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Verticillium dahliae*. *Aspects of applied biology, Physiological responses of plants to pathogens*, University of Dundee, p.315-322, 1995.

COOPER R.M, RESENDE M.L.V, FLOOD J, ROWAN M.G, BEALE M.H, POTTER U. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature*, v.379 p.159-162, 1996

CORRÊA E.B, KUPPER K.C, GOES A. Controle biológico da podridão radicular em plantas de limão cravo. *Citrus Research & Technology*, v.32, p.127-132, 2011.

COSTA J.C.B, BEZERRA J.L, VELOSO J.L.M, NIELLA G.R, BASTOS C.N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero. In: Venzon, M.; Paula J.R., T.J.; Pallini, A. *Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças*. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema Gráfica e Editora Ltda, v.1, p.25-48. 2006.

CUATRECASAS J. *Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus Theobroma*. Washington: U.S. National Museum, 1964.

DE MICCO V, BALZANO A, WHEELER EA, BAAS P. Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *Iawa Journal*, v.37, p.186-205, 2016.

DELGADO R, & SUÁREZ C. Diferencias em agressividade entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil em cacao. In XII Seminário Nacional de Sanidad Vegetal. Latacunga, Ecuador, v.8, p.19-21, 2003.

DIAS, L. A. S. Melhoramento genético do cacaueiro. Viçosa-MG. FUNAPE, p.578, 2001.

DOKE N, MIURA Y, SANCHEZ L.M, PARK H-J, NORITAKE, T, YOSHIOKA H, KWAKITA K. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence a review. *Gene*, v.179, p.45-51, 1996.

DOMICIANO G.P, RESENDE R.S, RODRIGUES F.A, DAMATTA F.M. Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. *Revisões Anualde Patologia de Plantas*, v.17, p.305-309, 2009.

DUCHESNE L.C, HUBBES M, JENG R.S. Biochemistry and molecular biology of defense reactions in the xylem of angiosperm trees. In: Blanchette RA, Biggs AT, eds. *Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi*. Springer-Verlag, p.133-42. 1993.

ECKHARDT L.G, MENARD R.D, GRAY E.D. Effects of oleoresins and monoterpenes on in vitro growth of fungi associated with pine decline in the Southern United States. *Forest Pathology*, v.39, p.157-167, 2009.

MOLANO E.P.L, CABRERA O.G, NASCIMENTO L.C , CARAZZOLLE M.F, PAULO JOSÉ PEREIRA LIMA TEIXEIRA P.J.P.L, ALVAREZ J.C, ET AL. *Ceratocystis cacaofunesta* genome analysis reveals a large expansion of extracelular phosphatidylinositol-specific phospholipase-C genes (PI-PLC) Molano et al. *BMC Genomics*, v.19, p.58, 2018.

EL MODAFAR C, CLÉRIVET A, FLEURIET A, MACHEIX J.J. Inoculation of *Platanus acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* f. sp *platani* induces scopoletin and umbelliferone accumulation. *Phytochemistry*, v.34, p.1271-1276, 1993.

EL MODAFAR C, CLÉRIVET A, MACHEIX J.J. Flavan accumulation in stems of *Platanus x acerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis fimbriata* f. sp *platani*,

the canker stain disease agent. Canadian Journal Botany, v.74, p.1982-1987. 1996.

ENGELBRECHT C.J, HARRINGTON T.C, STEIMEL J, CAPRETTI P. Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. platani. Molecular Ecology, v.13, p.2995-3005, 2004.

ENGELBRECHT C.J.B, HARRINGTON T.C. Intersterility, morphology, and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao, and sycamore. Mycologia, v.97, p.57-69, 2005.

ENGELBRECHT C.J.B, HARRINGTON T.C, ALFENAS A.C, SUAREZ C. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. Plant Pathology, v.56, p.923-933, 2007.

