

## MINIESTAQUIA EM ESPUMA FENÓLICA: NOVA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA À MURCHA DE *CERATOCYSTIS* EM CACAUEIRO

*Dilze Maria Argôlo Magalhães, George Andrade Sodré, Elisângela dos Santos, Larissa Argôlo Magalhães*

Centro de Pesquisas do Cacau, Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC, Rod. Ilhéus-Itabuna, km 22, Ilhéus, BA, 45662-000, Brasil. dilze@ceplac.gov.br, sodre@ceplac.gov.br, elissantos10@hotmail.com, lariargolo@yahoo.com.br.

A murcha de *ceratocystis* é uma importante doença do cacaueiro causada por *Ceratocystis cacaofunesta*. O fungo pode penetrar na planta através de ferimentos durante os tratamentos culturais, por meio de inseto vetor ou diretamente pelas raízes. Este trabalho objetivou testar a inoculação de *C. cacaofunesta* em raízes de cacaueiros propagadas por miniestaquia em espuma fenólica para seleção de resistência. O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisa do Cacau da Ceplac, Ilhéus, BA. Foram usadas miniestacas de ramos plagiotrópicos medindo de 6 a 10 cm de comprimento dos clones CCN-51, CEPEC-2002, cacau JACA, PH-16 e PS-1319. O delineamento foi em blocos casualizados e os tratamentos formados pelos clones com quatro repetições, seis miniestacas/repetição. O substrato usado para enraizamento foi espuma fenólica, as miniestacas foram mantidas em câmara de nebulização e após 60 dias foram inoculadas nas raízes. As raízes foram inicialmente aparadas para obtenção de lesões para facilitar a penetração do fungo e em seguida foram imersas por 24 h em 1L de inóculo de *C. cacaofunesta* ( $3,0 \times 10^4$  ui/mL). A avaliação ocorreu 15 dias após a inoculação pela contagem de sobrevivência das estacas. Verificou-se diferença significativa ( $P < 0,01$ ) para número de miniestacas sobreviventes, o cacau JACA teve 100% de sobrevivência, enquanto que CCN-51 apresentou menor sobrevivência (17%). Os clones CEPEC-2002 e PS-1319 com 63%, não diferiram do PH-16 (38%). O método mostrou-se fácil e de rápida execução e confirmou o comportamento dos clones cacau JACA (resistente) e CCN-51 (suscetível) a *C. cacaofunesta*, o que sugere o seu uso para selecionar genótipos de cacaueiro resistentes à murcha de *Ceratocystis*.

**Palavras-chave:** *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao*, estaquia de cacaueiro

**Mini cutting in phenolic foam: new tool to *Ceratocystis* wilt resistance evaluation in cocoa.** The *Ceratocystis* wilt is an important cacao disease caused by *Ceratocystis cacaofunesta*. The fungus can penetrate the plant through injuries during cultivation, by insect vector or directly by the roots. This study aimed to test the inoculation of *C. cacaofunesta* in cacao roots propagated by minicutting as a test to select for disease resistance. The experiment was conducted at the Cocoa Research Center Ceplac, Ilheus, BA. Minicutting of plagiotropic branches measuring between 6 to 10 cm length of the clones CCN-51, CEPEC-2002, cacao JACA, PH-16 and PS-1319 were used in a randomized blocks design with four replications of six plants per clone. The substrate used to rooting was phenolic foam, and cuttings were kept in a mist chamber and after 60 days were inoculated on the roots. The roots were trimmed to facilitate the fungus penetration and then were immersed for 24 h in 1 L of *C. cacaofunesta* inoculum suspension ( $3.0 \times 10^4$  iu/ml). The evaluation occurred 15 days after inoculation by counting the amount of surviving cuttings. Significant difference was found ( $P < 0.01$ ) cacao JACA with survival of 100%, while CCN-51 showed the lowest survival (17%). The clones CEPEC-2002 and 1319 PS-63% did not differ of PH-16 (38%). The method proved to be of easy and fast execution and confirmed the behavior of the clones cacao JACA (resistant) and CCN-51 (susceptible) to *C. cacaofunesta*. The method proved to be suitable to select resistance in cacao genotypes to *Ceratocystis* wilt.

