

ESCALA DE NOTAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE PERITÉCIOS DE *Ceratocystis cacaofunesta* EM DISCO DE FOLHAS DE CACAUEIRO

Larissa Argôlo Magalhães², Alessandro Santos da Conceição²,
Dilze Maria Argôlo Magalhães¹, Wilson Wanderley Lopes¹, George Andrade Sodré^{1,2},
Edna Dora Martins Newman Luz^{1,2}

¹CEPLAC - km 22, Rod. Ilhéus-Itabuna. 45600-970, Itabuna-Bahia. ²UESC - Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16 - Salobrinho. Ilhéus- Bahia. E-mails: lariargolo@yahoo.com.br; alessandro-sc@hotmail.com; dilze.argolo@yahoo.com.br; uvlopesbr@gmail.com; gasodre@hotmail.com; ednadora@yahoo.com.br

O melhoramento genético do cacauéiro é uma alternativa promissora para o controle da murcha-de-*Ceratocystis*. Este estudo teve como objetivos: i) elaborar e validar uma escala de notas para estimar o número de peritécios de *Ceratocystis cacaofunesta* em discos de folhas de cacaueiros, aprimorando o método Leaf Disc (LD); ii) avaliar clones quanto à severidade da doença usando a escala. A escala possui cinco notas: 0 (sem peritécios), 1 (1 a 10), 2 (11 a 30), 3 (31 a 60) e 4 (acima de 60). Ela foi testada em três experimentos: I- Testaram-se quatro clones (CACAU JACA e TSH 1188 - resistentes; CCN 51 e SJ 02 - suscetíveis), inoculados com suspensões (3x10t e 10t UFC/ml) em 40 discos/clone, avaliados por duas pessoas experientes no método LD. A escala diferenciou os clones com alta precisão e acurácia ($R^2 = 0,968$ e $0,9443$). II- Clones CCN 51 e CACAU JACA foram inoculados (10t UFC/ml) em 40 discos/clone, avaliados por cinco pessoas (duas experientes e três inexperientes). O R^2 médio foi $0,9327$ (experientes) e $0,8077$ (inexperientes). III- Testaram-se 27 clones, além de CACAU JACA e CCN 51, quanto à severidade, inoculando 35 discos/clone (3x10t UFC/ml). As notas foram usadas para calcular o índice de McKinney. SIAL 505 e CACAU JACA apresentaram menor severidade, enquanto CCN 51 e ICS 40 mostraram maior severidade. A escala foi eficiente na avaliação da severidade da murcha-de-*Ceratocystis*.

Palavras-chave: Murcha-de-*Ceratocystis*, severidade da doença, avaliação de resistência, aprimoramento de metodologia.

A grading scale for counting the number of *Ceratocystis cacaofunesta* perithecia in cacao leaf discs. The genetic improvement of cocoa trees is a promising alternative for controlling *Ceratocystis* wilt. This study aimed to: i) develop and validate a rating scale to estimate the number of *Ceratocystis cacaofunesta* perithecia on cocoa leaf discs, improving the Leaf Disc (LD) method; ii) evaluate clones for disease severity using a scale. The scale has five notes: 0 (no perithecia), 1 (1 to 10), 2 (11 to 30), 3 (31 to 60) and 4 (above 60). It was tested in three experiments: I- Four clones were tested (CACAU JACA and TSH 1188 - resistant; CCN 51 and SJ 02 - susceptible), inoculated with suspensions (3x10t and 10t CFU/ml) in 40 discs/clone, evaluated by two people experienced with LD method. The scale differentiated the clones with high precision and accuracy ($R^2 = 0.968$ and 0.9443). II- The CCN 51 and CACAU JACA clones were inoculated (10t CFU/ml) in 40 discs/clone, evaluated by five people (two experienced and three inexperienced). The average R^2 was 0.9327 (experienced) and 0.8077 (inexperienced). III- 27 clones were tested, in addition to CACAU JACA and CCN 51, for severity, inoculating 35 discs/clone (3x10t CFU/ml). The scores were used to calculate the McKinney's index. SIAL 505 and CACAU JACA presented lower severity, while CCN 51 and ICS 40 presented greater severity. The scale was efficient in evaluating the severity of *Ceratocystis* Wilt.

Key words: *Ceratocystis* wilt, disease severity, resistance evaluation.

Introdução

O fitopatógeno causador da murcha-de-*Ceratocystis*, conhecida popularmente por “mal do facão”, foi primeiramente descrito como *Ceratocystis fimbriata* por Ellis & Halsted e mais recentemente renomeado como *Ceratocystis cacaofunesta* Engelbr. & T.C. Harr. (Engelbrecht; Harrington, 2005). A murcha-de-*Ceratocystis* é uma importante doença do cacaueiro, que inicialmente foi observada e descrita em 1918 no Equador por Rorer (Mata, 1991; Delgado; Suaréz, 2003), e depois, em países vizinhos como: Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Guatemala, Haiti, México, República Dominicana e Trinidad e Tobago, em meados da década de 1970. No Brasil, a doença foi observada em 1978 no estado de Rondônia, onde já causava danos consideráveis à cacaicultura (Bastos; Evans, 1978). Sua importância se dá por ser uma enfermidade letal ao cultivo (Alarcon, 1994).

No estado da Bahia, a doença foi observada nos anos de 1997 e 1998 em mudas na casa de vegetação e plantas jovens em campo (Bezerra, 1997; Bezerra et al., 1998). Na região cacaueira da Bahia, a enfermidade foi amplamente disseminada e as mortes ocorreram, principalmente, nas progêneres derivadas do clone ICS-1, como a variedade Theobahia (cruzamento entre SCA-6 x ICS-1) (Silva; Luz, 2000; Ram et al., 2004; Almeida et al., 2005).

Quando a murcha-de-*Ceratocystis* surgiu na Bahia, a vassoura de bruxa, descoberta em 1989 (Pereira et al., 1989), já era responsável por uma crise séria na região e elevadas perdas na produção cacaueira baiana, uma vez que Bahia era então considerada o estado com a maior produção de cacau do Brasil, situação que se agravou a partir da ocorrência da murcha-de-*Ceratocystis* (Oliveira; Luz, 2012).

O gênero *Ceratocystis* pertence à divisão Ascomycota e é amplamente disseminado no mundo. No Brasil, há relatos de três espécies: *Ceratocystis paradoxa*, que coloniza monocotiledôneas; *C. cacaofunesta* que é específica do cacaueiro; enquanto *C. fimbriata* possui diversos hospedeiros entre plantas lenhosas e herbáceas (Engelbrecht; Harrington, 2005).

As culturas do fungo no meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA), tem inicialmente coloração esbranquiçada, posteriormente apresenta coloração acinzentada, mudando para negra. Peritécios escuros

surgem em certas áreas do micélio imersos no meio de cultura e são visíveis a olho nu e, quando estão maduros, na extremidade apresentam gotas amarelas que são formadas pelos ascósporos, liberados pelos ascos, localizados no interior dos peritécios (Engelbrecht; Harrington, 2005). Na parte superficial das hifas, formam-se os endoconidióforos e nestes, os endoconídios, que quando rompem o conidióforo, saem em cadeias ou sozinhos. O fungo também forma os clamidósporos que são estruturas de resistência, e tais estruturas se encontram no cacaueiro em campo (Luz et al., 2013).