ENGELBRECHT C.J.B, HARRINGTON T.C, STEIMEL J, CAPRETTI P. Genetic variation in eastern north American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. platani. Molecular Ecology, v.13, p.2995-3005, 2004.

ENGELBRECHT C.J.B, HARRINGTON T.C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia, v.97, p.57-69, 2005

ENGELBRECHT C.J.B, HARRINGTON T.C, ALFENAS A.C, SUAREZ, C. Genetic variation of populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. Plant Pathology. 2007.

EVENSEN P.C, SOLHEIM H, HOILAND K, STENERSEN J. Induced resistance of Norway spruce, variation of phenolic compounds and their effects on fungal pathogens. Forest Pathology, v.30 p.97-108, 2000.

FACCOLI M. Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern Alps. Environ Entomol, v.38, p.307-316, 2009.

FALEIRO A.S.G, FALEIRO F.G, LOPES U.V, MELO G.R.P, MONTEIRO W.R, YAMADA M.M, BAHIA R.C, CORRÊA R.X. Diversidade genética de acessos de

Theobroma cacao L. selecionados por produtores para a resistência à vassoura-de-bruxa com base em marcadores microssatélites. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.290-297, 2004.

FALEIRO F.G, QUEIROZ V.T, LOPES U.V, GUIMARÃES C.T, PIRES J.L, YAMADA M.M, ARAÚJO I.S, PEREIRA M.G, SOUZA FILHO G.A, BROWN J.S, SCHNELL R, FERREIRA C.F, BARROS E.G, MOREIRA M.A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis pernicioso*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*, v.149, p.227-235, 2006.

FIRMINO A.C, FURTADO E.L. Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis* spp. *SciELO*, v.40, p.371-374, 2014.

FLICK J.S, THORNER J. Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, v.13, p.61-76, 1993.

FRANCESCHI V.R, KROKENE P, CHRISTIANSEN E, KREKLING T. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytology*, v.167, p.353-375, 2005.

GIESE E.G, COVIZZI L.G, DEKKER R.F.H, BARBOSA A.M. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum: biological sciences*, v. 26, p. 463-470, 2004.

GRAMACHO, I. DA C. P.; MAGNO, A. E. DE S.; MANDARINO, E. P.; MATOS, A. Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. CEPLAC. Ilhéus-BA-Brasil, 1992.

GRATTAPAGLIA D, GENOLYPTUS I.N, BOREM A, GIUDICE M, SEDIYAMA T. Melhoramento genético. Viçosa MG. UFV. p.51-71, 2004.

GRIFFITH O.H, RYAN M. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochimica Biophysica Acta*, v.1441, p.237-54. 1999.

HARRINGTON T.C, THORPE D.J, ALFENAS A.C. Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, v.101, p.555-66, 2011.

HARRINGTON T.C. Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasil*, v.25, p.262-263, 2000.

HORNTVEDT R, CHRISTIANSEN E, SOLHEIM H, WANG S. Artificial inoculation with *Ips typographus*-associated blue-stain fungi can kill healthy Norway spruce trees (*Ceratocystis polonica*, *Ceratocystis penicillata*, water stress). *NIBIO Norsk Institutt For Bioekonomi*, v.38, p.1-20, 1983.

IOANNOU N, SCHENEIDER R.W, GROGAN R.G. Effect of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth, sporulation and production of microsclerotia by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, v.67, p.645-50, 1977.

JIANG C, ZENG Z. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, v.140, p.1111-1127, 1995.

JOHNSON J.A, HARRINGTON T.C, AND ENGELBRECHT C.J.B. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Mycologia*, v.97, p.1067-1092, 2005

KEELING C.I, BOHLMANN J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, v.170, p.657-675, 2006.

KIM K.T, JEON J, CHOI J, CHEONG K, SONG H, CHOI G, LEE Y. H. Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Frontiers in plant science*. Ghannoum, Mahmoud A. "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis." *Clin Microbiol Rev*, v.13, p.122-143, 20016.

