



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**CLEMILDO DE SOUSA QUEIROZ JÚNIOR**

**Confirmação das espécies de *Phytophthora* que causam cancro no cacaueteiro**

Brasília, DF

2023

CLEMILDO DE SOUSA QUEIROZ JÚNIOR

**Confirmação das espécies de *Phytophthora* que causam cancro no  
cacaueiro**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.  
Orientador: Prof. Danilo Batista Pinho.

Brasília, DF

2023

CLEMILDO DE SOUSA QUEIROZ JÚNIOR

**Confirmação das espécies de *Phytophthora* que causam cancro no  
cacaueiro**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em 24 de julho de 2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Danilo Batista Pinho – Orientador  
Universidade de Brasília (UnB)

---

Prof. Silvino Intra Moreira – Membro 1  
Universidade de Brasília (UnB)

---

Thaís França Silva – Membro 2  
Universidade de Brasília (UnB)

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a minha família pelo suporte. Ao meu orientador Danilo por todo auxílio durante grande parte da minha graduação. A todos meus amigos que me apoiaram durante meus anos de UnB. A todos meus amigos de laboratório, Ana Paula, Aline, Thais, Gustavo, Victoria, Joselene e Willie por toda ajuda e ensinamentos nos meus projetos. As minhas amigas de iniciação científica Laura e Raylane que sempre tornaram o dia-a-dia no laboratório mais divertidos. E principalmente ao meu amigo Jefferson que me ensinou bastante durante meu tempo de aluno de iniciação científica, e que sem sua ajuda eu não teria terminado este trabalho.

## RESUMO

O cacauzeiro é uma cultura de grande importância mundial. Sua produção está concentrada em poucos países e o Brasil se destaca entre os principais produtores, porém doenças como o cancro do cacauzeiro causado por *Phytophthora* spp. são entraves no rendimento da cadeia produtiva. Esta doença causa anualmente a morte de 10% das plantas por cancos do tronco, reduzindo a produção e impondo um custo extra no replantio. Muitas espécies de *Phytophthora* são citadas como causadoras do cancro no cacauzeiro, porém ainda carecem estudos de patogenicidade para determinação do real agente causal. Neste contexto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a patogenicidade de espécies relatadas no Brasil como causadoras do cancro. Foram testados dois isolados de seis espécies diferentes (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. heveae*, *P. theobromicola*, *P. citrophthora* e *Phytophthora* sp.), os isolados foram identificados molecularmente e inoculados em mudas de cacau, genótipo CCN51 com seis meses de idade. Quinze dias após a inoculação, foi feita a avaliação do experimento. As espécies *P. theobromicola*, *P. palmivora* e *P. capsici* e *Phytophthora* sp. apresentaram potencial patogênico no cacauzeiro. As espécies *P. citrophthora* e *P. heveae* apresentaram sintomas muito pequenos ou ficaram retidos ao tamanho disco de micélio, não avançando para uma necrose dos tecidos do caule, o que pode indicar uma reação de hipersensibilidade da planta.

**Palavras-chave:** Fitopatógeno; *Theobroma cacao* L.; Oomyceto; Patogenicidade.

## ABSTRACT

Cocoa is a crop of great importance worldwide. Its production is concentrated in a few countries and Brazil stands out among the main producers, but diseases such as cacao canker caused by *Phytophthora* spp. are obstacles to the performance of the production chain. Annually, this disease causes the death of 10% of the plants due to stem cankers, reducing production and imposing an additional cost in replanting. Many species are cited as causing cacao canker, but pathogenicity studies on which species cause the disease are still lacking. In this context, the objective of our study was to evaluate the pathogenicity of species reported in Brazil as causing canker. Two isolates from six different species (*P. palmivora*, *P. capsici*, *P. heveae*, *P. theobromicola*, *P. citrophthora* and *Phytophthora* sp.) were tested, molecularly identified and inoculated into six month-old cacao seedlings, genotype CCN51. Fifteen days after inoculation, the experiment was evaluated. The species *P. theobromicola*, *P. palmivora* and *P. capsici* and *Phytophthora* sp. actually showed pathogenic potential in cocoa. The species *P. citrophthora* and *P. heveae* showed very few symptoms or remained within the size of the mycelium disc, without evolving to necrosis of the stem tissues, which could only indicate a hypersensitivity reaction of the plant.

**Keywords:** Phytopathogen; *Theobroma cacao* L.; Oomycete; Pathogenicity.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS .....  | 7  |
| LISTA DE TABELAS .....  | 7  |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 8  |
| 2. REFERENCIAL TEORÍCO.....                                     | 10 |
| 2.1 O cacauero .....  | 10 |
| 2.2 Espécies de <i>Phytophthora</i> relatadas no cacauero ..... | 13 |
| 2.3 Cancro do Cacauero.....                                     | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                     | 16 |
| 3.1 Obtenção dos Isolados .....                                 | 16 |
| 3.2 Teste de Patogenicidade .....                               | 17 |
| 4. RESULTADOS.....  | 18 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 20 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                   | 22 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                             | 23 |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Morfologia do cacau. a) Árvore adulta do cacau. b) Botões florais nos ramos do cacau. c) Flor de cacau. d/e) Fruto de cacau imaturo. .... 10

**Figura 2.** a) Folha jovem. b) Folha velha. c) Flor do cacau. d) Fruto do cacau. e) Fruto aberto. .... 11

**Figura 3.** Ranking mundial dos países produtores de cacau. .... 12

**Figura 4.** Lesões causadas por diferentes isolados e espécies de *Phytophthora* aos 15 dias após a inoculação. a-b) *P. theobromicola*; c-d) *P. citrophthora*; e-f) *P. palmivora*; g-h) *P. capsici*; i-j) *P. heveae*; k-l) *Phytophthora* sp. .... 19

**Figura 5.** Tratamento controle ..... 20

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Números de acesso do GenBank para sequências de DNA de isolados de *Phytophthora* utilizados neste estudo. .... 17

**Tabela 2.** Tamanho médio das lesões causadas por *Phytophthora* spp. nas mudas de cacau. .... 18

## 1. INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore tropical perene, pertencente à família *Malvaceae* Juss, nativa da floresta Amazônica e de grande importância econômica, histórica e sociocultural (VERNA, 2013). Seu cultivo representa o sustento de mais de 100 milhões de pessoas em mais de 50 países tropicais, gerando mais de 10 bilhões de dólares por ano em receitas (ICCO, 2019). O Brasil em 2021 foi o maior produtor de cacau da América (FAO, 2023), e a produção no país ocorre principalmente nos estados da Bahia, Pará, Espírito Santo, Amazonas e Mato Grosso e Rondônia (SANTOS *et al.*, 2023). No entanto, doenças causadas por fitopatógenos, como *Phytophthora* spp., têm sido responsáveis por perdas de rendimento e produção em todas as regiões produtoras do país (DELGADO-OSPINA *et al.*, 2021).