Todas as estruturas acima descritas além de fragmentos de micélio, podem estar presentes na suspensão de esporos que é usada para inoculação e avaliação de resistência. Por isso, há necessidade de se expressar a concentração da suspensão em unidades formadoras de colônias (Magalhães et al., 2016).

Assim o melhor e mais eficiente método de controle da murcha-de-*Ceratocystis* é o uso de variedades resistentes (Delgado, 2003; Delgado; Suaréz, 2003; Silva et al., 2004). Existem alguns métodos utilizados para avaliação e seleção de genótipos resistentes a *C. cacaofunesta*, tais como inoculação em galhos de plantas adultas, inoculação em mudas em casa de vegetação e, mais recentemente o método de discos de folhas (LD) inoculados com *Ceratocystis* (Magalhães et al., 2016), que tem se mostrado eficiente em recente publicação (Santos et al., 2021) e remove as dificuldades apresentadas pelos métodos anteriormente citados. No entanto, para tornar o método LD ainda mais fácil de ser adotado, era necessário dar mais praticidade à quantificação do número de peritécios. Este estudo teve como objetivo: avaliar clones testados e não testados quanto à severidade da doença usando uma nova escala de notas.

Material e Métodos

Repicagem do fungo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de *Ceratocystis* da Seção de Fitopatologia do Centro de Pesquisa do Cacau - CEPLAC/CEPEC em Ilhéus-BA. Foi utilizado nos dois primeiros experimentos, o isolado de *Ceratocystis cacaofunesta* Cc20 (Figura 1A),

oriundo de Ilhéus. Para o terceiro experimento, inoculação de vários clones, foi utilizada a mistura composta pelas suspensões dos isolados Cc62 - Cc63 - Cc64 e Cc65, provenientes de Mutuípe, por ter sido o município onde foi coletado o maior número de isolados de *C. cacaofunesta* em coletas feita pela equipe do Laboratório de *Ceratocystis* da Seção de Fitopatologia-CEPEC-CEPLAC de 2010 a 2012 (dados não publicados). Todos os isolados pertencem à coleção de *Ceratocystis* do CEPEC-CEPLAC. Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA) e conservados em BOD a 24°C durante dez dias para crescimento da cultura e preparo do inóculo.

Escala de notas:

A escala foi proposta com cinco notas 0, 1, 2, 3 e 4:
nota 0 = não formação de peritécios;
nota 1 = de 1 a 10 peritécios;
nota 2 = de 11 a 30 peritécios;
nota 3 = de 31 a 60 peritécios
nota 4 = acima de 60 peritécios.

Experimentos para aplicação e teste da escala de notas

Foram realizados três experimentos para testar a escala de notas:

Experimento 1

Foram coletadas folhas de cacaueiro ainda não maduras, estágio intermediário dos clones CCN 51 e SJ 02 (padrões de suscetibilidade), CACAU JACA e TSH 1188 (padrões de resistência). Em seguida, as folhas foram lavadas, removida a nervura central com uma lâmina (Figura 1B), discos de folhas de 1,5 cm de diâmetro foram cortados por um cortador semiautomático (Figura 1C) e arrumados com o lado abaxial para cima, sobre espuma umedecida com água (Figura 1D). Foram utilizados 40 discos de folhas por clone e por concentração de inóculo do isolado Cc 20 de *C. cacaofunesta*, que foram 3×10^4 UFC/ml e 10^4 UFC/ml. Cada disco foi inoculado com 20 µL da suspensão de inóculo e foram mantidos em caixas plásticas formando os blocos (Figura 1E). Quatro dias após a inoculação, utilizando um estereomicroscópio, foi avaliado o número médio de peritécios (Figura 1F) formado por cada clone, através da contagem, e posteriormente, aplicando a escala de notas, foi obtida

a média das notas atribuídas por cada avaliador. Neste experimento, a avaliação foi feita por dois avaliadores experientes (avaliadores que desenvolvem leitura de peritécios e trabalham com *Ceratocystis* há tempo hábil para ter uma leitura assertiva e eficiente) quanto à utilização do método LD e contagem do número de peritécios (Magalhães et al., 2016). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O número médio de peritécios e a média das notas foram comparados pelo teste Tukey ($p < 0,05$), os dados foram transformados pelo método ($\log_{10} + 1$), usando o software R versão 4,1. A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinadas por meio de regressão linear simples, entre o número real de peritécios e o valor estimado pelos avaliadores utilizando a escala de notas.

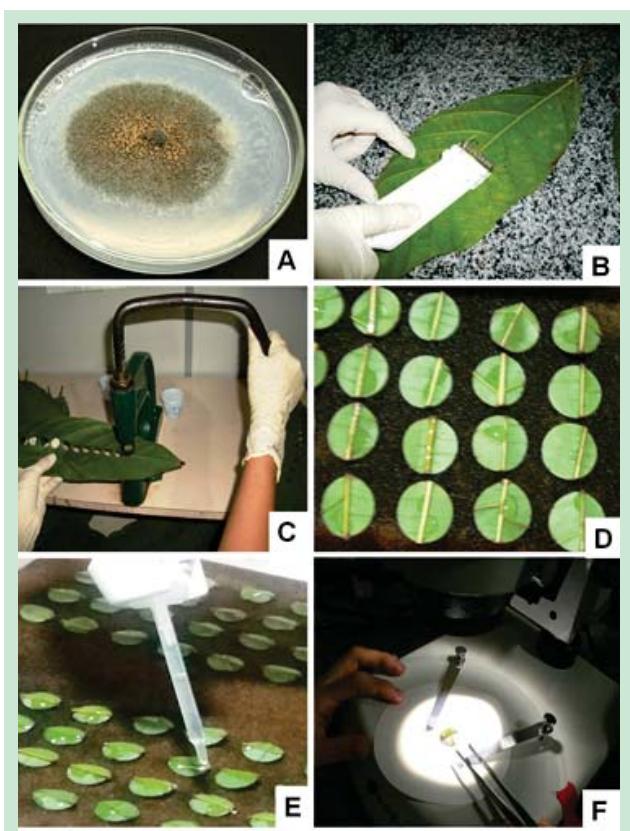


Figura 1 (A-F): Metodologia de inoculação de *Ceratocystis cacaofunesta* em disco de folhas: (A) cultura do isolado de *C. cacaofunesta* - Cc 20; (B) remoção superficial da nervura central da folha com uma lâmina; (C) discos de folhas cortados por um cortador semiautomático; (D) discos de folhas arrumados com o lado abaxial para cima em espuma umedecida; (E) inoculação dos discos com 20 µL da suspensão; (F) avaliação dos discos inoculados utilizando um estereomicroscópio.