KROKENE P, NAGY N.E, KREKLING T. Traumatic resin ducts and polyphenolic parenchyma cells in conifers. Schaller A (ed) *Induced plant resistance to herbivory*. Springer, p.147-169, 2008.

KROKENE P, SOLHEIM H. What do low-density inoculations with fungus tell us about fungal virulence and tree resistance. Lieutier F, Mattson WJ, Wagner MR (eds) Physiology and genetics of tree-phytophage interactions INRA editions. Versailles, France, p.353-362, 1999.

LANAUD C, RISTERUCCI A.M, N'GORAN A.K.J, CLEMENT D, FLAMENT M.H, LAURENT V, et al. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. Theoretical and Applied Genetics, v.91, p.987-93, 1995.

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

LEONOWICZ A, CHO N.S, LUTEREK J, WILKOLAZKA A, WOJTAS-WASILEWSKA M, MATUSZEWSKA A, HOFRICHTER M, WESENBERG, D, ROGALSKI J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. Journal Basic Microbiology, v.41, p.185-227, 2001.

LI S.H, NAGY N.E, HAMMERBAC.A, KROKENE P, NIU X.M, GERSHENZON J, SCHNEIDER B. Localization of phenolics in phloem parenchyma cells of Norway spruce (*Picea abies*). Chembiochem: Europran Journal Chemical Biolbiology, v.18, p.2707-2713, 2012.

LIEUTIER F, YART A, SALLE A. Stimulation of tree defenses by ophiostomatoid fungi can explain attack success of bark beetles on conifers. Annals of Forest Science, v.66, p.1-22, 2009.

LIU B.H. *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. New York: CRC Press, p.611, 1998

LO P.L. Fungal effectors and plant susceptibility. Annual Review Plant Biology, v.66, p.513-45, 2015.

LORENZINI G, GUIDI L, NALI C, CIOMPI S.C, SOLDATIN G.F. Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. Plant Science, v.24, p.143-152, 1997.

LU M, WINGFIELD M.J, GILLETTE N.E, MORI S.R, SUN J-H. Complex interactions among host pines and fungi vectored by an invasive bark beetle. *New Phytology*, v.187, p.859-866, 2010.

MA L-J. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, v.464, p.367-73, 2010.

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 and pathogenicity. *Phytopathol*, v.151, p.395-405, 2003.

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 and pathogenicity. *Phytopathol*, v.151, p.395-405, 2003.

MARTENS S, MITHÖFER A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, v.66, p.2399-2407, 2005.

MATA S.N. Métodos de inoculación de *Ceratocystis fimbriata* e Evaluación de Resistencia en Cacao. Graduation Thesis, Universidad de Costa Rica, v.85, 1991.

MAZÓN M, DÍAZ F, GAVIRIA J.C. Effectiveness of different trap types for control of bark and ambrosia beetles (Scolytinae) in Criollo cacao farms of Mérida, Venezuela. *International Journal of Pest Management*, v.59, p.189-96, 2013.

MCELDRONE A.J, FORSETH I.N. Photosynthetic responses of a temperate liana to *Xylella fastidiosa* infection and water stress. *Exp. Bot*, v.63, p.1593-1608, 2004.

MENGISTE T. Plant immunity to necrotrophs. *Annual Review Phytopathology*, v.50, p.267-294, 2012.