**Key words:** *Ceratocystis cacaofunesta*, *Theobroma cacao*, cuttings of cacao

A murcha de ceratocystis causada pelo fungo *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. & T.C. Harr., (Engelbrecht; Harrington, 2005) conhecida popularmente como “mal do facão” é uma importante doença do cacauero (*Theobroma cacao* L.). Na Bahia a doença foi identificada pela primeira vez em mudas enxertadas e posteriormente no campo, em plantas adultas clonadas (Bezerra, 1997; Bezerra et al., 1998). Esta doença atualmente tem causado a morte de plantas em diferentes fases de desenvolvimento (Luz et al., 2013).

*Ceratocystis cacaofunesta* pode penetrar na planta por ferimentos, pelas ferramentas utilizadas na realização dos tratamentos culturais, principalmente a desbrota, a poda e a enxertia (Delgado; Suárez, 2003; Oliveira e Luz 2005). Também pode penetrar diretamente pelas raízes, pois sendo um fungo presente no solo a disseminação pode ocorrer pelo contato entre as raízes das plantas (Ferreira e Milani, 2002; Firmino et al., 2013), e pela casca através de insetos vetores dos gêneros *Xyleborus* e *Xylosandrus*, que disseminam propágulos do fungo de plantas doentes para sadias de forma direta e indireta (Oliveira e Luz, 2005; 2012).

*Ceratocystis cacaofunesta* é um patógeno de difícil controle, provoca danos irreversíveis no sistema vascular da planta e em pouco tempo a planta morre, mas as folhas mortas permanecem aderidas por muito tempo, passando o fungo a crescer no tecido em decomposição onde são formados os esporos sexuados e assexuados (Silva et al. 2004; Tumura et al. 2012). O uso de genótipos de cacaueros resistentes é o método mais eficiente para controle da doença (Silva et al., 2004, 2012; Delgado e Suárez, 2003; Baker e Harrington, 2004; Alarcon, 1994; Chong, 1961; Lawrence et al, 1991).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas para seleção de genótipos resistentes a murcha de ceratocystis usando metodologias de inoculação com pedaços de ramos destacados (Delgado e Echandi, 1965), inoculação em caule de plantas adultas no campo e em caules de mudas (Delgado e Suárez, 2003; Silva et al. 2004; 2007; 2012; 2013; Sanches, 2007; Oliveira et al. 2009.). Na obtenção de mudas clonais de cacaueros para testar a resistência ao *C. cacaofunesta* é necessário a esterilização do substrato e o uso de material em que o caule apresente aproximadamente 1,5 cm de diâmetro (Silva et al. 2004; 2007; 2012; 2013; Sanches, 2007).

O uso de miniestacas garante um enraizamento vigoroso e aumenta a capacidade de sobrevivência das estacas (Sodré, 2007). Por outro lado a espuma fenólica por ser um material estável, isento de patógenos e de fácil manejo, facilita a condução dos experimentos, principalmente quando comparado ao enraizamento com substrato em tubetes (Freitas et al. 2005). A espuma fenólica é constituída de material estéril, não interfere na nutrição das plantas e tem capacidade de prover boa sustentação para a muda, além de alta capacidade de retenção de umidade e aeração (Silva, 2012).

O trabalho teve como objetivo testar o método de inoculação de *C. cacaofunesta* aplicando o inóculo no sistema radicular de mudas de genótipos de cacaueros propagadas por miniestaquias em espumas fenólicas para seleção de resistência.

O experimento foi conduzido na Câmara de nebulização do Centro de Pesquisas do Cacau da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC, Ilhéus, BA. Foram utilizadas miniestacas dos clones CCN-51, CEPEC-2002, cacau JACA, PH-16 e PS-1319 oriundas de plantas matrizes do Banco de Germoplasma. O delineamento experimental foi em blocos com cinco clones e quatro repetições e a unidade experimental formada por seis miniestacas.