Experimento 2

Foi realizada a inoculação, utilizando os clones CCN-51 (testemunha de suscetibilidade) e CACAU JACA (testemunha de resistência). Foram cortados 40 discos de folhas por clone, colocados sobre espuma umedecida e inoculados 20 μl por disco, na concentração 10^4UFC/ml de inóculo do isolado Cc 20 de *C. cacaofunesta*. Quatro dias após a inoculação foi avaliado o número médio de peritécios, formado por cada clone, através da contagem, e posteriormente, aplicando a escala de notas, foram atribuídas notas e a média foi determinada por clone e por avaliador. Neste experimento, a avaliação foi feita por cinco avaliadores, sendo dois experientes e três inexperientes quanto à utilização do método discos de folhas e contagem do número de peritécios (Magalhães et al., 2016). A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinadas por meio de regressão linear simples, entre o número real de peritécios e o valor estimado utilizando a escala de notas.

Experimento 3

Para avaliar a severidade da doença usando a escala de notas foram testados 29 clones do Banco de Germoplasma do CEPEC-CEPLAC: CS 40, CHUAO 120, SIAL 05, CEPEC 4, UF 12, UF 707, EET 103, TSA 654, APA 4, CEPEC 2002, SCA 6, 21 PJ, RIM 44, SIC 20, SIC 23, UF 713, CC 37, RB 32, SGU 60, RIM 106, SIAL 325, CC 11, EET 59, TSA 656, EET 53, PA 169, SCA 12, CACAU JACA (padrão de resistência) e CCN 51 (padrão de suscetibilidade). O procedimento foi o mesmo descrito no experimento 1, com a variação de haver usado 35 discos de folhas por clone, cinco discos de cada clone por bandeja, arrumados, com a superfície abaxial para cima, em caixas plásticas contendo espumas umedecidas (5 discos x sete blocos). Foi preparada a suspensão de inóculo da mistura de quatro isolados de *C. cacaofunesta* (Cc62 - Cc63 - Cc64 e Cc65), na concentração $3 \times 10^4\text{UFC/ml}$ e cada disco foi inoculado com 20 μl da suspensão de inóculo (Magalhães et al., 2016). Quatro dias após a inoculação, foi avaliado o número médio de peritécios, através da contagem, e posteriormente, aplicando a escala de notas, foram atribuídas notas e a média foi determinada por clone. Neste experimento, a avaliação foi feita por um avaliador experiente quanto à contagem do número

de peritécios em discos de folhas. A partir das notas foi determinado o índice de severidade da doença utilizando a fórmula de McKinney (1923), pela expressão: $(SEV = [\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100)$. A média de severidade da doença obtida foi analisada através do Teste Scott Knott ($p < 0,05$), usando o software R versão 4,1.

Resultados e Discussão

Para validar a escala, no primeiro experimento, dois avaliadores experientes (Av 1 e Av 2), estimaram o número de peritécios a partir de 40 discos por clones, em duas inoculações e duas concentrações. Observou-se que não houve diferença significativa na reação dos clones CACAU JACA, TSH 1188, SJ 02 e CCN 51 para as duas concentrações de inóculo $3 \times 10^4\text{UFC/ml}$ e 10^4UFC/ml , porém foi observado formação de menos micélio quando utilizada a concentração 10^4UFC/ml , o que facilitou um pouco mais a avaliação. Na avaliação de peritécios de *C. cacaofunesta* em discos de folhas (Figura 2A) observam-se normalmente discos com ausência de peritécios, discos com formação de poucos peritécios e micélio, de fácil avaliação (Figura 2B e C) ou ainda, com maior quantidade de peritécio e micélio, dificultando a avaliação (Figura 2D).

Observou-se também que não houve diferença entre métodos de avaliação, contagem do número de peritécios e atribuição de notas aplicando a escala. Portanto, a escala de notas proposta foi eficiente em diferenciar os clones resistentes (CACAU JACA e TSH 1188) e suscetíveis (CCN 51 e SJ 02) por ambos os avaliadores ($P < 0,01$) (Figura 3).

A acurácia e a precisão de cada avaliador foram determinadas por meio da regressão linear entre o número de peritécios real e o estimado. O avaliador 1 apresentou o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,968$, enquanto o avaliador 2 o coeficiente de determinação de $R^2 = 0,9443$, com correlação média de 0,9561, portanto, observou-se uma correlação positiva com precisão e acurácia entre os dois observadores (Figura 4A e B). Além do coeficiente de determinação, a precisão foi medida pelo erro absoluto, que é a diferença entre as notas estimadas e as notas reais (NUTTER; SHULTZ, 1995), tendo o

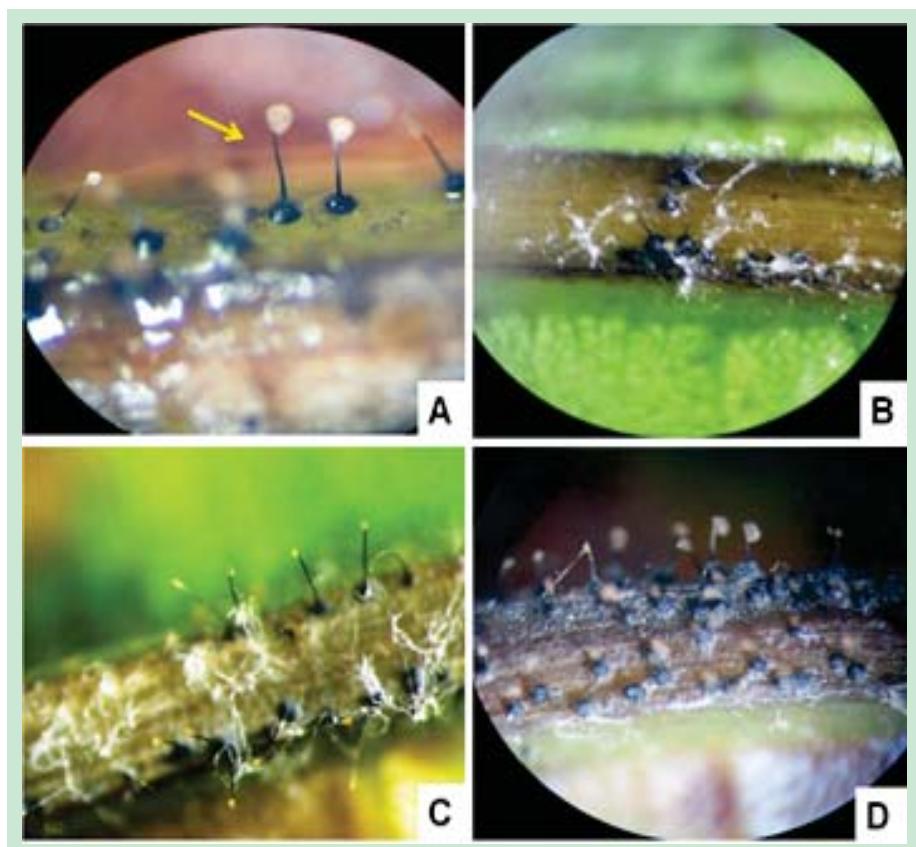


Figura 2 – Discos de folhas inoculados com *C. cacaofunesta* (A) Peritécios com gota mucilaginosa contendo as estruturas sexuais (ascósporos); (B e C) Discos de folha com pouco peritécio e micélio (D) discos com maior quantidade de peritécio.