*Phytophthora* (Reino: *Straminipila*; Filo: *Oomycota*; Classe: *Oomycetes*; Ordem: *Peronosporales*; Família: *Peronosporaceae*), é indiscutivelmente um dos gêneros mais importantes historicamente e economicamente para a fitopatologia a nível mundial (BRASIER *et al.*, 2022). Algumas espécies de *Phytophthora* causam a podridão parda no cacauieiro, que é uma das principais doenças que afetam a cultura (AKAZA *et al.*, 2016; DELGADO-OSPINA *et al.*, 2021). As perdas causadas pela podridão parda variam de 10% a 100%, dependendo das condições climáticas e da espécie predominante (OPOKU *et al.*, 2000; GUEST, 2007; PUIG *et al.*, 2018; DELGADO-OSPINA *et al.*, 2021). O sintoma característico da doença é o apodrecimento da casca do fruto, que se inicia com lesões pequenas, escurecidas e endurecidas, que se expandem cobrindo toda a superfície do fruto e dos tecidos internos (GUEST, 2007). Além da podridão parda em frutos, esse oomiceto infecta ramos e caule do cacauieiro (ROCHA & RAM, 1971).

Ao infectar o caule do cacauieiro, *Phytophthora* spp. ocasiona sintomas de cancro com a formação de lesões na casca e no interior do tronco, que frequentemente se estendem até as raízes. Quando a lesão está desenvolvida, o tecido da casca infectado se torna fendilhado e normalmente se observa a formação de um exsudato avermelhado. Na presença de hospedeiro suscetível e condições ambientais favoráveis, o patógeno coloniza o caule e atinge o lenho, induzindo a morte da planta (ROCHA & RAM, 1971; LUZ *et al.*; GUEST, 2007).

Os sintomas de cancro são observados em todas as áreas produtoras de cacau. Além de reduzir o vigor das árvores e a capacidade de carga dos frutos, essa doença

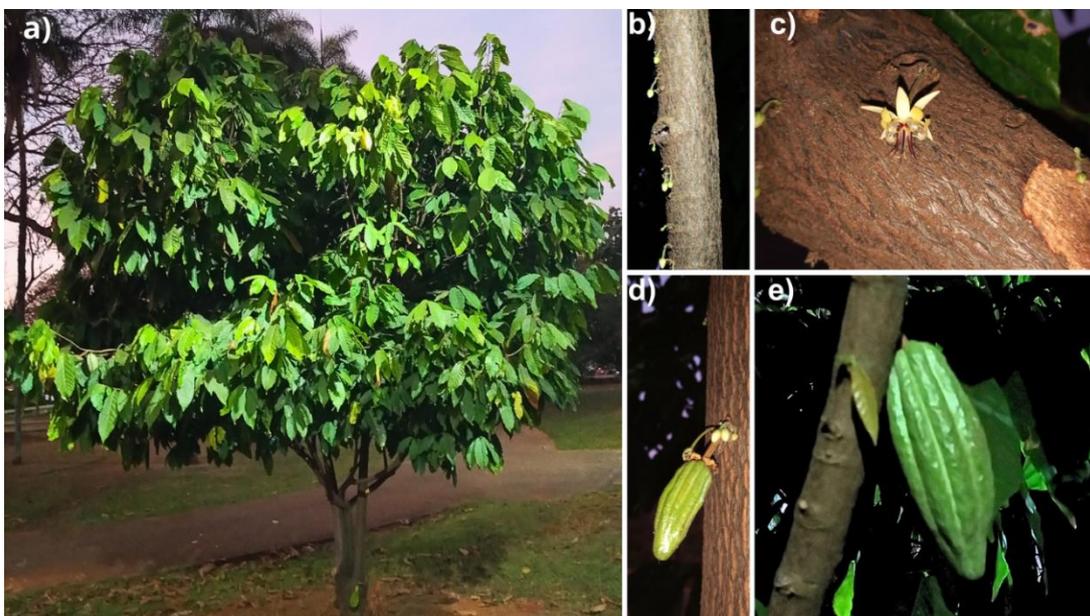
ocasiona a morte anual de 10% das plantas, reduzindo a produtividade e aumentando os custos de produção com o replantio de árvores (ROCHA & RAM, 1971; GUEST, 2007). Embora seja uma doença importante para o cacaueteiro, a etiologia da doença ainda não foi completamente avaliada a nível de espécie (ROCHA & RAM, 1971; SILVA NETO et al. 2001; LUZ et al. 2001; APPIAH et al. 2004; GUEST, 2007). Apesar dos relatos de *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae*, *P. megakarya* e *P. palmivora* causando cancro no cacaueteiro, somente a patogenicidade de *P. palmivora* foi comprovada em mudas de cacaueteiro até o momento (PUIG *et al.*, 2021). Em relação a *P. theobromicola*, uma espécie que recentemente foi descrita causando a podridão parda de frutos (DECLOQUEMENT *et al.*, 2021), ainda não se conhece seu potencial de causar cancro no cacaueteiro.

Além disso, com exceção do estudo de PUIG *et al.* (2021), todos os demais isolados foram identificados por sintomatologia e morfologia, podendo resultar em identificações incorretas. Baseado nessas lacunas, esse trabalho teve o objetivo de caracterizar molecularmente as diferentes espécies de *Phytophthora* e avaliar a sua patogenicidade em mudas de cacaueteiro.