Hastes apicais herbáceas, de ramos plagiotrópicos (Figura 1A), foram coletadas pela manhã e transportadas para a casa de vegetação onde foram preparadas as miniestacas com quatro a cinco folhas e 6 a 10 cm de comprimento, tendo as bases cortadas transversalmente 2 mm abaixo da gema foliar. A primeira folha da base para o ápice foi reduzida em 50% e as demais em 20% do tamanho original (Figura 1B).

Após o corte as miniestacas foram colocadas em um Becker com água para mantê-las hidratadas (Figura 1C) e não foram tratadas com fungicida para não interferir no resultado da inoculação com *C. cacaofunesta*. Posteriormente tiveram a base imersa por 5 segundos em ácido indolburtírico (AIB) diluído em solução hidro alcoólica na concentração de 6.000 mg.L<sup>-1</sup> (Sodré, 2013) (Figura 1D). As miniestacas foram inseridas a 2 cm de profundidade do topo de espumas fenólicas retangulares (2,5 x 2,5 x 5 cm) pré umedecidas (Figura 1E), fixadas verticalmente em bandejas plásticas e imediatamente conduzidas à câmara de nebulização, programada para

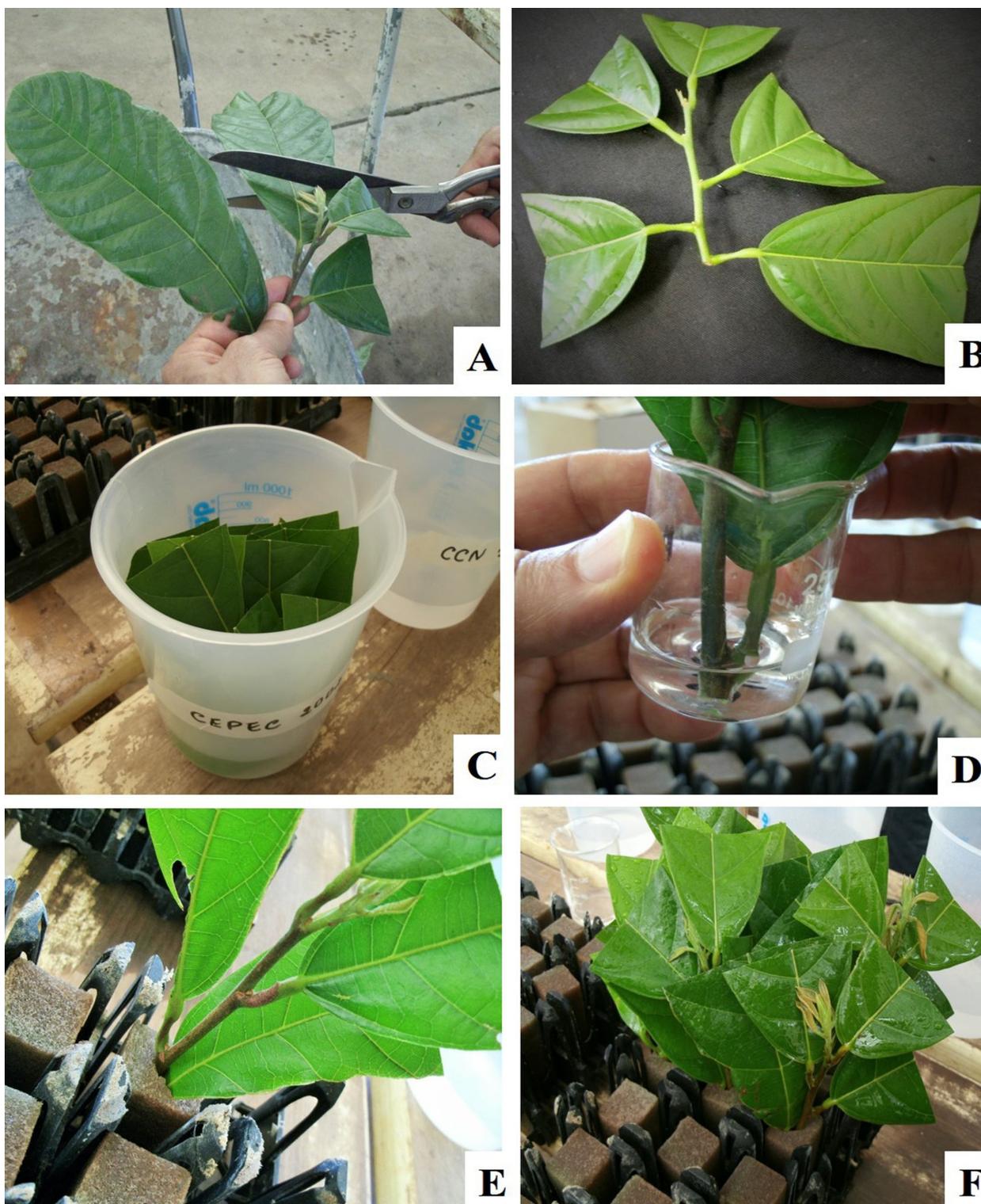


Figura 1 - Inoculação de *C. cacaofunesta* nas raízes de cacaueiros: (1A) miniestacas apicais herbáceas, de ramos plagiotrópicos; (1B) Miniestacas, com 4 a 5 folhas, a primeira folha reduzida em 50% e as demais em 20% do tamanho; (1C) Colocadas em água para manter hidratação; (1D) Tratando-as no ácido indolbultírico; (1E,F) Inseridas a 2 cm de profundidade em espumas fenólicas e fixadas verticalmente em bandejas.

microaspersão diária por 10 segundos a cada dez minutos das 6:00 às 18:h. (Figura 1F) (Sodré, 2013). A fim de garantir a nutrição mineral das estacas enraizadas, aos 30 e 45 dias cada espuma recebeu 5 mL de solução de Hoagland ( $\frac{1}{4}$  de força iônica).

