

## Notas Científicas

### Identificação de resistência genética do cacaueteiro à podridão-parda

Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>(1)</sup>, Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva<sup>(1)</sup>,  
Didier Pierre Louis Clement<sup>(2)</sup> e Edna Dora Martins Newman Luz<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Salobrinho, CEP 45662-000 Ilhéus, BA. E-mail: elisalisboa@yahoo.com.br, cerqueirasilva1@yahoo.com.br <sup>(2)</sup>Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Avenue d'Agropolis, 34398, Cedex 5, Montpellier, France. E-mail: didier.clement@cirad.fr <sup>(3)</sup>Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Centro de Pesquisas do Cacau, Setor de Fitopatologia, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 12, Caixa Postal 07, CEP 45600-970 Itabuna, BA. E-mail: ednadora@yahoo.com.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi comparar métodos de caracterização da resistência do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) à podridão-parda (*Phytophthora palmivora*). Foram estudados os métodos escala de notas, índice de intensidade de infecção e índice de doença. Discos foliares de 103 genótipos receberam 0,2 mL de uma suspensão com  $3 \times 10^5$  zoósporos de *P. palmivora* por mililitro, e os sintomas foram avaliados pelos três métodos. Foram realizadas três avaliações (repetições) por genótipo, cada uma composta por 20 discos. O método do índice de doença foi o mais eficiente em caracterizar a resistência de genótipos de cacaueteiro a *P. palmivora*.

**Termos para indexação:** *Phytophthora palmivora*, *Theobroma cacao*, escala de notas, índice de doença, intensidade de infecção, patometria.

### Identification of cacao genetic resistance to black pod disease

**Abstract** – The objective of this work was to compare methods for characterizing the resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to black pod (*Phytophthora palmivora*). The methods of disease scores, intensity of infection index and disease index were evaluated. Leaf discs of 103 genotypes were infected with 0.2 mL of a suspension with  $3 \times 10^5$  zoospores of *P. palmivora* per milliliter, and symptoms were evaluated by the three methods. Three evaluations (replicates) composed by 20 discs each were carried out for every genotype. The disease index method was the most efficient to characterize the cacao resistance to *P. palmivora*.

**Index terms:** *Phytophthora palmivora*, *Theobroma cacao*, disease scores, index of disease, intensity of infection, pathometry.

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta de grande valor econômico em mais de 50 países (Sereno et al., 2006). Entretanto, a produção do cacau é limitada pela ocorrência de doenças (Dantas Neto et al., 2005), entre as quais se destaca a podridão-parda dos frutos ou podridão de *Phytophthora*. Essa enfermidade ocorre em todos os países produtores (Tahi et al., 2006) e pode ser considerada a mais importante da cacauicultura.

No Brasil, ocorrem as espécies *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. capsici*. No Estado da Bahia, essas espécies provocam redução na produção de cacau de até 80% (Luz et al., 2005).

A forma de controle da podridão-parda mais utilizada é a aplicação de fungicidas químicos. Contudo, a eficiência desses produtos não é satisfatória, e seu uso, além de acarretar aumento nos custos de produção, pode

causar danos ao meio ambiente (Tan & Tan, 1990). Uma alternativa de controle mais efetiva e econômica é a seleção genética de indivíduos resistentes (Nyassé et al., 2002).

Em programas de melhoramento, com vistas à resistência a doenças, é imprescindível a realização de estudos fitopatológicos para a caracterização e seleção de genótipos. Em geral, nesses estudos, usam-se chaves descritivas e índices de doença (Laranjeira, 2005). A eficiência desses métodos na caracterização da resistência genética tem sido estudada por diversos autores (McKinney, 1923; Czermainski, 1999; Cerqueira-Silva, 2009).

Para o patossistema cacaueteiro, em relação ao fungo *Phytophthora*, quando se adota o método de discos foliares, é comum o uso da escala de notas proposta

por Nyassé et al. (1995). Entretanto, não se encontram registros sobre a eficiência da utilização de índices de doença nesse patossistema, com essa metodologia de avaliação.

O objetivo deste trabalho foi comparar os métodos escala de notas, índice de intensidade de infecção e índice de doença para caracterização da resistência do cacaueiro à podridão-parda.

Foram utilizados 100 genótipos de cacaueiro oriundos de uma população segregante ( $F_2$  de Sca6 x ICS1), estabelecida em casa de vegetação, no Centro de Pesquisas do Cacau (Cepec/Ceplac), além dos clones Sca6 e ICS1 (progenitores) e o clone TSH516 (híbrido  $F_1$ ), que se encontram disponíveis no banco ativo de germoplasma do Cepec/Ceplac.