## 2. REFERENCIAL TEORÍCO

### 2.1 O cacaeiro

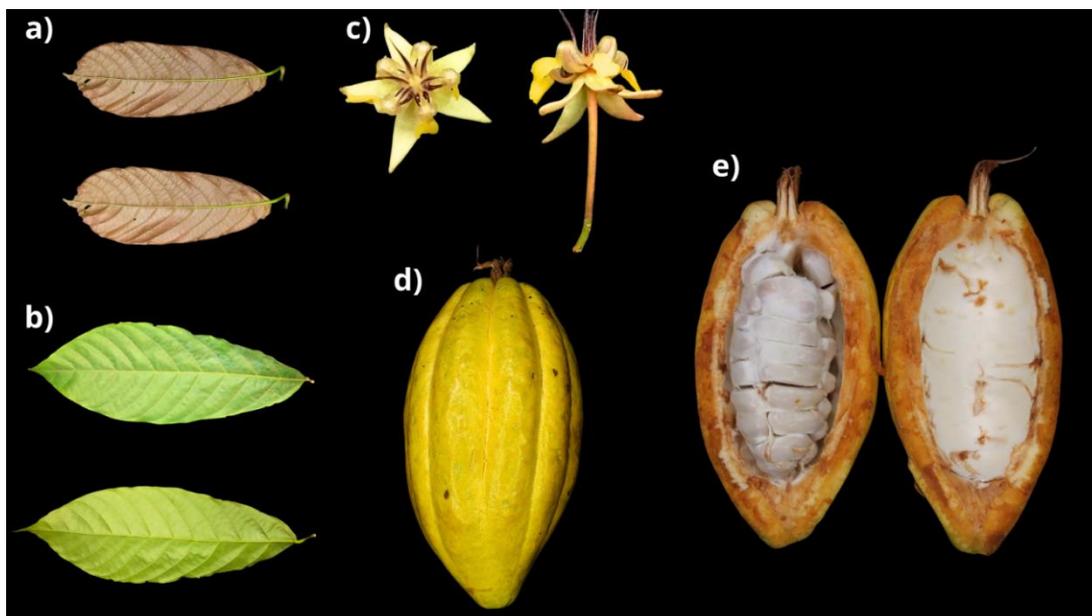
O cacaeiro é uma árvore tropical frutífera, nativa da bacia Amazônica na América do Sul, que pode atingir de 5-8 m de altura e 4-6 m de diâmetro de copa (SILVA NETO *et al.*, 2001). O sistema radicular é composto por uma raiz pivotante e raízes secundárias, localizadas em maior número na parte superior da pivotante. As folhas são oblongas, acuminadas e glabras com nervura central proeminente, com coloração que varia do verde pálido ao violeta quando jovens, e ficam verde escuras quando estão mais velhas. O caule é ereto e, nos primeiros anos, o cacaeiro apresenta a casca do tronco lisa. Mais tarde, devido ao permanente desenvolvimento das almofadas florais, a casca torna-se áspera e rugosa (SILVA NETO *et al.*, 2001).



**Figura 1.** Morfologia do cacaeiro. a) Árvore adulta do cacaeiro. b) Botões florais nos ramos do cacau. c) Flor de cacau. d/e) Fruto de cacau imaturo.

As flores do cacaeiro surgem em almofadas florais no tronco ou nos ramos lenhosos, em uma gema desenvolvida no lugar da axila de uma antiga folha. Anualmente o cacaeiro adulto pode produzir até mais de 100.000 flores, das quais menos de 5% são fertilizadas, cerca de 0,1% se transformam em frutos (SILVA NETO *et al.*, 2001). Os frutos quando jovens apresentam coloração verde e, quando maduros, cor amarela, roxa ou alaranjada (SILVA NETO *et al.*, 2001). Cada fruto produz de 20 a 40 amêndoas, que são ovais e achatadas, com 2 a 3 cm de comprimento. As amêndoas são recobertas por uma polpa mucilaginosa (gelatinosa) de coloração branca. Em relação ao ciclo de vida, o

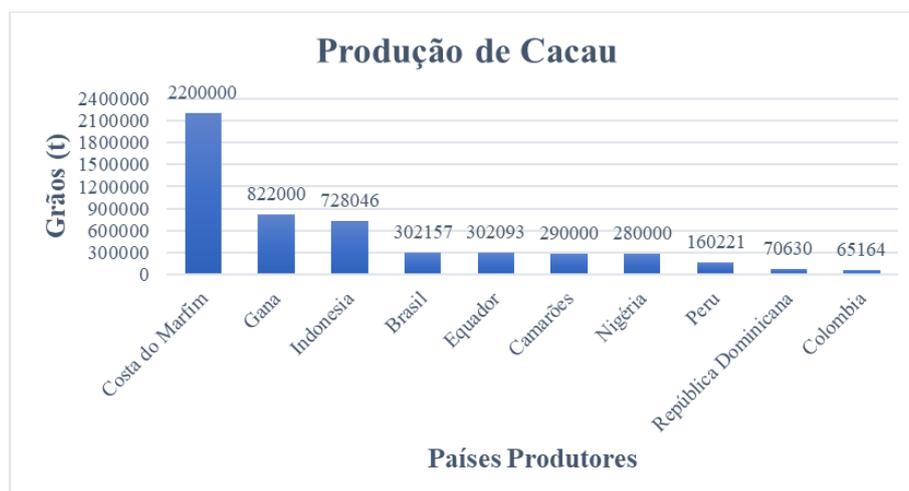
cacaueiro apresenta características de perenidade, podendo ultrapassar os 100 anos com desenvolvimento vegetativo suficiente para uma boa produtividade- (SILVA NETO et al., 2001).



**Figura 2.** a) Folhas jovens. b) Folhas velhas. c) Flor do cacau. d) Fruto do cacaueiro. e) Fruto aberto.

As amêndoas do cacau são o produto base para a fabricação do chocolate, que após um processo de fermentação e secagem da polpa, estas são torradas, em seguida sua casca é removida e então as sementes são moídas em grãos finos ou em pó (VERNA, 2013). A origem do chocolate é muito antiga e atribuída aos povos Maias, por volta de 400 d.C. Com a colonização dos espanhóis sobre os povos americanos, o chocolate passou a ser conhecido no continente europeu e a partir de então passou a ser cada vez mais valorizado- (VERNA, 2013).