A inoculação de *C. cacaofunesta* foi realizada aos 60 dias da permanência das miniestacas em espuma fenólica. Antes da inoculação as estacas com sistema radicular maior foram selecionadas (Figura 2 A); e as raízes foram aparadas com a finalidade de obter lesões para facilitar a penetração do fungo (Figura 2B). O inóculo de *C. cacaofunesta* foi preparado utilizando culturas do isolado Cc20 (Figura 2C), na concentração de  $3,0 \times 10^4 \mu\text{mL}$ . Em seguida, as bandejas contendo as estacas foram colocadas em caixas plásticas onde foi depositado 1L de inóculo. O sistema radicular das estacas ficou imerso na suspensão de inóculo por um período de 24 horas em câmara úmida (Figura 2D, E). Após esse período o inóculo foi drenado e as bandejas encaminhadas para câmara de nebulização.

A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação, pela contagem de estacas vivas e mortas (Figura 2F). Os dados foram submetidos à análise de variância e por não apresentarem distribuição normal foram transformados em raiz quadrada de  $X + 0,5$ . As médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2004).

Os clones apresentaram diferentes reações ao patógeno e este foi reisolado das plantas com sintomas. Foi verificada diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre o clone cacau JACA em relação aos demais clones com 100% de estacas vivas enquanto o clone CCN-51 foi o que menos sobreviveu e apresentando apenas 17% de estacas vivas. Os clones CEPEC-2002 e PS-1319 apresentaram resistência intermediária ao patógeno com um percentual de 63% de estacas vivas, mas não diferiram estatisticamente de PH-16 com 38% e este também não diferiu de CCN-51. O coeficiente de variação do experimento (14,95%) atesta a precisão do mesmo.

Estes resultados confirmam o comportamento de resistência do cacau JACA em testes anteriores (Silva et al. 2004, 2007, 2012, 2013; Oliveira et al., 2009) e a alta resistência ao *C. cacaofunesta* que supera os demais clones, sendo normalmente utilizado como padrão de resistência (Silva et al. 2004).