Empregou-se o método de disco foliar (Nyassé et al., 1995) para obtenção do gradiente de resistência dos 100 genótipos a *P. palmivora*. As folhas foram coletadas pela manhã, lavadas com água destilada e submetidas a cortes circulares de 1,5 cm de diâmetro, com auxílio de cortador semiautomático. Foram realizadas três avaliações (repetições) por genótipo, cada uma composta por 20 discos foliares. Esses discos foram acomodados em caixas forradas com espuma esterilizada úmida. Cada caixa continha discos de folhas de até 30 genótipos, dos quais 24 a 26 eram oriundos da população  $F_2$ , e os demais eram correspondentes aos clones Sca6, ICS1 e TSH516. Os discos foliares receberam inoculação na porção abaxial, com 0,2 mL de suspensão na concentração  $3 \times 10^5$  zoósporos por mililitro, obtida a partir de placas de cultura de *P. palmivora* com pelo menos cinco dias de idade. Aproximadamente 2.060 discos foliares receberam inoculação em cada repetição. As caixas com os discos foram fechadas, para manter umidade relativa em torno 100%, e acondicionadas a 25°C, por sete dias, ao abrigo de luz.

O progresso da doença foi avaliado por meio de três métodos patométricos descritos a seguir. Método da escala de notas (EN), que variou de 0 a 5, em que: 0, sem sintomas; 1, pequenos pontos marrons ou marrom-escuros; 2, pequenos pontos marrons com poucas conexões entre si; 3, pontos marrons coalescentes, que formam lesões de tamanho intermediário; 4, lesões grandes coalescentes, com pontos marrom-claros ou escuros; e 5, grandes lesões marrons expandidas uniformemente (Nyassé et al., 1995). Método do índice de intensidade de infecção (III), que variou

de 0 a 100, em que a fórmula e a transformação adotadas para análise foram descritas por Silva (1969) e generalizadas para escalas discretas ou quantitativas ordinais por Czermainski (1999). Método do índice de doença (ID), que variou de 0 a 1 e foi calculado de acordo com McKinney (1923). Os cálculos nos métodos III e ID foram realizados a partir dos escores (notas) atribuídos de acordo com a intensidade de sintomas, pela classificação proposta por Nyassé et al. (1995).

Os valores observados por meio dos métodos patométricos foram utilizados para se estimarem parâmetros descritivos, normalidade (teste Lilliefors), análises de variância, testes de comparação de médias Scott-Knott, a 5 e 1% de probabilidade, teste de correlações de Spearman e “bootstraps” com 10 mil reamostragens. Os valores obtidos pela EN foram divididos pela maior nota observada e, então, multiplicados por 100. Os valores obtidos pelo ID foram multiplicados por 100, tendo-se equiparado ao intervalo de 0 a 100 apresentado pelo III. Para normalização dos dados, adotou-se, de acordo com a indicação do teste Box-Cox, a transformação linear. As análises foram realizadas com auxílio dos programas BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2005) e SASM-Agri (Althaus et al., 2001).

Os resultados de agrupamento univariado dos genótipos quanto à reação à podridão-parda, obtido por meio dos três métodos, e a descrição dos resultados médios da severidade dos sintomas foliares estão apresentados na Tabela 1. Os três métodos permitiram identificar diferenças quanto à resistência dos genótipos à podridão-parda. Entretanto, números distintos de agrupamentos foram obtidos entre EN e os métodos III e ID. A diferença na eficiência dos métodos, em caracterizar a resistência dos cacaueiros, foi mais evidente quando se considerou o grau de significância a 1% de probabilidade (3, 5 e 6 agrupamentos, formados para EN, III e ID, respectivamente). A maior eficiência do uso de índices, em comparação com o uso de escalas de notas, na caracterização da reação de plantas a patógenos, foi demonstrada por outros autores, a exemplo da avaliação de patossistemas como trigo x *Helminthosporium sativum* (McKinney, 1923) e maracujazeiro x *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Cerqueira-Silva, 2009), ou da simulação de dados (Czermainski, 1999).