Atualmente os maiores produtores mundiais são os países africanos Costa do Marfim e Gana, com 2,2 milhões e 822 mil toneladas respectivamente, cerca de 58% da produção mundial (**Figura 3**). O Brasil em 2021 ocupou a quarta posição entre os países produtores, com 302 mil toneladas de grãos (FAO, 2023). O país também se destaca no cenário mundial por reunir todos os elos da cadeia produtiva do cacau, produção, moagem, indústria chocolateira e é um dos maiores consumidores de chocolate do mundo (MAPA, 2022). Os principais estados produtores de cacau são Pará, Bahia, Espírito Santo, Amazonas, Mato Grosso e Rondônia. O ranking é liderado pelos estados do Pará e da Bahia, representando cerca de 94% da produção nacional (SANTOS *et al.*, 2023).



**Figura 3.** Ranking mundial dos países produtores de cacau no ano de 2021. Fonte: FAO, 2023

O desenvolvimento da cacauicultura no Brasil pode ser contextualizado em duas grandes fases: a primeira que vai do século XVII até 1890, quando ocorreram os primeiros embarques de europeus e predominavam as produções na Amazônia; e a segunda que vai de 1890 até a atualidade, quando a produção brasileira passou majoritariamente para a Bahia. Na segunda fase do desenvolvimento, a cacauicultura brasileira passou por períodos de grande escalonamento pela alta adaptação do cacau na Bahia (RODRIGUES, 2006).

A cultura do cacau passou por diversas crises no país, entre elas a estagnação econômica e a queda dos preços das commodities na década de 1930; os baixos níveis de produtividade devido à falta de modernização dos meios de cultivo em 1957; a crise de 1987, resultado da superprodução de cacau que levou à queda do preço da amêndoa; e o surgimento da “vassoura-de-bruxa”, causada por *Moniliophthora perniciosa* em 1989, que reduziu drasticamente a produção de cacau no país (COUTO, 2000; RODRIGUES, 2006). Nesse período, iniciou-se a importação de cacau africano para atender as necessidades da consolidada indústria processadora de chocolate na Bahia (COUTO, 2000; RODRIGUES, 2006). A vassoura-de-bruxa foi por muito tempo a doença mais destrutiva do cacau, chegando a dizimar totalmente as plantações. No Brasil foram registradas perdas superiores a 70% da produção e até abandono de áreas de plantio (BASTOS *et al.*, 2016).

Desde o desenvolvimento de mudas resistentes à vassoura-de-bruxa, outros problemas fitossanitários passaram a ser importantes na produção do cacau, principalmente a doença chamada podridão-parda dos frutos causada por *Phytophthora* spp. (DECLOQUEMENT *et al.*, 2021). As espécies causadoras da podridão-parda no

Brasil (*P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* e *P. heveae*), também são conhecidas como causadoras do cancro no cacau (LUZ *et al.*, 2001). *P. theobromicola*, descrita apenas por DECLOQUEMENT *et al.* em 2021 ainda não possui registro como agente causal do cancro. No entanto, deve-se destacar que a maioria das identificações das espécies conhecidas foram baseadas em morfologia e que a patogenicidade dos isolados não foi avaliada, apenas *P. palmivora* por PUIG *et al.* em 2021 (ROCHA & RAM, 1971; LUZ *et al.*, 2001; APPIAH, 2004; GUEST, 2007).

## 2.2 Espécies de *Phytophthora* relatadas no cacau

O gênero *Phytophthora* (Reino: *Straminipila*; Filo: *Oomycota*; Classe: *Oomycetes*; Ordem: *Peronosporales*; Família: *Peronosporaceae*) “destruidor de plantas” foi estabelecido por Anton de Bary em 1879 com a descrição de *P. infestans*, agente causal da “requeima da batata”, uma doença destrutiva que ocasionou a morte e migração de milhões de irlandeses em 1845/1852 (HO, 2018). O gênero possui 313 espécies descritas (HO, 2018), sendo que a grande maioria causa perdas econômicas em culturas cultivadas. A maioria das espécies habitam o solo e ocasionam podridão radicular, podridão basal do caule, mancha foliar e podridão de frutos em espécies nativas e cultivadas, afetando plantas de interesse econômico como grandes culturas, espécies florestais, plantas ornamentais e espécies frutíferas (LUZ *et al.*, 2001; HO, 2018).

Em relação as espécies de *Phytophthora* no cacau, a podridão parda é a principal doença estudada devido as perdas diretas ocasionadas pela infecção dos frutos, mas também se observa os sintomas de cancro no caule e a infecção de folhas e raízes (OLIVEIRA & LUZ, 2005; SILVA NETO *et al.*, 2001). Até o momento, doze espécies de *Phytophthora* foram relatadas associadas com doenças no cacau, incluindo *P. botryosa*, *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae*, *P. katsurae*, *P. meadii*, *P. megakarya*, *P. megasperma*, *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. theobromicola* e *P. tropicalis* (BAILEY & MEINHANRDT, 2016; DECLOQUEMENT, 2021). Entre essas, somente *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. megakarya*, *P. palmivora* e *P. theobromicola* foram relatados causando perdas econômicas para a produção de cacau (PEREIRA *et al.*, 1980; LUZ *et al.*, 2001; APPIAH *et al.*, 2004; GUEST, 2007).

*Phytophthora megakarya* (considerada a espécie mais agressiva) é restrita a países localizados no Oeste e África Central, enquanto *P. palmivora* é a espécie mais amplamente difundida em todo o mundo (ALI *et al.*, 2016; BAILEY & MEINHANRDT,

2016). No Brasil, as espécies conhecidas no cacauzeiro são *P. capsici*, *P. citrophthora*, *P. heveae*, *P. palmivora* e *P. theobromicola*, sendo que essa última espécie foi descoberta pela caracterização molecular dos isolados previamente identificados como *P. citrophthora* (DECLOQUEMENT *et al.*, 2021).