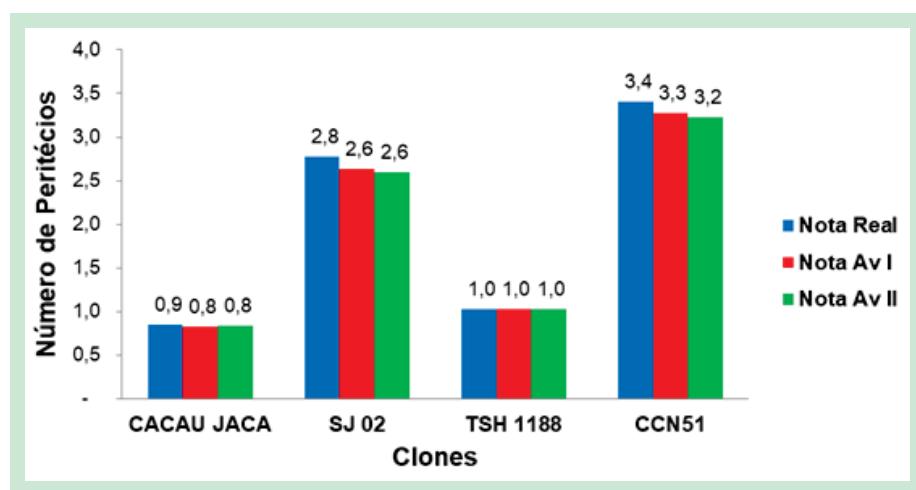


Figura 3- Número médio de peritécios (Nota real) e média das notas estimadas por dois avaliadores (Nota Av 1 e Nota Av 2), aos clones de cacaueiro CCN 51, SJ 02 (padrões de suscetibilidade) CACAU JACA, e TSH 1188 (padrões de resistência) inoculados com *Ceratocystis cacaofunesta*.

avaliador 1 apresentado um desvio de 4% e o avaliador 2 de 6% (Figura 5A e B).

No segundo experimento, testando os clones CCN 51 e CACAU JACA o resultado foi aferido por dois avaliadores experientes e três inexperientes quanto à utilização do método disco de folhas para a avaliação de *C. cacaofunesta*, todos os cinco avaliadores diferenciaram o clone resistente (CACAU JACA) do suscetível (CCN 51). O coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,9557 (avaliador 1) a 0,7597 (avaliador 4) (Figura 6).

A correlação entre a média real de números de peritécios e a estimada pelos avaliadores 1 e 2, ambos experientes, foi de R^2 de 0,9557 e 0,9109 respectivamente. Foi observado uma correlação positiva com alta precisão e acurácia, além de maior aproximação do valor estimado pelos avaliadores (1 e 2) com o valor real do que no primeiro experimento, pois houve menor dispersão dos valores estimados (Figuras 6A e B). Nas notas estimadas pelos avaliadores 3, 4 e 5, inexperientes quanto ao uso do método, o coeficiente de determinação (R^2) variou de 0,8823 (Avaliador 3) a 0,7597 (Avaliador 4) (Figura 6 C-E), com média dos três avaliadores de 0,8077. Foi observado maior dispersão dos valores estimados pelos avaliadores 3, 4 e 5, em

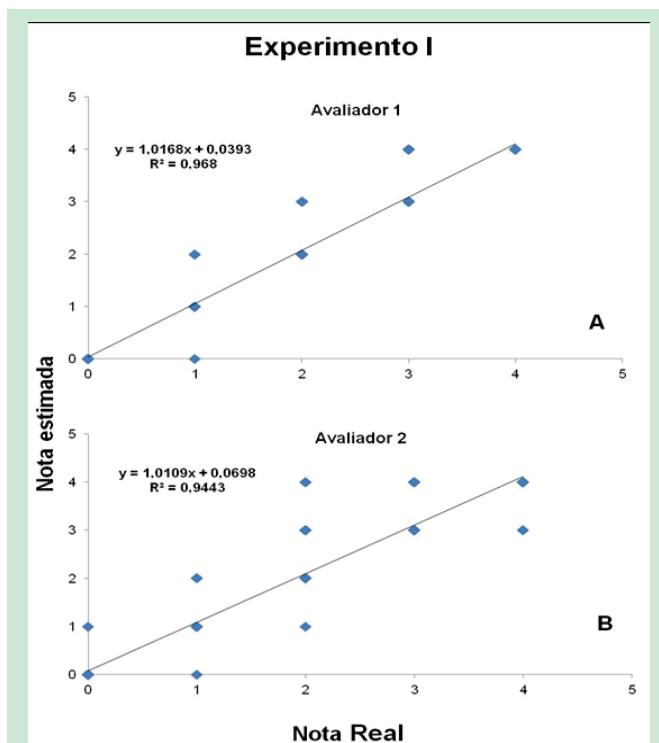


Figura 4 - Correlação entre o número real de peritécios e os valores estimados por 2 avaliadores experientes (Av 1 e 2), através da escala de notas, à reação dos clones CACAU-JACA, TSH 1188, SJ 02 e CCN51 inoculados com *C. cacaofunesta* em discos de folhas de cacau.

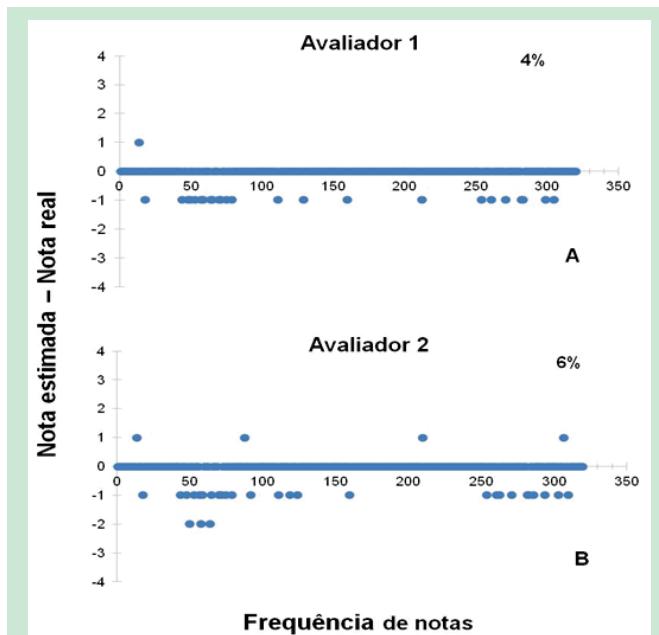


Figura 5 - Erros absolutos (nota estimada menos a nota real) dos dois avaliadores experientes, utilizando a escala de notas para estimar o número de peritécios de *C. cacaofunesta* formados em discos de folhas dos clones CCN 51, SJ 02, TSH 1188 e CACAU JACA.

relação aos valores estimados pelos avaliadores 1 e 2. Quanto ao erro absoluto, os desvios dos avaliadores variaram de 2 a 14% (Figura 7A-E).