- MIÑO C. Determinación de resistencia de 250 clones de cacao de origen nacional al ataque de mal del machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted). Tesis Ing. Agr. Guayaquil, Ecuador, Universidad Agraria del Ecuador, p.71, 1994.
- MOTAMAYOR, J.C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, v.89, p.380-386, 2002.
- MOTAMAYOR J.C, RISTERUCCI A.M, HEATH M, LANAUD C. Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* v.91, p.322-330, 2003.
- NOGUÉS S, COTXARRERA L, ALEGRE L, TRILLAS M.I. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist*, v.154, p.461-470, 2002.
- OLIVEIRA B.F, SILVA S.D.V.M, DAMACENO V.O, SANTOS FILHO L.P. Identificação de fontes de resistência a *Ceratocystis cacaofunesta* em mudas de cacauero. *Agrotropica*, v.21, p.83-88, 2009.
- OLIVEIRA B.F, SILVA S.D.V.M, SANTOS M.V.O. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a patógenos do cacauero. *Agrotropica*, v.25, p.117-120, 2013.
- OUELLETTE G.B, RIOUX D. Anatomical and physiological aspects of resistance to Dutch elm disease. In: Blanchette A, Biggs A (eds) *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Springer, p.257-307, 1992.
- PASCHOLATI S.F, LEITE B, STANGARLIN J.R, CIA P. Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba, v.1, p.627, 2008.
- PASCUAL I, AZCONA I, MORALES F, AGUIRREOLEA J, SÁNCHEZ-DÍAZ M. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. *Plant Physiology*, v.167, p.701-708, 2010.
- PAZZAGLI L, CAPPUGI G, MANAO G, CAMICI G, SANTINI A, SCALA A. Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatanin, a new

phytotoxi protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.24959-24964, 1999.

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

PINKARD E.A, MOHAMMED C.L. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist*, v.170, p.119-127, 2006.

Pinto L.R.M, Pires J.L. Seleção de plantas de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. CEPLAC/CEPEC, Ilhéus, *Boletim Técnico* v.181, p.34, 1998.

PUGH T, FOUET O, RISTERUCCI A.M, BROTTIER P, ABOULADZE M, DELETREZ C, et al. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, p.1151-61, 2004.

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

RAFFA K.F, AUKEMA B.H, BENTZ B.J, CARROLL A.L, HICKE J.A, TURNER M.G, ROMME W.H. Cross-scale drivers of natural disturbances prone to anthropogenic amplification: the dynamics of bark beetle eruptions. *Bioscience*, v.58, p.501, 2008.

RAGONHA F. Construção de mapas genéticos em espécies de polinização aberta: Uma abordagem Bayesiana com o uso de uma priori informativa. 2005. 149f. Dissertação (Mestrado em Experimentação Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

RAM A, VALLE R.R.M, FREITAS D.B. Controle de cancro ou murcha de *Ceratocystis* do cacauero na Bahia, Brasil. *Agrotropica*, v.16, p.111-114, 2004.

RENE R. Control de las principales enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) com tres especies de seca de *Trichoderma* y oxido cuproso. 2003. 110f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica)- Instituto Agrícola, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo Maria.

RESENDE M.L.V, FLOOD J, RAMSDEN J.D, ROWAN M.G, BEALE M.H, COOPERRM. Novel phytoalexins including elemental sulphur in the resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.48, p.347-359, 1996.

RIBEIRO I.J.A. Doenc_as da mangueira (*Mangifera indica* L). Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo, Brazil: Agrônômica Ceres, v.65, p.457, 2005.

RIBEIRO I.J.A, ROSSETTO C.J, SABINO J.C, GALLO P.B. Seca da mangueira: VIII. Resistencia de porta-enxertos de mangueira ao fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. *Bragantia*, v.45, p.317-22. 1986.

RIBEIRO R.V, MACHADO E.C, OLIVEIRA R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.62, p.167-173, 2003.

RISTERUCCI A.M, GRIVET L, N'GORAN J.A.K, PIERETTI I, FLAMENT M.H, LANAUD C. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v.101, p.948-55, 2000.

RODRIGUES G.S, MAGALHÃES D.M.A, COSTA A.M, LUZ E.D.M.N. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauero. *Summa Phytopathologica*, v.44, p.72-78, 2018.

Santos R.M.F, Silva S.D.V.M, Sena K, Micheli F, Gramacho K,P. Kinetics and Histopathology of the Cacao *Ceratocystis cacaofunesta* Interaction. *Tropical Plant Biology*, v.6, p,37-45, 2013.