### 2.3 Cancro do Cacauzeiro

Após a infecção de mudas ou plantas jovens, espécies de *Phytophthora* podem colonizar o cacauzeiro por um longo período e somente na fase de planta adulta se observam os sintomas de cancro e morte de plantas. Embora esses sintomas não causem perdas diretas, a redução do vigor das árvores e diminuição da carga dos frutos ocasionam perdas indiretas devido a redução da produtividade e aumento dos custos de produção com a substituição de plantas (ROCHA & RAM, 1971; LUZ *et al.*, 2001; GUEST, 2007).

O cancro do cacauzeiro é uma doença com capacidade considerável de causar prejuízos em plantações de cacau, e está presente praticamente em todas as regiões de plantio da cultura. Os sintomas do cancro são caracterizados pela presença de manchas escuras sobre a casca do tronco ou ramos, podendo se estender até as raízes, variando seu tamanho de poucos centímetros até 1m de extensão (ROCHA & RAM, 1971). Quando a lesão está bem desenvolvida, pode-se observar uma secreção avermelhada e, geralmente, neste estágio, a parte da casca torna-se fendilhada. Quando o ataque é severo, o fungo circunda o caule ou o ramo onde forma o cancro, causando a morte da planta ou do ramo (LUZ *et al.*, 2001). Os cancos também podem servir como fonte de inóculo para a podridão parda e *vice-versa* (GUEST, 2007).

A disseminação da doença pode acontecer de uma planta doente para uma sadia por meio de instrumentos agrícolas contaminados (ROCHA & RAM, 1971). Outros meios de disseminação são por meio de gotículas de água carregadas pelo vento, correntes de convecção que se formam no interior da plantação, por roedores e insetos que circundam a planta, pela formação de orvalho em áreas da planta infectadas que levam gotículas com zoósporos para outras partes da planta e ação da água da chuva. Pode ocorrer também pelo solo, por meio de restos infectados, estruturas de sobrevivência como oósporos ou de zoósporos presentes na água acumulada, os quais são atraídos pelos exsudatos de raízes de outros cacauzeiros (LUZ *et al.*, 2001).

ROCHA & RAM (1971) atribuíram o agente causal do cancro a espécie *P. palmivora*, mas também relataram *Calonectria rigidiuscula* como agente secundário da

doença. PEREIRA *et al.*, em 1980 fizeram um levantamento dos danos causados por cancro em dois municípios no Espírito Santo e em um município no estado da Bahia. No Espírito Santo, aproximadamente 35% das plantas foram afetadas pela doença, 12% estavam já mortas ou sem recuperação. Na Bahia o dano foi maior, no município de Belmonte 45% das plantas foram afetadas pela doença, mais de 20% já estavam mortas ou sem recuperação, aproximadamente dois milhões de plantas foram destruídas, demonstrando assim a capacidade destrutiva da doença quando está em situação favorável a seu desenvolvimento.

SILVA NETO *et al.* (2001) relataram *P. palmivora* como principal agente causal na região Amazônica e *P. capsici* como principal agente causal na Bahia. Ambas as espécies causam a chamada podridão parda dos frutos e cancos no cacau, doença de ocorrência generalizada em todos os continentes produtores de cacau, causando perdas da produção mundial em torno de 10% e, no Brasil as perdas chegaram a 40%.

LUZ *et al.* (2001), no livro “Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil” descreve as diferenças entre os isolados de *Phytophthora* e cita que as espécies *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. heveae* causam podridão parda do cacau no Brasil, podendo também causar cancos. Outra espécie, *P. megakarya* foi relatada no continente africano como agente causal da podridão-parda, esta espécie é bastante destrutiva e também foi associada ao cancro no cacau. *P. megasperma* foi relatada como agente causal da podridão-parda na Venezuela e Ilhas Salomão e *P. katsurae* foi relatada como agente causal da podridão-parda na Costa do Marfim.

APPIAH *et al.* (2004), relatam sobre a ocorrência de espécies de *Phytophthora* causando cancro em cacau na região de Gana, o estudo foi feito em regiões que havia incidência da doença e atribuíram apenas *P. palmivora* e *P. megakarya* como agentes causais do cancro do caule em cacau, porém os isolados foram avaliados apenas morfológicamente.

GUEST, em 2007, relatou o impacto de *Phytophthora* na plantação mundial de cacau, causando cerca de 30% de perda da produção através da podridão parda dos frutos e morte de 10% das plantas anualmente por cancos do tronco, reduzindo a produção e impondo um custo extra no replantio à medida que as árvores replantadas amadurecem.

DECLOQUEMENT *et al.*, 2021, fizeram um estudo para avaliar a diversidade de isolados de *Phytophthora* spp. que causam a podridão parda no cacau no Brasil, 40 isolados foram obtidos de frutos de cacau exibindo sintomas de doença, coletadas em

diferentes propriedades de pequenos produtores em 2017, além de caracterizar molecularmente dez outros isolados de *P. palmivora* e *P. citrophthora* classificados anteriormente por análises morfológicas. Com base na análise molecular e comparações morfológicas, 19 isolados foram identificados como *P. palmivora* e 31 isolados foram classificados como uma espécie nova referida como *Phytophthora theobromicola* sp. nov. No teste de patogenicidade, *P. palmivora* e *P. theobromicola* apresentaram capacidade de infecção nos frutos causando a podridão-parda. *P. citrophthora* não apresentou sintomas no fruto do cacau. Não foram feitos estudos sobre a capacidade destas espécies causarem cancro no cacau.

PUIG *et al.* em 2019 fizeram uma análise de plantas infectadas no Equador, até 28% das plantas foram afetadas por cancro e, apesar de não causarem morte da planta, as lesões chegavam até dois metros de altura. O agente causal atribuído a doença foi *P. palmivora* identificado por meio de sequências do ITS e COXI. Em 2021, PUIG *et al.* fizeram uma análise da patogenicidade de *Phytophthora palmivora* em mudas de cacau, mas outras espécies citadas como causadoras do cancro não foram avaliadas.