No terceiro experimento foi avaliada a severidade da doença murcha-de-*Ceratocystis* em 29 clones de cacau com utilizando a escala de notas e a fórmula de McKinney (1923). Foi observada correlação positiva, acurácia e precisão ($R^2=0,9355$) entre o número real de peritécio e a nota estimada (Figura 8).

Os clones foram divididos em cinco grupos distintos quanto à severidade: no grupo a está o CCN 51 (96%), testemunha de suscetibilidade; grupo b está somente o ICS 40 com 79% de severidade; grupo c formado por 21 clones (CHUAO 120, CEPEC 4, UF 12, UF 707, EET 103, TSA 654, APA 4, CEPEC 2002, SCA 6, 21 PJ, RIM 44, EET 59, TSA 656, EET 53, PA 169, SCA 12, SIC 20, SIC 23, UF 713, CC 37 e RB 32), no qual a severidade variou de 71% (CHUAO 120) a 56% (RB32), grupo d formado por quatro clones SGU 60 (50%), RIM 106 (48%), SIAL 325 (46%) e CC 11 (46%) e, no grupo e, com menores índices de severidade, estão os clones CACAU JACA (34%) testemunha de resistência e SIAL 05 (29%) (Figura 9).

O método de avaliação de peritécios em discos de folhas (LD) é considerado um método indireto visto que a quantidade de doença é estimada pela frutificação, pós-colonização do patógeno. A escala de notas desenvolvida neste estudo para avaliar a resistência à murcha-de-*Ceratocystis* em cacau é baseada nos limites mínimo, intermediário e máximo de crescimento de peritécios nos discos de folhas, que garantem a classificação dos clones quanto à resistência à doença, e principalmente respeitando a capacidade de percepção e distinção dos valores da escala pelo avaliador.

A contagem de número de peritécios utilizado no método LD (MAGALHÃES et al, 2016) é muito eficiente, mas, a depender do tamanho da amostra, se torna demorada e exaustiva, visto que se faz necessário que todos os discos sejam avaliados no quarto dia após a inoculação. Portanto, a criação de uma escala de notas eficiente vai facilitar e tornar mais rápida a leitura/avaliação dos discos.

A substituição da contagem pela escala de notas oferece a vantagem, num momento de dúvida em

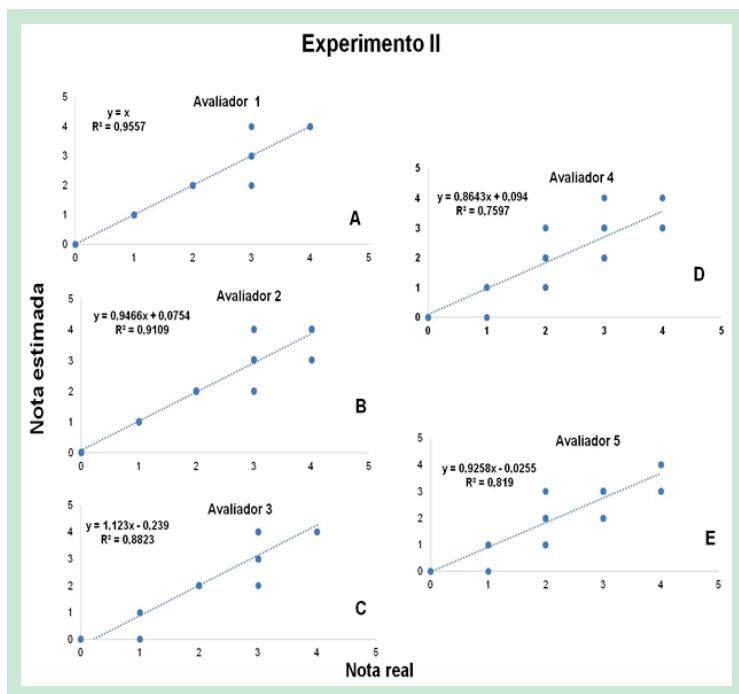


Figura 6 - Correlação entre o número real de peritécios e os valores estimados por 5 avaliadores, dois experientes (Av 1 e 2), e três inexperientes (Av 1, 2 e 3) através da escala de notas, à reação dos clones CACAU JACA e CCN 51 inoculados com *C. cacaofunesta* em discos de folhas de cacaueiro.

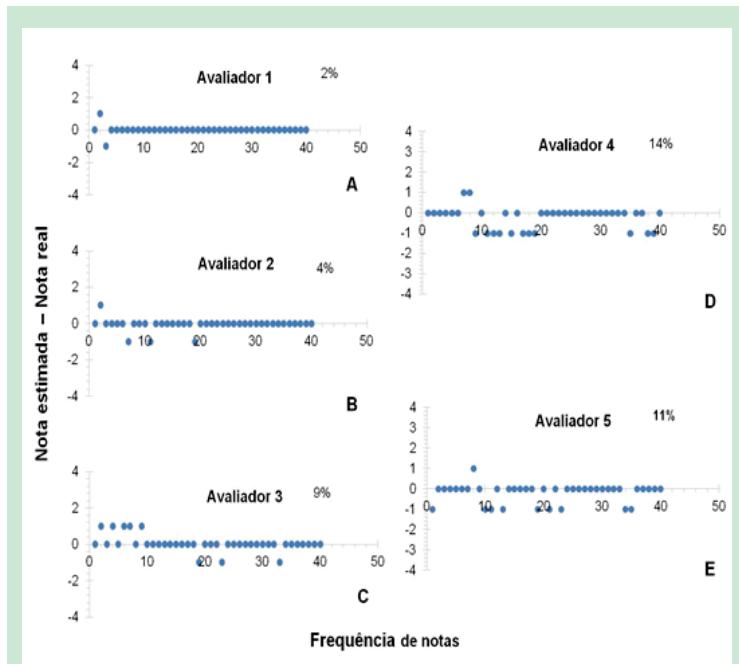


Figura 7 - Erros absolutos (nota estimada menos a nota real) para os cinco avaliadores (1 e 2 experientes e 3, 4 e 5 inexperientes) com a utilização da escala para a quantificação do número de peritécios de *C. cacaofunesta* formados em discos de folhas dos clones CCN 51 e Cacau jaca.

relação à nota a ser dada, esta pode ser tirada contando os peritécios. Isto não acontece com a escala diagramática onde você atribui nota à lesão. Outra vantagem da escala de notas é proporcionar a avaliação da severidade da doença utilizando o índice de McKinney (1923), o que ainda lhe atribui maior confiabilidade.

Para avaliação de doenças em plantas se fazem necessários métodos de quantificação de fácil utilização, confiáveis, precisos e com resultados reproduzíveis, como as escalas diagramáticas e as de notas (Berger, 1980).