ROJAS C.M, SENTHIL-KUMAR M, TZIN V, MYSORE K.S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontier in Plant Science*, v.5, p.1-12, 2014.

SAEED I.M.A, MCGUIDWIN A.E, ROUSE D.I, SHARKEY T.D. Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* infected potato. *Crop Science*, v.39, p.1340-1346, 1999.

SALLE A, MONCLUS R, YART A, GARCIA J, ROMARY P, LIEUTIER F. Fungal flora associated with *Ips typographus*: frequency, virulence, and ability to stimulate the host defence reaction in relation to insect population levels. *Canadian Journal of Forest Research*, v.35, p.365-373, 2005.

SALYERS A, WITT D. Virulence factors that promote colonization. In: Salyers A, Witt D. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, p.30-46, 1994.

SANCHES C.L.G, PINTO L.R.M, POMELLA A.W.V, SILVA S.D.V.M, LOGUERCIO L.L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, v.122, p.517-528, 2008.

SANTOS R.M.F. Kinetics and histopathology of the cacao-*Ceratocystis cacaofunesta* interaction. *Tropical Plant Biology*, v.6, p.37-45, 2013.

SCHIEBE C, HAMMERBACHER A, BIRGERSSON G, WITZELL J, BRODELIUS P.E, GERSHENZON J, HANSSON B.S, KROKENE P, SCHLYTER F. Inducibility of chemical defenses in Norway spruce bark is correlated with unsuccessful mass attacks by the spruce bark beetle. *Oecologia*, v.170, p.183-198, 2012.

SHTIENBERG D. Effects of foliar disease on gas exchange process: a comparative study. *Phytopathology*, v.82, p.760-765, 1992.

SILVA S.D.V.M, PAIM M.C.A, CASTRO W.M. Cacao Jaca resistente a *Ceratocystis fimbriata* na região cacauera da Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.538-540, 2004.

SILVA A.C, FERREIRA D.C, BETANCOURTH B.M.L, ABREU M.C, MILAGRE J.C, FERRAZ H.G.M, ALFENAS A.C. Ultrastructural analysis of the interaction *Ceratocystis fimbriata* eucalyptus. *Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina*, v.47, 2014.

SILVA A.C, SILVA F.M.O, MILAGRE J.C, OMENA-GARCIA P.R, ABREU M.C, MAFIA R.G, NUNES-NESI A, ALFENAS A.C. Eucalypt plants are physiologically and metabolically affected by infection with *Ceratocystis fimbriata* *Plant Physiology and Biochemistry*. v.123, p.170-179, 2018.

SILVA S.D.V.M, PAIM, M.C, CASTRO W.M. Cacau 'Jaca' Resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacaueira da Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.538-540, 2004.

SIX D.L, WINGFIELD M.J. The role of phytopathogenicity in bark beetle-fungus symbioses: a challenge to the classic paradigm. *Annual Review of Entomology*, v.56, p.255-272, 2011.

SOANES D.M, ALAM I, CORNELL M, WONG HM, HEDELER C, PATON N.W, RATTRAY M, HUBBARD S.J, OLIVER S.G, TALBOT N.J. Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. *PLoS One*, v.3, p.2300, 2008

SOLHEIM H. Species of Ophiostomataceae isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographicus*. *Nordic Journal Botany*, v.6, p.199-207, 1986.

SOLHEIM H. Oxygen deficiency and spruce resin inhibition of growth of blue stain fungi associated with *Ips typographicus*. *Mycological Research*, v.95, p.1387-1392, 1991.

SOUZA C.A.S, DIAS L.A.S. Melhoramento ambiental e sócio-economia. Melhoramento genético do cacaueiro. Editora Folha de Viçosa Ltda, Viçosa. P.1-47, 2001.

SPENCE J.L. Preliminary observations on a wilt condition of cocoa. *J Agric Soc Trinidad and Tobago*, v.58, p.349-359, 1958.

STEIMEL J, ENGELBRECHT C. J. B, AND HARRINGTON T. C. Development and characterization of microsatellite markers for the fungus *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Ecology Notes*, v.4, p.215-218, 2004.