Portanto, a análise de quais espécies causam cancro do tronco no cacau ainda permanece imprecisa, pois como mostrado nos estudos acima, várias espécies foram relatadas causando a doença, porém não foram feitos teste de patogenicidade. Ainda, de forma problemática, os trabalhos mencionados, basearam-se apenas em identificação na morfologia dos isolados e após o estudo de DECLOQUEMENT *et al.*, 2021, no trabalho intitulado “*Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil”, foi demonstrado que análises morfológicas podem ser insuficientes para delimitar algumas espécies, pois isolados antes classificados morfológicamente como *P. citrophthora* foram reclassificados como *P. theobromicola* após estudo moleculares.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos Isolados**

Os isolados de *Phytophthora* spp. foram obtidos da coleção de culturas da Universidade de Brasília (CCUB). No total, 12 isolados (dois isolados por espécie) foram utilizados nesse estudo, sendo estes pertencentes as espécies *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. heveae*, *P. theobromicola*, *P. citrophthora* e *Phytophthora* sp. (isolado agrupado com isolado P0630, podendo ser uma espécie de *P. capsici* - *Phytophthora* cf. *capsici* FM-

2011 (*GenBank*)) (**Tabela 1**). Os isolados CCUB 1091, CCUB 1205, CCUB 2716, CCUB 2700 e CCUB 2711 foram identificados molecularmente no trabalho de DECLOQUEMENT *et al.* (2021). As atribuições taxonômicas dos demais isolados foram feitas por meio de comparações pareadas da região Beta tubulina com outras sequências depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta *BLAST* (*The Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Homologia de sequência (percentual de similaridade) superior a 97% foram consideradas para classificação a nível de espécie.

**Tabela 1.** Números de acesso do *GenBank* para sequências de DNA de isolados de *Phytophthora* utilizados neste estudo.

| Espécie                 | Isolado            | BTUB     | ITS      | COXI     | COXII    | HSP90    | EF1 $\alpha$ |
|-------------------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| <i>P. theobromicola</i> | CCUB 1091          | MT074223 | MT074263 | MW597344 | MT074271 | MT074287 | MT074279     |
| <i>P. theobromicola</i> | CCUB 1205          | MT074224 | MT074264 | MW597351 | MT074272 | MT074288 | MT074280     |
| <i>P. citrophthora</i>  | CCUB 2702          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>P. citrophthora</i>  | CCUB 2716 / P1159* | MW597329 | MW597338 | MW597356 | MW597365 | MW597375 | MW597383     |
| <i>P. palmivora</i>     | CCUB 2700          | MW597322 | MW597331 | MW597340 | MW597358 | MW597367 | MW597376     |
| <i>P. palmivora</i>     | CCUB 2711          | MW597324 | MW597333 | MW597345 | MW597360 | MW597369 | MW597378     |
| <i>P. capsici</i>       | CCUB 2709          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>P. capsici</i>       | CCUB 2905          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>P. heveae</i>        | CCUB 2704          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>P. heveae</i>        | CCUB 2705          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>Phytophthora</i> sp. | CCUB 2715          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |
| <i>Phytophthora</i> sp. | CCUB 2909          | NA       | NA       | NA       | NA       | NA       | NA           |

\*NA: Não fornecido/não informado

### 3.2 Teste de Patogenicidade

Inicialmente, os diferentes isolados foram crescidos em meio de cultura cenoura-ágar (CA), a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante sete dias, e a viabilidade destes foi avaliada conforme descrito por DELGADILLO-DURÁN *et al.* (2020) com pequenas modificações. Resumidamente, um disco de micélio de 5 mm de cada isolado foi inoculado na superfície de maçãs previamente desinfestadas. As maçãs foram mantidas em câmara úmida e incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante cinco dias. Após esse período, pequenos fragmentos dos tecidos colonizados foram dispostos em meio de cultura CA e mantidos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante sete dias.

A patogenicidade de *Phytophthora* spp. foi testada em mudas de cacaueteiro, genótipo CCN51, com 6 meses de idade utilizando o protocolo de MENA *et al.* (2019) com algumas modificações. Um ferimento de 5 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade na haste principal da muda a uma distância de 10 cm do colo da planta foi realizado com auxílio de um furador cilíndrico esterilizado de 5mm de diâmetro. Em seguida, um disco

micelial de 5 mm de diâmetro foi retirado da borda de colônias com 7 dias de idade cultivadas em CA e depositado sobre o ferimento. Posteriormente, um pequeno pedaço de algodão úmido em água destilada esterilizada foi colocado no lado oposto ao ponto de inoculação e então toda a área foi envolvida com parafilme para garantir umidade até o estabelecimento da infecção. Nas plantas controle, apenas discos de CA foram colocados sobre os ferimentos. As mudas foram mantidas em casa de vegetação por 15 dias. O experimento foi organizado com três repetições por isolado. Um total de 12 isolados pertencentes a seis espécies foram avaliados. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

#### 4. RESULTADOS

A patogenicidade de dois isolados de cada espécie de *Phytophthora* (*P. theobromicola*, *P. citrophthora*, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. heveae* e *Phytophthora* sp.) foi verificada com a inoculação em mudas de cacaueteiro. Com exceção da testemunha, lesões necróticas de coloração marrom/avermelhadas foram observadas em todas as plantas, sendo que o desenvolvimento da lesão variou de acordo com a espécie e isolado (**Tabela 2**).

Lesões que excedem o tamanho do ferimento artificial foram observadas nas plantas inoculadas com os isolados de *P. capsici* (CCUB 2709 e CCUB 2905), *P. palmivora* (CCUB 2700 e CCUB 2711), *Phytophthora* sp. (CCUB 2715) e *P. theobromicola* (CCUB 1091 e CCUB 1205). As lesões (**Figura 4**) ficaram restritas ao local do ferimento nas plantas inoculadas com os isolados de *P. citrophthora* (CCUB 2702 e CCUB 2716), *P. heveae* (CCUB 2704 e CCUB 2705) e *Phytophthora* sp. (CCUB 2909) enquanto na testemunha se observa uma leve descoloração restrita a borda do ferimento (**Figura 5**).