O cacau JACA distinguiu-se estatisticamente de todos os demais clones com 100% de estacas vivas, enquanto os clones CEPEC-2002 e PS-1319 mostraram-se menos resistentes que o cacau JACA, porém apresentam resistência quando comparados ao padrão de suscetibilidade (CCN-51). Confirmaram-se também resultados anteriores que indicaram o clone CCN-51 como padrão de suscetibilidade. Nesse contexto deve-se destacar que o clone CCN - 51 foi anteriormente avaliado como suscetível tanto em inoculação em mudas, como em galhos no campo (Luz et al. 2000; Magalhães et al, 2012; Silva et al., 2004, 2012, 2013).

O uso de miniestacas enraizadas em espuma fenólica auxiliou e facilitou a avaliação de resistência dos genótipos de cacau ao *C. cacaofunesta*. Isso ocorreu devido à praticidade na obtenção de estacas em curto espaço de tempo (60 dias) entre o enraizamento e a inoculação com *C. cacaofunesta* e 15 dias para a avaliação dos resultados. Desta forma, entende-se que com esse método será possível testar a resistência de maior número de clones, independente da época do ano. Deve-se também destacar a forma segura e prática de realizar a inoculação, por não haver necessidade de transportar o patógeno para o campo, como ocorre na inoculação de plantas adultas e a rápida obtenção dos resultados, já aos 15 dias após a inoculação.

O método descrito nessa pesquisa permite avaliar além da resistência à murcha de ceratocystis, a taxa de enraizamento dos genótipos estudados. Pode ser também usado em estudos onde se verifica que o solo ou o substrato podem interferir na avaliação de resultados, como por exemplo: nos testes de controle biológico *in vivo* do patógeno por antagonistas e nas avaliações de indução de resistência por compostos minerais.

A miniestaquia com enraizamento em espuma fenólica mostrou-se de fácil e rápida execução em raízes de cacau e pode ser usada para selecionar genótipos de cacau resistentes à murcha de ceratocystis.

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos Servidores da Ceplac: Edmundo Dias de Andrade pelo treinamento ministrado; a Ana Rosa Rocha Niella, Virgínia Oliveira Damaceno,