O método de Delgado & Echandi (1965) de inoculação de *C. cacaofunesta* em seções de ramos de cacaueiro também utiliza a contagem de peritécios, onde se avalia através de uma escala o grau de desenvolvimento de micélio e peritécios. Para micélio: 0 = não crescimento, 1 = muito pouco, 2 = pouco, 3 = muito, 4 = totalmente coberto. Para peritécios: 0 = nada, 1 = muito pouco (1 a 5), 2 = pouco (6-15), 3 = muito (mais de 16), 4 = tecido totalmente coberto (Soria; Salazar, 1965). De acordo com a média das notas descritas anteriormente, a reação dos clones era classificada pela seguinte escala: Resistente (R) = 0-1,0; Resistência média (MR) = 1,1 - 2,0; Susceptível (S) = 2,1 - 3,0; Muito Susceptível (DM) = 3,1 - 4,0. Porém o uso desse método não foi viável no Brasil mediante a agressividade dos isolados, pois há formação de muito micélio e muitos peritécios dificultando a avaliação (Silva et al., 2004). Delgado e Suárez (2003) avaliaram a resistência de clones e a agressividade de dois isolados provenientes um do Brasil e outro do Equador, e concluíram que o isolado da Bahia, Brasil, foi mais agressivo quando comparado ao do Equador, o que foi comprovado por Silva et al. (2004).

No primeiro experimento para a validação da escala de notas criada (Figura 4A-B), os peritécios presentes nos discos de folhas dos clones foram estimados por dois avaliadores experientes na contagem de peritécios e observou-se uma correlação positiva com

valores de R^2 próximo a 1 e os valores de interseção e da inclinação, próximos de 0 e 1, respectivamente. Segundo Michereff et al. (2000), isso indica alta precisão e acurácia. O avaliador 1 apresentou menor variação entre as notas atribuídas e o valor real do que o avaliador 2. Quanto aos erros absolutos segundo a classificação de Tomerlin e Howell (1988) e de Nutter

(1989), o avaliador 1 (4%) foi considerado excelente, pois apresentou erro absoluto abaixo de 5% e o avaliador 2 (6%) apresentou desvio abaixo de 10% sendo considerado bom (Figura 5A e B).

No segundo experimento para aplicação da escala de notas, os cinco avaliadores apresentaram bons resultados, a escala novamente permitiu que se fizesse

uma avaliação acurada (intercepto da regressão linear igual a 0 e coeficiente angular da reta próximo a 1) e precisa (coeficiente de determinação próximo a 1), destacando-se a maior precisão dos avaliadores experientes (Figura 6A e B). Observa-se pouca variação entre as notas estimadas e as notas reais, com a variação ocorrendo na nota 3 para o avaliador 1 e nas notas 3 e 4 para o avaliador 2. Como estas notas são mais altas e, consequentemente, com maior número de peritécios, a percepção dos avaliadores foi dificultada. Para os avaliadores inexperientes, 3 ($R^2 = 0,8823$), 4 ($R^2 = 0,7597$) e 5 ($R^2 = 0,819$), observou-se acurácia entre as avaliações e precisão, mas não tão alta quanto às estimadas pelos avaliadores experientes (Figura 6C-E).

Quanto aos erros absolutos, confirmou-

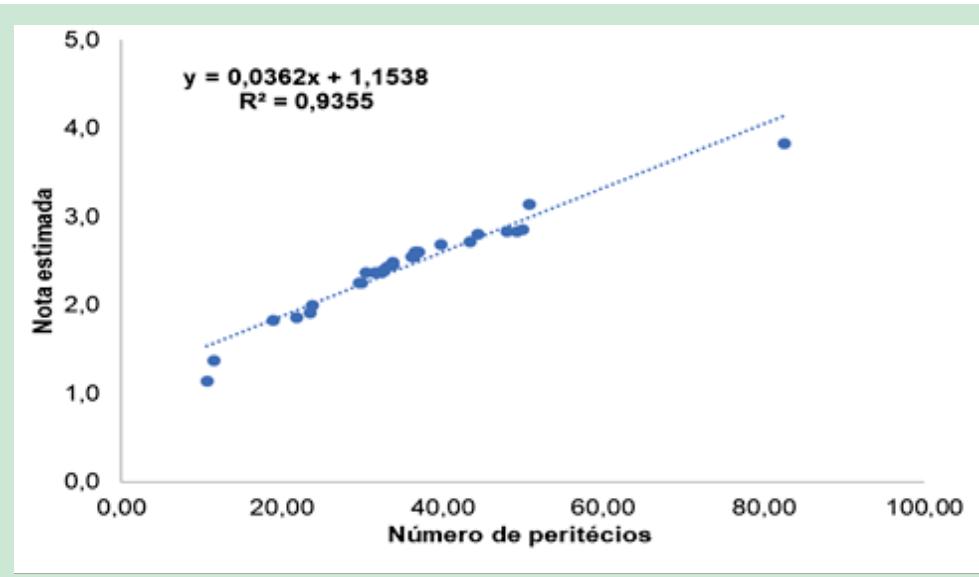


Figura 8 - Correlação entre o número real de peritécios e os valores estimados através da escala de notas, à reação dos 29 clones com o CACAU JACA (testemunha de resistência) e CCN 51 (testemunha de suscetibilidade) do Banco de Germoplasma da Ceplac, inoculados com *Ceratocystis cacaofunesta* em discos de folhas de cacau.

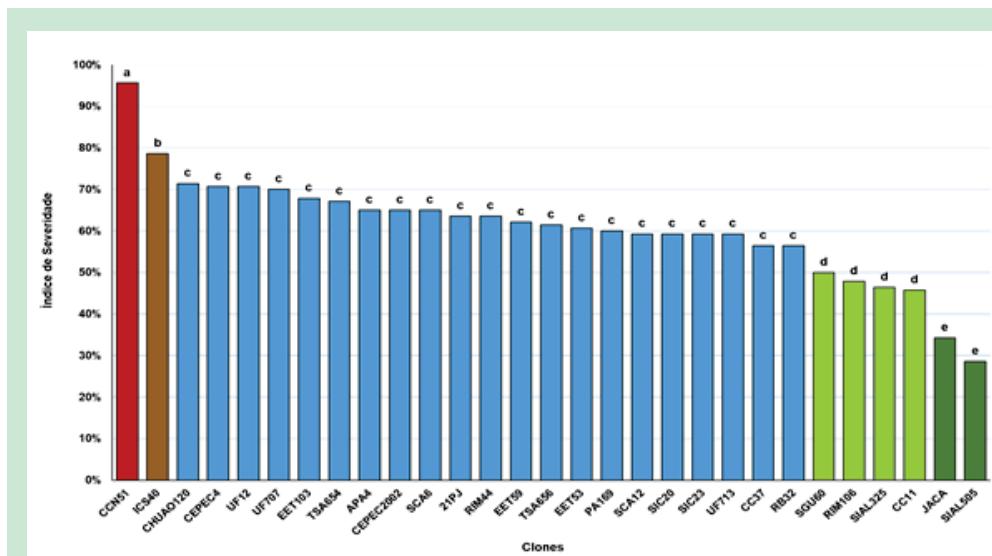


Figura 9 - Índices de severidade da murcha-de-*Ceratocystis* em 29 clones de cacau inoculados em discos de folhas por uma mistura de isolados de *Ceratocystis cacaofunesta* calculado a partir da escala de notas, aplicada 4 dias após a inoculação.

se a excelência dos dois avaliadores experientes, pois estes apresentaram erro absoluto abaixo de 5%. Quanto aos inexperientes, o avaliador 3, que apresentou desvio abaixo de 10% foi considerado bom (Tomerlin & Howell, 1988; Nutter, 1989), e os 4 e 5 por apresentarem os maiores desvios, tenderam a subestimar as notas dadas em relação à nota real. (Figura 7A-E). A sua inexperiência não só quanto ao uso da escala de notas, como também na avaliação de número de peritécios, explica a diminuição do grau de precisão e reprodutibilidade de suas avaliações. Os resultados demonstraram que a nota prediz com precisão e acurácia o valor real do número de peritécios. Para se obter precisão e acurácia no uso de escalas de notas ou diagramáticas, a experiência e percepção de cada avaliador é fundamental. Portanto, segundo Nutter e Schultz (1995), para que uma escala seja usada como um método de avaliação, ela precisa antes ser validada por avaliadores experientes.