**Tabela 2.** Tamanho médio das lesões causadas por *Phytophthora* spp. nas mudas de cacau, desconsiderando a região do disco de micélio.

| Espécie                 | Isolado   | Comprimento médio das lesões (cm) – 15 dias |
|-------------------------|-----------|---|
| <i>P. theobromicola</i> | CCUB 1091 | 2,1   |
| <i>P. theobromicola</i> | CCUB 1205 | 0,8   |
| <i>P. citrophthora</i>  | CCUB 2702 | 0,1   |

|                         |           |     |
|-------------------------|-----------|-----|
| <i>P. citrophthora</i>  | CCUB 2716 | 0,0 |
| <i>P. palmivora</i>     | CCUB 2700 | 0,9 |
| <i>P. palmivora</i>     | CCUB 2711 | 1,1 |
| <i>P. capsici</i>       | CCUB 2709 | 0,8 |
| <i>P. capsici</i>       | CCUB 2905 | 0,5 |
| <i>P. heveae</i>        | CCUB 2704 | 0,1 |
| <i>P. heveae</i>        | CCUB 2705 | 0,1 |
| <i>Phytophthora</i> sp. | CCUB 2715 | 7,6 |
| <i>Phytophthora</i> sp. | CCUB 2909 | 0,0 |
| Testemunha              | -         | 0,0 |



**Figura 4.** Lesões causadas por diferentes isolados e espécies de *Phytophthora* aos 15 dias após a inoculação. a-b) *P. theobromicola*; c-d) *P. citrophthora*; e-f) *P. palmivora*; g-h) *P. capsici*; i-j) *P. heveae*; k-l) *Phytophthora* sp.



**Figura 5.** Tratamento controle

## 5. DISCUSSÃO

A literatura informa que diferentes espécies de *Phytophthora* ocasionam a mesma sintomatologia no cacaueteiro, mas variam em relação a distribuição geográfica e a agressividade (BAILEY & MEINHANRDT, 2016). Embora o cancro causado por *Phytophthora* spp. ocasione a morte de plantas, ainda não existem estudos sobre a patogenicidade das diferentes espécies de *Phytophthora* em mudas e/ou ramos. Os estudos existentes analisaram a patogenicidade e virulência das diferentes espécies em frutos de diferentes genótipos de cacaueteiro (ROCHA & RAM, 1971; SILVA NETO *et al.* 2001; LUZ *et al.*, 2001; DECLOQUEMENT *et al.*, 2021). O único estudo que avalia o cancro, compara a virulência de *P. palmivora*, *Neofusicoccum parvum* e *Lasiodiplodia theobromae* (PUIG *et al.*, 2021).

Este estudo comprova que todos isolados de *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. theobromicola*, e um isolado de *Phytophthora* sp. (CCUB 2715) causam o cancro em mudas de cacaueteiro enquanto não houve expansão das lesões nas plantas inoculadas com *P. citrophthora*, *P. heveae* e *Phytophthora* sp. isolado CCUB 2909. Os isolados de *P. citrophthora* provavelmente não são patogênicos, uma vez que essa espécie não foi patogênica aos frutos de cacaueteiro no trabalho de DECLOQUEMENT *et al.*, 2021. Além disto, a origem destes isolados são de plantas de *Citrus* sp., pois os isolados antes classificados como *P. citrophthora* no cacaueteiro foram reclassificados como *P. theobromicola* por DECLOQUEMENT *et al.*, 2021, e provavelmente as lesões formadas são resultado de uma reação de hipersensibilidade. Baseado na literatura, *P. heveae* não possui importância econômica (BAILEY & MEINHANRDT, 2016) e provavelmente por

causa da baixa virulência dos isolados e, neste estudo, as lesões observadas ficaram restritas ao tamanho do ferimento.

Diferenças de patogenicidade entre isolados da mesma espécie também já foram observadas em trabalhos anteriores (PUIG et al., 2021). A capacidade do isolado CCUB 2715 de *Phytophthora* sp. causar doença enquanto o isolado CCUB 2909 causa lesões de tamanho restrito aos ferimentos devem estar relacionadas com a variação da virulência dos isolados (WU et al., 2016). Além disto, a capacidade de um fitopatógeno causar doença está relacionada a diversos fatores, como a interação do patógeno com a sua hospedeira, condições ambientais e fatores evolutivos (GUO et al., 2009; WU et al., 2016; BOEVINK et al., 2020; BOURRET et al., 2022; MULLETT et al., 2023). Outros fatores, como reprodução sexual, mutações, respostas de defesas do hospedeiro, e raça do patógeno, podem ser determinantes para evolução, patogenicidade, virulência e adaptação dentro de uma mesma população do patógeno (GUO et al., 2009; WU et al., 2016; BOEVINK et al., 2020; BOURRET et al., 2022; MULLETT et al., 2023). Os resultados observados confirmam que a patogenicidade varia de acordo com a espécie e isolado de *Phytophthora*.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A patogenicidade varia de acordo com a espécie e isolado de *Phytophthora*;
- Todos os isolados de *P. capsici*, *P. palmivora* e *P. theobromicola* causaram lesões nas mudas de cacaueteiro enquanto as lesões formadas por *P. citrophthora* e *P. heveae* ficaram restritas ao tamanho do ferimento;
- Estudos adicionais envolvendo um número maior de isolados e diferentes genótipos de cacaueteiro devem ser realizados para melhor entendimento do cancro no cacaueteiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAZA, M. J. *et al.* **Mapping QTLs for Black pod (*Phytophthora palmivora*) resistance in three hybrid progenies of cocoa (*Theobroma cacao* L.) using SSR markers.** International Journal Of Scientific And Research Publications, v. 6, n. 1, p. 298-311, jan. 2016.
- ALI, S. S. *et al.* **PCR-based identification of cacao black pod causal agents and identification of biological factors possibly contributing to *Phytophthora megakarya*'s field dominance in West Africa.** Plant Pathology, v. 65, n. 7, p. 1095-1108, 15 fev. 2016.
- APPIAH, A. A. *et al.* **Natural occurrence and distribution of stem cankers caused by *Phytophthora megakarya* and *Phytophthora palmivora* on cocoa.** European Journal Of Plant Pathology, Holanda, v. 110, n. 10, p. 983-990, dez. 2004.
- BASTOS, C. N. *et al.* **Doenças do Cacaueiro.** In: AMORIM, L. *et al.* (ed.). Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças de Plantas Cultivadas. 5. ed. Ouro Fino, Minas Gerais: Agronômica Ceres. Cap. 20. p. 175-192. 2016.
- BAILEY, B.A., E MEINHARDT, L.W. **Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters.** Springer International Publishing Switzerland. 2016.
- BOEVINK, P. C. *et al.* **Devastating intimacy: the cell biology of plant-*Phytophthora* interactions.** New Phytologist, v. 228, n. 2, p. 445-458, 19 jun. 2020.
- BOURRET, T. B. *et al.* **A Barcode-Based Phylogenetic Characterization of *Phytophthora cactorum* Identifies Two Cosmopolitan Lineages with Distinct Host Affinities and the First Report of *Phytophthora pseudotsugae* in California.** Journal Of Fungi, v. 8, n. 3, p. 1-18, 16 mar. 2022.
- BRASIER, C. *et al.* ***Phytophthora*: an ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation.** Ima Fungus, v. 13, n. 1, p. 1-25, 27 jun. 2022.
- COUTO, V.A. **O território do cacau no contexto da mundialização.** Bahia: Bahia Análise & Dados, v.9, n.4, p. 38-52, mar. 2000.