Foram observadas correlações significativas entre a severidade dos sintomas mensurados via EN e III, EN e ID, e III e ID (Figura 1). O fato de os métodos III e ID apresentarem alta correlação entre si e baixa

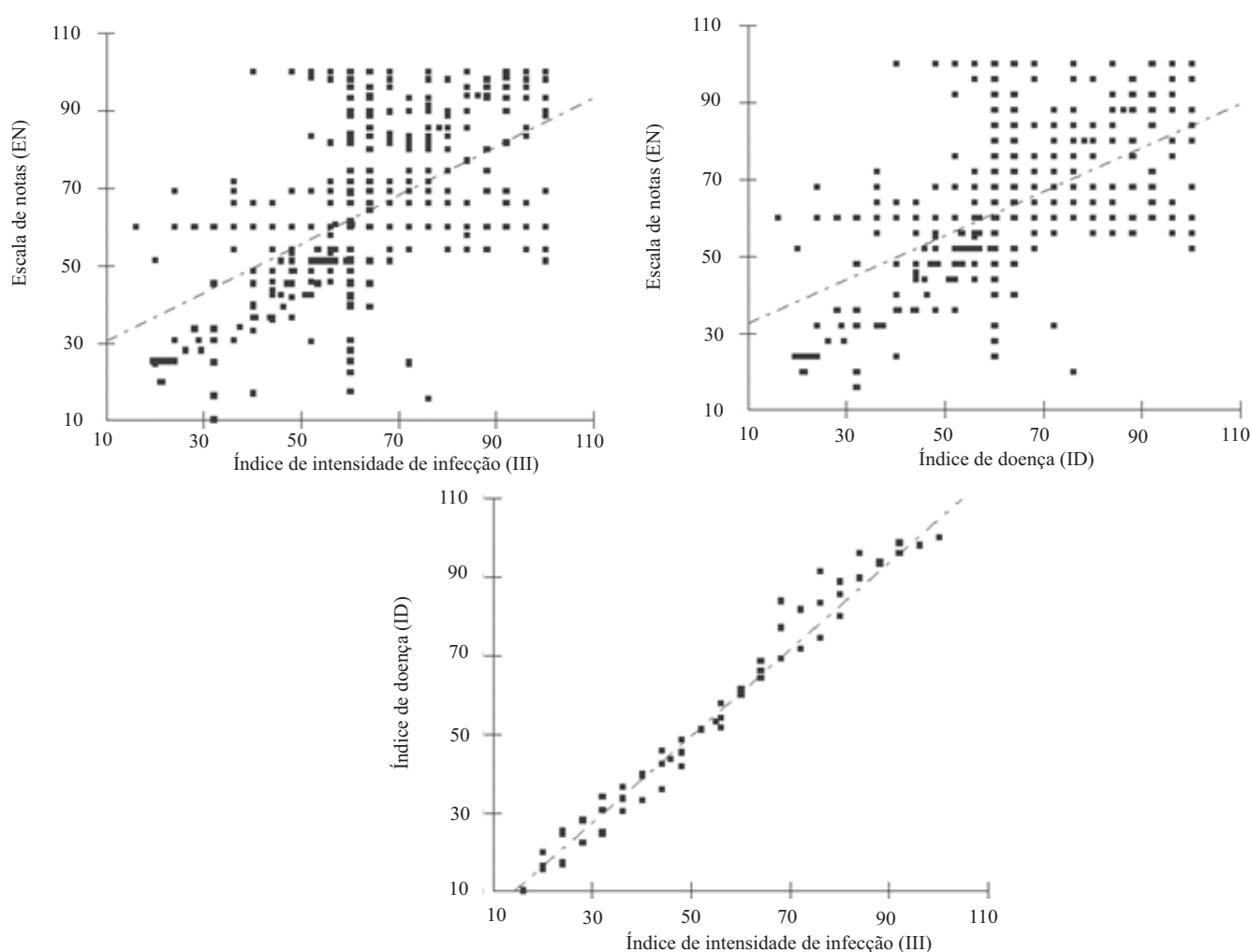
correlação com os resultados mensurados por meio de EN corroboram os resultados obtidos, referentes à caracterização da reação dos genótipos à podridão-parda (Tabela 1).

Considerando-se que os métodos patométricos EN, III e ID diferem quanto à caracterização da resistência de cacaueiros à podridão-parda, e que o ID permitiu classificação mais detalhada desse

**Tabela 1.** Reação de genótipos de cacaueiro a *Phytophthora palmivora*, de acordo com os métodos patométricos escala de notas (EN), índice de intensidade de infecção (III) e índice de doença (ID), a partir de teste de disco foliar<sup>(1)</sup>.