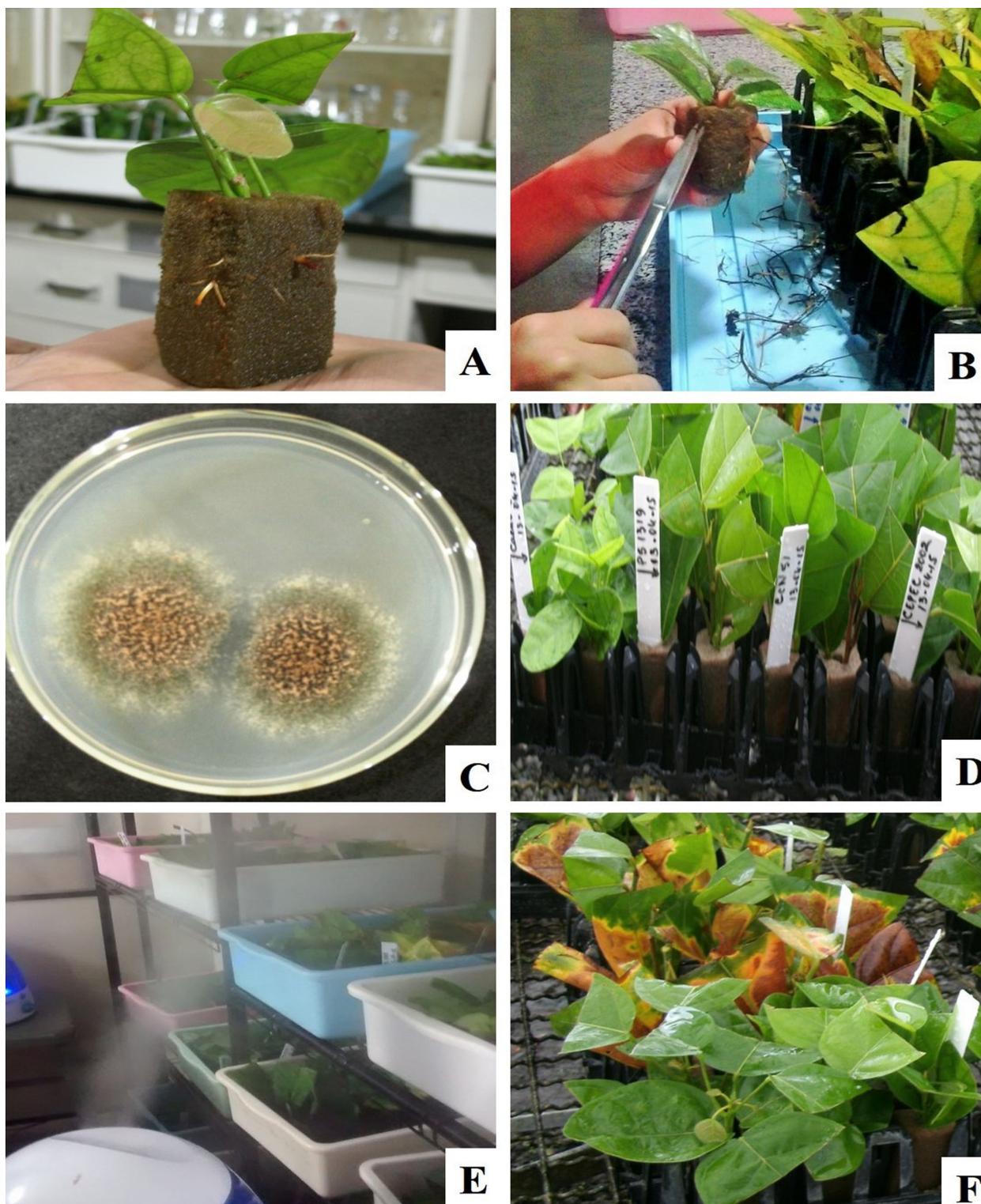


Figura 2 - Inoculação de *C. cacaofunesta* nas raízes de mudas de cacauzeiros: (2A) Seleção de mudas enraizadas; (2B) As raízes foram aparadas para a obtenção de lesões e penetração do fungo; (2C) Colônias de *C. cacaofunesta* usadas no preparo do inóculo; (2D, E) As bandejas contendo as mudas foram imersas no inóculo por 24 h em câmara úmida; (2F) Avaliação aos 15 dias após a inoculação pela contagem de mudas vivas e mortas.

Ananias Virginio de Jesus e Arnaldo de Souza Santos pelo apoio na condução do experimento em casa de vegetação e laboratório e a Lindolfo Pereira dos Santos pela contribuição nas análises estatísticas.