DECLOQUEMENT, J. *et al.* ***Phytophthora theobromicola* sp. nov.:** a new species causing black pod disease on cacao in Brazil. *Frontiers In Microbiology*, v. 12, p. 1-15, 15 mar. 2021

DELGADILLO-DURÁN, P. *et al.* **A new method for the inoculation of *Phytophthora palmivora* (Butler) into cacao seedlings under greenhouse conditions.** *Plant Methods*, v. 16, n. 1, p. 1-7, 19 ago. 2020.

DELGADO-OSPINA, J. *et al.* **The Role of Fungi in the Cocoa Production Chain and the Challenge of Climate Change.** *Journal Of Fungi*, v. 7, n. 3, p. 202, 10 mar. 2021.

Food And Agriculture Organizations Of The United Nations – FAO DATABASE. Disponível em: [https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). Acesso realizado em 13 de jul. de 2023.

GUEST, David. **Black pod:** Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*. University of Sydney, Australia. p. 1650-1653, 2007.

GUO, J. *et al.* ***Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity.** *Plant Biology*, v. 11, n. 1, p. 57-67, jan. 2009.

HANSEN, E. M. *et al.* ***Phytophthora* Beyond Agriculture.** *Annual Review Of Phytopathology*, Oregon, v. 50, n. 1, p. 359-378, 8 set. 2012.

HO, H. H. **The Taxonomy and Biology of *Phytophthora* and *Pythium*.** *Journal Of Bacteriology & Mycology: Open Access*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 12 fev. 2018.

ICCO. The International Cocoa Organization. Annual Report 2015/2016. The International Cocoa Organization, Londres, Reino Unido. 2019. Disponível em: <https://www.icco.org/statistics/>. Acesso realizado em 13 de jul. de 2023.

LUZ, E. D. M. N. *et al.* **Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauero.** In: LUZ, E. D. M. N. *et al.* (ed.). *Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil*. Campinas, São Paulo: Livraria e Editora Rural - Ltda, 2001. Cap. 7. p. 175-266.

MENA, E. *et al.* **Soybean Stem Canker Caused by *Diaporthe caulivora*; Pathogen Diversity, Colonization Process, and Plant Defense Activation.** *Frontiers In Plant Science*, v. 10, p. 1-21, 23 jan. 2020.

Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). **Cacau do Brasil.** CEPLAC, Brasília. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/outras-publicacoes/cacau-do-brasil-versao-portugues>. Acesso em: 10 jul. 2023.

MULLETT, M. S. *et al.* **Phylogeography and population structure of the global, wide host-range hybrid pathogen *Phytophthora* × *cambivora*.** *Ima Fungus*, v. 14, n. 1, p. 1-18, 23 fev. 2023.

OLIVEIRA, D. H. R. **Revisão morfológica e molecular do gênero *Muriceopsis aurivillius*, 1931 (*Cnidaria: Octocorallia*) no Oceano Atlântico Ocidental.** 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2012.

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

OPOKU, I. Y. *et al.* ***Phytophthora megakarya*: a potential threat to the cocoa industry in ghana.** *Ghana Journal Of Agricultural Science*, v. 33, n. 2, p. 237-248, fev. 2000.

PEREIRA, J. L.; PIZZIGATTI, R.; MANDARINO, E. P. **Levantamento fitossanitário das áreas afetadas pelo cancro de *Phytophthora* do cacauero nos estados da Bahia e Espírito Santo.** Itabuna: CEPLAC. Boletim Técnico, 72. 1980.

PUIG, A. S. *et al.* ***Phytophthora palmivora* Causing Disease on *Theobroma cacao* in Hawaii.** *Agriculture*, v. 11, n. 5, abr. 2021.

PUIG, A. S. *et al.* ***Phytophthora* canker affecting CCN51 clones on high productivity cacao farms in Ecuador.** USDA Cocoa Laboratory. 2019

PUIG, A. S. *et al.* **Virulence tests of *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Phytophthora palmivora* on *Theobroma cacao*.** *European Journal Of Plant Pathology*, v. 159, n. 4, p. 851-862, 10 fev. 2021.

ROCHA, H. M. & RAM, C. **Cancro em cacauzeiros na Bahia. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC.** Revista Theobroma, Brasil, v.01, n.1, p. 44-47, jan-mar. 1971

RODRIGUES, M. R. S. **Descrição da cadeia produtiva do cacau no estado do Pará e a inserção do produto nos mercados nacional e internacional.** 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Economia, Universidade da Amazônia, Belém, Pará, 2006.

SANTOS, G. A. *et al.* **Produção de cacau (*Theobroma cacao* L.) no estado de Rondônia:** uma análise da variação da área produtiva em relação a variação dos indicadores do mercado. Cuadernos de Educación y Desarrollo, v. 15, n. 4, p. 3581-3602, 30 jun. 2023.

SILVA NETO P. J. *et al.* **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira.** Belém-PA, CEPLAC, 125p. 2001.

VERNA, R. **The history and science of chocolate.** Malays J Pathol. Sapienza University Of Roma, Itália, v. 2, n. 35, p. 111-121, dez. 2013.

WU, E. J. *et al.* **Diverse mechanisms shape the evolution of virulence factors in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* sampled from China.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, p. 1-10, 19 maio 2016.