É sempre de grande importância a validação e o uso de uma escala para avaliação de doença em plantas, conforme comprovado em vários outros estudos (Michereff et al., 1998; Diaz et al., 2001; Leite; Amorim, 2002; Junghans et al., 2003; Gomes et al., 2004; Michereff et al., 2006; Capucho et al., 2011; Yadav et al., 2013; Rios et al., 2013). A escala de notas para estimar o número de peritécios de *C. cacaofunesta* em disco de folhas é de fácil utilização, o avaliador pode facilmente adquirir experiência fazendo a contagem dos peritécios em discos de folhas e treinando para os valores atribuídos nas notas da escala, dessa forma facilitando e tornando mais rápida a avaliação. Mas é de fundamental importância o treinamento prévio dos avaliadores, para aumentar a acurácia nas determinações de severidade. Segundo Junghans (2003), as estimativas de erro no uso de escalas de notas e escalas diagramáticas não recaem sobre a escala, e sim sobre o avaliador.

A escala foi revalidada ao estimar através do experimento 3 a severidade da murcha-de-*Ceratocystis* em 29 clones de cacaueiro utilizando discos de folhas e avaliando com a escala de notas. Obteve-se correlação positiva, acurácia e precisão ($R^2=0,9355$) entre o número real de peritécio e a nota estimada. A distribuição dos clones em cinco grupos distintos quanto à severidade (Figura 9) foi bastante pertinente, uma vez que no grupo A ficou o clone que

apresentou o maior índice de severidade (CCN 51-padrão de suscetibilidade), sendo classificado como altamente suscetível; O grupo B classificado como suscetível foi formado somente pelo ICS 40; os 21 clones que integraram o grupo C foram classificados como moderadamente suscetíveis; o grupo D foi composto por quatro clones (SGU 60, RIM 106, SIAL 325 e CC 11) classificados como moderadamente resistentes; e no grupo E, com menores índices de severidade estão os clones CACAU JACA (testemunha de resistência) e SIAL 505 sendo ambos classificados como resistentes. Dos 27 clones testados, a maioria (16) ainda não havia sido testada quanto à resistência à murcha-de-*Ceratocystis* por nenhum método (ICS 40, CEPEC 4, UF 12, UF 707, EET 103, 21 PJ, RIM 44, EET 53, PA 169, UF 713, CC 37, RB 32, SGU 60, RIM 106, CC 11 e SIAL 505). Silva et al. (2004) utilizaram a metodologia de Delgado e Echandi (1965) em hastes destacadas de alguns clones, e obtiveram resultados semelhantes, classificando CACAU JACA como resistente; APA 4, EET 59, CCN 51; SCA 6; SIAL 325, SIC 20, TSA 654, TSA 656 como suscetíveis e CHUAO 120; SIC 23 foram altamente suscetíveis. Neste estudo, o CACAU JACA também confirmou sua resistência e os demais clones apresentaram suscetibilidade moderada à doença, com exceção do CCN 51 que foi altamente suscetível com 96% de severidade e o SIAL 325 que foi classificado com moderadamente resistente (46%). As testemunhas de resistência (CACAU JACA) e suscetibilidade (CCN 51), normalmente utilizadas, confirmaram a sua reação ao patógeno (Silva et al., 2004; Silva et al., 2012; Magalhães et al., 2016; Santos et al., 2021). O clone CEPEC 2002 foi classificado como moderadamente resistente por Sanches et al. (2008) e resistente por Santos et al. (2021) que utilizaram dois métodos de inoculação, em plantas adultas no campo e disco de folhas. Este mesmo clone apresentou uma reação resistente quando inoculado no campo, porém, não diferiu de CCN-51 pelo método de disco de folhas (Magalhães et al., 2016). Já o clone SCA 12 foi classificado como resistente por Magalhães et al. (2016) Entretanto neste trabalho tanto o CEPEC 2002 quanto o SCA 12 foram classificados como moderadamente suscetíveis por apresentarem 65% e 59% de severidade, respectivamente. Estas dúvidas

serão esclarecidas em avaliações posteriores. É comum nas avaliações para outros patógenos do cacaueiro e também para *C. cacaofunesta*, verificar flutuações de comportamento entre materiais considerados moderadamente suscetíveis e moderadamente resistentes.

Os clones SGU 60, RIM 106, SIAL 325 e CC 11 foram classificados como moderadamente resistentes, e os clones CACAU JACA testemunha de resistência e SIAL 505 apresentaram menores índices de severidade e foram classificados como resistentes. Este estudo, portanto, além de trazer um aperfeiçoamento para a utilização do método LD, através do uso da escala de notas, apresenta ao programa de melhoramento genético do cacaueiro mais um clone (SIAL 505) com resistência à murcha-de-*Ceratocystis*.

Conclusão

A quantidade de peritécios nos discos de folha relaciona-se com a distribuição de esporos durante a inoculação, com a agressividade do patógeno, ou seja, a capacidade do patógeno de se desenvolver ou não no hospedeiro, e principalmente, com a resistência ou suscetibilidade do clone, que é a capacidade do hospedeiro de restringir ou não o crescimento do patógeno. Deste modo, pode-se estimar a severidade da doença murcha-de-*Ceratocystis*, assim como, inferir sobre a resistência e suscetibilidade dos genótipos de cacaueiro utilizando o método disco de folhas e a escala de notas.

A utilização da escala de notas permitiu estimar o número de peritécios de *C. cacaofunesta* em discos de folhas de maneira acurada e precisa sendo eficiente em avaliar a severidade da murcha-de-*Ceratocystis* em clones de cacaueiro inoculados pelo método de discos de folhas. Houve a detecção de novos clones com resistência moderada ao patógeno, SGU 60, RIM 106, SIAL 325 e CC 11, além de SIAL 505, como resistente.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Ana Rosa Niella e Virgínia Damasceno pela condução dos ensaios em laboratório, à Giselle Rodrigues e Elisângela Santos no seu auxílio na avaliação do experimento.