SILVA S.D.V.M, MANDARINO E.P, DAMACENO V.O, SANTOS FILHO L.P. Reação de genótipos de cacaueiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. Fitopatologia Brasileira, v.32, p.504-506, 2007.

SUN M.Y, HUA W, LIU J, HUANG S.M, WANG X.F, et al. Design of new genome- and gene-sourced primers and identification of QTL for seed oil content in a specially high-oil *Brassica napus* cultivar. PLoS one, v.10, p.47037, 2012.

TALBOYS P.W. A discussion on disease resistance in plants. Proc R Soc Lond, v.181, p.319-332, 1972.

THOROLD C.A Diseases of cocoa. XIIth edition. Oxford. Clarendon Press, p.423, 1975.

VANDERMOLEN G.E, BECKMAN C.H, ROHEHORST E. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Physiology Plant Pathology, v.31, p.185-200, 1987.

VIEIRA D. VALLE R.R. Indução de resistência sistêmica para o controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer em cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) dos clones ICS 1 e CCN 51. 15^o Conferência Internacional de Pesquisas em Cacau, São José, Costa Rica, 2006.

VIIRI H, ANNILA E, KITUNEN V, NIEMELA P. Induced responses in stilbenes and terpenes in fertilized Norway spruce after inoculation with blue-stain fungus, *Ceratocystis polonica*. Trees, v.15, p.112-122, 2001.

WANG, X. Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici* reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. BMC Genomics, v.16, p.28, 2015.

WERMELINGER B. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* review of recent research. Forest Ecology Management, v.202, p.67-82, 2004.

WILKEN P.M, STEENKAMP E.T, WINGFIELD M.J, DE BEER Z.W, WINGFIELD B.D. DNA loss at the *Ceratocystis fimbriata* mating locus results in self-sterility. PLoS One, v.9, p.92180, 2014.

WILLIAMS A.H. Comparative genomics and prediction of conditionally dispensable sequences in legume-infecting *Fusarium oxysporum* formae speciales facilitates identification of candidate effectors. BMC Genomics. v.17, p.191, 2016.

WITTHUHN R.C, HARRINGTON T.C, WINGFIELD B.D, STEIMEL J.P, WINGFIELD M.J. Deletion of the MAT-2 mating-type gene during uni-directional mating-type switching in *Ceratocystis*. Current Genetics, v.38, p.48-52, 2000.

WU R, MA C. X, PAINTER I, ZENG Z. B. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species. *Theoretical Population Biology*, Saint Louis, v.61, p.349-363, 2002.

ZHAO J.Y, HUANG J.X, CHEN F, XU F, NI X.Y, et al. Molecular mapping of *Arabidopsis thaliana* lipid-related orthologous genes in *Brassica napus*. Theor Appl Genetics, v.124, p.407-421, 2012.

ZHAO T, KROKENE P, BJORKLUND N, LANGSTROM.B, SOLHEIM H, CHRISTIANSEN E, BORG-KARLSON A.K. The influence of *Ceratocystis polonica* inoculation and methyl jasmonate application on terpene chemistry of Norway spruce, *Picea abies*. Phytochemistry, v.71, p.1332-1341, 2010.

ZHAO T, KROKENE P, HU J, CHRISTIANSEN E, BJORKLUND N, LANGSTROM B, SOLHEIM H, BORG-KARLSON A.K. Induced terpene accumulation in Norway spruce inhibits bark beetle colonization in adose-dependent manner. PLoS ONE, v.6, p.26649, 2011.

ZIVKOVIĆ S, STOJANOVIĆ S, IVANOVIĆ Ž, VELJKO G, POPOVIĆ T, BALAŽ J.S. Screening of antagonist activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Biological Sciences, Belgrade, v.62, p.611-623, 2010.

ZULAK K.G, BOHLMANN J. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.52, p.86-97, 20