Agrupamentos	Número de genótipos e severidade média <sup>(2)</sup>					
	Grau de significância de 5%			Grau de significância de 1%		
	EN	III	ID	EN	III	ID
1	1 (24,5)a	1 (26,2)a	1 (25,3)a	1 (24,5)a	1 (36,2)a	1 (25,3)a
2	71 (59,7)b	3 (45,5)b	3 (47,3)b	71 (59,7)b	3 (46,2)b	3 (47,6)b
3	27 (69,4)c	59 (60,0)c	65 (60,0)c	31 (70,6)c	59 (59,9)c	65 (60,0)c
4	4 (79,4)d	33 (69,4)d	24 (67,7)d	-	34 (69,3)d	24 (67,7)d
5	-	5 (76,8)e	8 (73,7)e	-	6 (80,0)e	8 (73,7)e
6	-	2 (86,2)f	2 (84,0)f	-	-	2 (84,0)f

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Scott-Knott. <sup>(2)</sup>Entre parênteses, dados de severidade média.



**Figura 1.** Gráficos de correlação de Spearman entre os métodos patométricos utilizados para mensuração da resistência a *Phytophthora palmivora* de 103 genótipos de cacaueiro, avaliados por meio de teste de disco foliar e com uso da escala de notas proposta por Nyassé et al. (1995). Coeficientes de correlação: ENxIII –  $r = 0,59$ ,  $p < 0,01$ ; ENxID –  $r = 0,59$ ,  $p < 0,01$ ; IDxIII –  $r = 0,99$ ,  $p < 0,01$ .

gradiente, sugere-se priorizar o uso desse índice para caracterização e seleção de genótipos, em programas de melhoramento que envolvam a resistência a *P. palmivora*.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas bolsas concedidas; à Dra. Ana Beatriz Costa Czermainski, pela concessão de planilha Excel empregada no cálculo do índice de intensidade de infecção.

### Referências

- ALTHAUS, R.A.; CANTERI, M.G.; GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2001, Ponta Grossa. **Anais**. Ponta Grossa: UEPG, 2001. p.280-281.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. dos. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2005. 334p.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M. **Avaliações biométricas, genéticas e moleculares visando conservação e melhoramento de *Passiflora* spp.** 2009. 158p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.
- CZERMAINSKI, A.B.C. Generalização de um índice de intensidade de infecção em experimentos de avaliação de doenças em plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1545-1555, 1999.
- DANTAS NETO, A.; CORRÊA, R.X.; MONTEIRO, W.R.; LUZ, E.D.M.N.; GRAMACHO, K.P.; LOPES, U.V. Caracterização de uma população de cacaueiro para mapeamento de genes de resistência à vassoura-de-bruxa e podridão-parda. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.380-386, 2005.
- LARANJEIRA, F.F. Problemas e perspectivas da avaliação de doenças como suporte ao melhoramento do maracujazeiro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.160-184.
- LUZ, E.D.M.N.; SGRILLO, R.B.; SANTOS FILHO, L.P. Estimativas de danos e perdas causadas por doenças no cacaueiro. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., 2004, Viçosa. **Anais**. Viçosa: UFV, 2005. p.67-79.
- McKINNEY, H.H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, p.195-217, 1923.
- NYASSÉ, S.; CILAS, C.; HÉRAIL, C.; BLAHA, G. Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. **Crop Protection**, v.14, p.657-663, 1995.
- NYASSÉ, S.; DESPRÉAUX, D.; CILAS, C. Validity of a leaf inoculation test to assess the resistance to *Phytophthora megakarya* in a cocoa (*Theobroma cacao* L.) diallel mating design. **Euphytica**, v.123, p.395-399, 2002.
- SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCOSKY, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, v.7, p.13-24, 2006.
- SILVA, J.G.C. Análise estatística de um novo índice de intensidade de infecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, p.3-7, 1969.
- TAHI, G.M.; KÉBÉ, B.I.; N'GORAN, J.A.K.; SANGARÉ, A.; MONDEIL, F.; CILAS, C.; ESKES, A.B. Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. **Euphytica**, v.149, p.35-44, 2006.
- TAN, G.Y.; TAN, W.K. Additive inheritance of resistance to pod rot caused by *Phytophthora palmivora* in cacao. **Theoretical and Applied Genetics**, v.80, p.258-264, 1990.

---

Recebido em 29 de outubro de 2008 e aprovado em 27 de fevereiro de 2009