Literatura Citada

- ALARCON, C. R. M. 1994. Determinación de resistencia de 250 clones de cacao de origen nacional al ataque de mal de machete. (Agronomy Graduation Thesis). Guayaquil, Universidad Agraria del Ecuador.
- ALMEIDA, L. C. C. et al. 2005. Distribuição geográfica da murcha-de-*Ceratocystis* do cacaueiro na Bahia, Brasil. Agrotrópica 17:83-86.
- BASTOS, C.N.; EVANS, H.C. 1978. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst. na Amazônia Brasileira. Acta Amazônica 8:543-544.
- BATISTA, D. C. et al. 2008. Seca da mangueira: detecção, sintomatologia e controle. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_eletronica/downloads/COT138.pdf>. Acesso em: jul 2013.
- BERGER, R. D. 1980. Measuring disease intensity. In: Teng, P. S.; Krupa, S.V. (Eds.). Crop loss assessment. Saint Paul: University of Minnesota. pp.28-31.
- BEZERRA, J. L. 1997. *Ceratocystis fimbriata* causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. Incoped Newsletter 1:6.
- BEZERRA, J. L. et al. 1998. Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em clones de cacau no estado da Bahia. Fitopatologia Brasileira 23: 228.
- CAPUCHO, A. S. et al. 2011. Development and validation of standard área diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. Plant Pathology 60: 1144-1150.
- COITÍA, W.; ROSALES, C. J. 2001. Relación entre la incidencia de escolítidos y la necrosos del cacao en Aragua, Venezuela. Manejo Integrado de Plagas 62: 65-71.
- DELGADO J.; ECHANDY, E. 1965. Evaluación de la resistencia de especies y clones de cacao al mal de machete provocado por *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba 15 (4): 286-289.
- DELGADO, R.; SUÁREZ, C. 2003. Evaluación de la resistencia al mal del machete en clones internacionales de cacao en Ecuador. In

- International Cocoa Research Conference. Accra, Ghana. Proceedings.
- DIAZ, C. G.; BASSANEZI, R. B.; FILHO, A. B. 2001. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. Summa Phytopatologica 27: 35-39.
- ENGELBRECHT, C. J. B et al. 2007. Genetic variation in populations of the cacao wilt pathogen, *Ceratocystis cacaofunesta*. Plant Pathology 56:923-933.
- 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.
- GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. 2004. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. Summa Phytopathologica 30: 38-42.
- JUNGHANS, D.T., ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. 2003. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. Fitopatologia Brasileira 28:184-188.
- LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de Alternaria em girassol. Summa Phytopathologica 28(1): 14-19.
- LUZ, E. D. M. N. et al. 2013. Atualidades no manejo de doenças do cacaueiro. In: Patologia Florestal: desafios e perspectivas. NEFIT – Núcleo de Estudos em Fitopatologia, 1^aed. Editora Suplemento, SP. pp. 313-329.
- MAGALHÃES, D. M. A. et al. 2016. Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. Tropical Plant Pathology 41 (3):155-161.
- MARIN, M. et al. 2003. Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian coffee growing regions based on molecular data and pathogenicity. Journal of Phytopathology 151: 395-405.
- MATA, S. N. 1991. Métodos de inoculacion de *Ceratocystis fimbriata* e Evaluacion de Resistencia en Cacao. (Agronomy Graduation Thesis). Universidade de Costa Rica, Turrialba. 85p.
- MCKINNEY, H.H. 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research 26: 195-217.
- MICHEREFF, S. J. et al. 2006. Development and validation of a diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot of sweet pepper. Summa Phytopathologica 32: 260-266.
- MICHEREFF, S. J. et al. 1998. Escala diagramática e tamanho de amostras para avaliação da severidade da mancha parda da mandioca (*Cercosporidium henningsii*). Agrotrópica, Itabuna, v. 10, p. 143-148.
- MICHEREFF, S. J.; MAFFIA, L. A.; NORONHA, M. A. 2000. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. Fitopatologia Brasileira 25: 612-619.
- NUTTER, F. W. Jr.; SCHULTZ, P. M. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. Canadian Journal of Plant Pathology 17: 174-184.
- NUTTER, F. W. Jr. 1989. Disease Pro: A computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. Phytopathology. 79:1135. (Abstract).
- OLIVEIRA, B. F. et al. 2009. Identificação de fontes de resistência a *Ceratocystis cacaofunesta* em mudas de cacaueiro. Agrotrópica 21:83-88.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2005. Murchade-*Ceratocystis*. In: Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC/SEFIT. pp. 55-63.
- OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. 2012. Principais doenças do cacaueiro e seu manejo. In: Valle, R. R. (Org.). Ciência, tecnologia e manejo do cacaueiro. 2ed. Brasília - DF, MAPA/CEPLAC. pp. 187-275.
- PASCHOLATI, S. F. LEITE, B.; STANGARLIN, J. R. 2008. Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. v.1. Piracicaba, SP, FEALQ. 627p.
- PEREIRA, J. L. et al. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora

- de cacau do Brasil. Agrotrópica 1:79-81.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RAM. A.; VALLE, R. R. M.; FREITAS, D. B. 2004. Controle de cancro ou murcha de *Ceratocystis* do cacaueiro na Bahia, Brasil. Agrotrópica 16: 111-114.
- RIBEIRO, I. J. A. 1997. Doenças da mangueira. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo, SP. Agronômica Ceres 2:511-524.
- RIOS, J. A.; DEBONA, D.; DUARTE, H. S. S.; RODRIGUES, F. A. 2013. Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. European Journal of Plant Pathology 136: 603-311.
- SANCHES, C. L. G. et al. 2008. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. European Journal of Plant Pathology 122:517-528.
- SANTOS, E. et al. 2021. Selection of cacao trees resistant to *Ceratocystis* wilt by inoculation in leaf discs and field. Tropical Plant Pathology 46: 536-544.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2010. Avaliação de clones de cacaueiros selecionados no sul da Bahia para resistência a *Ceratocystis cacaofunesta*. Agrotrópica 22: 165-170.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2012. Resistência de progêneres de cacaueiro à murcha-de-*Ceratocystis*. Tropical Plant Pathology 37(3): 191-195.
- SILVA, S. D. V. M. et al. 2013. Seleção de clones de cacaueiros resistentes à murcha-de-*Ceratocystis* em condições de campo. Agrotrópica 25:163- 170.
- 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(5): 538-540.
- SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N. 2000. *Ceratocystis fimbriata* em cacaueiros das variedades cultivadas na Bahia. Fitopatologia Brasileira 25 (Supl.): 424.
- SORIA, J. V.; SALAZAR, G. 1965. Pruebas preliminares de resistencia a *Ceratocystis fimbriata* em clones e híbridos de cacao. Turrialba: Revista Interamericana de Ciências Agrícolas 15(4): 290-295.
- TOMERLIN, J. R; HOWELL, T. A. 1988. DISTRAIN: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. Plant Disease 72:455-459.
- WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. 1985. Cocoa. 4 ed. London. Longman. 620p.
- YADAV, N. V.; VOS, S. M.; BOCK, C. H.; WOOD, B. W. 2013. Development and validation of standard area diagrams to AID assessment of pecan scab symptoms on fruit. Plant Pathology 62(2): 325-335.