### Literatura Citada

- ALARCON, C. R. M. 1994. Determinación de resistencia de 250 clones de cacao de origen nacional al ataque de mal de machete. Graduation Thesis. Guayaquil, Universidad Agraria del Ecuador.
- BAKER, C. J.; HARRINGTON, T. C. 2004. *Ceratocystis fimbriata*. In: Crop protection compendium. Kew Surrey, CABI Publishing. pp.14.
- BEZERRA, J. L., et al. 1998. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no Estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 23:228 (Resumo 117).
- BEZERRA, J. L. 1997. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. *Incoped Newsletter* 1:6.
- CHONG, G. L. 1961. Desarrollo de la infección y naturaleza de la resistencia clonal a *Ceratocystis fimbriata*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agronomo. Guayaquil, Ecuador, Universidad de Guayaquil. Facultad de Agronomía Y Veterinaria. 120p.
- DELGADO, U.; ECHANDI, E. 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal del machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. *Turrialba (Costa Rica)* 15:286-289.
- DELGADO, R.; SUÁREZ, C. 2003. Diferencias en agresividad entre aislamientos de *Ceratocystis fimbriata* de Ecuador y Brasil en cacao. In: Seminário Nacional de Sanidad Vegetal 12º, Lacatunga. Proceedings. Lacatunga, Ecuador. 8p.
- ENGELBRECHT, C. J. B.; HARRINGTON, T. C. 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia* 97:57-69.
- FERREIRA, F. A.; MILANI, D. 2002. Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. *Mogi Guaçu, SP, International Paper*. p. 104.
- FIRMINO, A. C.; TOZZE JUNIO H. J.; DE SOUZA, I. C. G. 2013. Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* spp. *Scientia Forestalis (Brasil)* 41(98):165-173.
- FREITAS, T. A. S., et al. 2005. Desempenho radicular de mudas de eucalipto produzidas em diferentes recipientes e substratos. *Revista Árvore (Brasil)* 29(6):853-861.
- LAWRENCE, J. S.; CAMPÊLO, A. M. F. L.; FIGUEIREDO, J. M. 1991. Enfermidades do cacau. III - Doenças fúngicas vasculares e radiculares. *Agrotrópica (Brasil)* 3(2): 65-73.
- LUZ, E. D. M. N., et al. 2013. Atualidades no manejo de doenças do cacau no Brasil. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia, org. *Patologia Florestal: desafios e perspectivas*. 1ºed. Lavras - MG, NEFIT - Núcleo de Estudos em Fitopatologia. pp. 313-334.
- LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M.; GRAMACHO, K. P. 2000. Seleção de clones de cacau para resistência a *Ceratocystis fimbriata*. *Fitopatologia Brasileira* 25 (Supl). 389 p.
- MAGALHÃES, D. M. A., et al. 2012. Seleção de Clones Resistentes à *Ceratocystis Cacaofunesta* - Propagação Vegetativa In Congresso Brasileiro do Cacau, 3º. Minibanners. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. *Boletim Técnico (Edição Especial)*. pp. 70.
- OLIVEIRA, B. F., et al. 2009. Identificação de fontes de resistência a *Ceratocystis cacaofunesta* em mudas de cacau. *Agrotrópica (Brasil)* 21: 83-88.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil, Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. 132 p.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2012. Principais doenças do cacau e seu manejo. In Valle, R. R., org. *Ciência, tecnologia e manejo do cacau*. 2ed. Brasília, DF, MAPA/CEPLAC. pp. 187-275.
- SANCHES, C. L. G. 2007. Murcha-de-ceratocystis (*Ceratocystis cacaofunesta*) no sul da Bahia: metodologia para seleção de genótipos de cacau resistentes e estudos preliminares descritivos do patógeno. *Dissertação Mestrado*. Ilhéus, BA, UESC. 61p.
- SAS INSTITUTE. 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide. SAS Institute, Cary, NC. 5121p.
- SILVA, P. H. M. da., et al. 2012. Produção de mudas clonais de eucalipto em espuma fenólica: crescimento inicial e mortalidade. *Cerne (Brasil)* 18(4):639-649.
- SILVA, S. D. V. M.; PAIM, M. C.; CASTRO, W. M. 2004. Cacau Jaca resistente a *Ceratocystis fimbriata* na Região Cacaueira da Bahia, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 29: 538-540.
- SILVA, S. D. V. M., et al. 2007. Reação de genótipos de cacaueiros a isolados de *Ceratocystis cacaofunesta*. *Fitopatologia Brasileira* 32:504-506.
- SILVA, S. D. V. M., et al. 2012. Resistência de progênies de cacaueiros à murcha-de-Ceratocystis. *Tropical Plant Pathology* 37:191-193.
- SILVA, S. D. V. M., et al. 2013. Seleção de clones de cacaueiros resistentes à murcha-de-Ceratocystis em condições de campo. *Agrotrópica (Brasil)* 25:163-170.
- SODRÉ, G. A. 2007. Substratos e estaquias na produção de mudas de cacaueiros. *Tese Doutorado*. Jaboticabal, SP, UNESP. 84p.
- SODRÉ, G. A. 2013. Formação de mudas de cacaueiros, onde nasce a boa cacaucultura. Ilhéus, BA. CEPLAC/CEPEC. *Boletim Técnico*, nº 202. 48p.
- TUMURA, K. G.; DE PIERI, C.; FURTADO, E. L. 2012. Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 38(1): 54-60.