



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR E
PATOGENICIDADE DE *Phytophthora* spp. ASSOCIADAS AO
CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)**

**Brasília – DF
2018**

JENNIFER NATHALIE YOLANDE DECLOQUEMENT

**Caracterização morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp. associadas ao
cacaueiro (*Theobroma cacao* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador

Dr. Danilo Batista Pinho, Doutor em Fitopatologia

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Decloquement, Jennifer Nathalie Yolande.

Caracterização morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp. associadas ao cacauero (*Theobroma cacao* L.) / Jennifer Nathalie Yolande Decloquement.

Brasília, 2018.

p. 86.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília.

1. Cacau – Podridão-parda.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Caracterização morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp. associadas ao cacauero (*Theobroma cacao* L.)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Thérèse e Ali Morouche por tudo que fizeram, pela educação e por ter me levado até aqui. Aos familiares e amigos que estiveram presentes ao longo desse trabalho, que me apoiaram nas minhas escolhas pessoais e profissionais e com os quais aprendo a cada dia, em especial Rita de Cassia Meneghini, Maria Isabel Ordonez Lozada e Lincoln Vicente Araújo dos Santos Bizerra que me apoiaram diariamente e me ajudaram a levantar nos momentos difíceis;

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, em especial aos colegas: Rildo Alexandre Fernandes da Silva, Aline Suellen da Silva, Fernanda Lara dos Santos e Samuel Galvão Elias;

Aos professores Dr. Danilo Batista Pinho e Dr. Roberto Ramos Sobrinho pelo incentivo, apoio e orientação durante todo esse período;

Ao professor Luiz Eduardo Bassay Blum e o Dr. Valdir Lourenço Junior por aceitar o convite de participar da banca examinadora e pelas sugestões durante o exame;

Ao Dr. Jean-Philippe Marelli, diretor de pesquisas da MARS Incorporated e toda equipe de pesquisadores e técnicos da empresa pela oportunidade de realizar parte das atividades na estação de pesquisa MCCA;

Aos produtores que permitiram coletar amostras em suas propriedades rurais;

À MARS Incorporated, Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de recursos financeiros para a realização desse trabalho;

À Universidade de Brasília pela oportunidade de realizar o Mestrado em Fitopatologia;

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do professor Dr. Danilo Batista Pinho, colaboração do Dr. Roberto Ramos Sobrinho e apoio da empresa Mars Incorporated.

**CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE
Phytophthora spp. ASSOCIADAS AO CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)**

JENNIFER NATHALIE YOLANDE DECLOQUEMENT

DISSERTAÇÃO APROVADA em: 27 / 07 /2018 por:

Dr. Valdir Lourenço Júnior
Embrapa Hortaliças (Examinador Externo)

Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

Dr. Danilo Batista Pinho
Universidade de Brasília (Presidente - Orientador)

**Brasília – DF
2018**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. O cacaueteiro	12
2.2. Principais doenças	14
2.3. Podridão-parda.....	16
2.3.1. Sintomatologia	16
2.3.2 Etiologia	17
2.3.3. Morfologia	18
2.3.4. Epidemiologia e controle	19
2.4. Sistemas de cultivo	20
2.5. Métodos de identificação.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Coleta das amostras	24
3.2. Isolamento e armazenamento dos isolados.....	26
3.2.1. Obtenção dos isolados de frutos	26
3.2.2. Obtenção dos isolados de solo e serapilheira.....	27
3.3. Extração do DNA	30

3.4. Amplificação e sequenciamento	31
3.5. Análise de sequências e filogenia	32
3.6. Caracterização morfológica	43
3.7. Testes de patogenicidade e agressividade.....	43
3.8. Caracterização cultural	45
4. RESULTADOS	47
4.1. Obtenção dos isolados	47
4.2 Caracterização molecular de <i>Phytophthora</i> spp.	49
4.3. Caracterização morfológica de <i>Phytophthora</i> spp.....	54
4.3.1. Características culturais	54
4.3.2. Características morfológicas	58
4.4. Testes de patogenicidade e agressividade.....	60
4.4.1. Patogenicidade dos isolados da coleção de <i>Phytophthora</i> spp.	60
4.4.2. Patogenicidade e agressividade em diferentes clones de cacau	60
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento de regiões genômicas dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp.	32
Tabela 2. Banco de dados utilizado para análise filogenética.	34
Tabela 3. Ajuste por modelos lineares do crescimento micelial de isolados de <i>Phytophthora</i> spp. em meios BDA, CA, MEA e V8.	55
Tabela 4. Análise do crescimento micelial de isolados de <i>Phytophthora</i> spp. nos meios BDA, CA, MEA e V8, usando o teste Tukey.	56
Tabela 5. Taxa de crescimento dos isolados testados por meio de cultura, Mumax sendo a função representando a taxa de crescimento. Quanto menor o Mumax, maior a taxa de crescimento.	58
Tabela 6. Medidas (μm) das estruturas reprodutivas e de sobrevivência de <i>Phytophthora</i> spp.	60
Tabela 7. Resultados dos modelos de regressão mista aplicados por modelo linear mistos representativos da agressividade dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. inoculados na parte superior do fruto em diferentes clones de cacau.	62
Tabela 8. Resultados dos modelos de regressão mista aplicados por modelo linear mistos representativos da agressividade dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. inoculados na parte inferior do fruto em diferentes clones de cacau.	63
Tabela 9. Isolados utilizados durante o estudo.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostras coletadas em condições de campo. (A e B) - frutos de cacau clone ‘CCN51’ apresentando sintomas típicos de infecção por *Phytophthora* spp. (podridão-parda); (C e D) - ramos de cacau clone ‘CCN51’ apresentando sintomas de cancro; (E) - amostra de serapilheira coletada próximo a base de plantas de cacau clone ‘PS1319’; (F) - amostra de solo coletada próximo a base de plantas de cacau clone ‘PS1319’ 25

Figura 2. Isolamento de *Phytophthora* spp. a partir de fruto sintomático. (A) - fragmento obtido após limpeza superficial do fruto com água e detergente; (B-D) - fragmentos provenientes da região de transição entre tecidos sadio e doente, depositados em meio BDA-PARP; (E) - crescimento micelial após 48h de incubação a 25°C; (F) - isolado de *Phytophthora* spp. em meio LIT3 após 72h de incubação a 25°C..... 27

Figura 3. Isolamento, a partir de solo, utilizando frutos de cacau clone ‘CCN51’ como isca. (A) - ferimentos realizados na superfície do fruto/isca sadio; (B) - deposição de amostras de solo (umedecida com ADE) em frutos (com ferimento); (C e D) - incubação dos frutos em câmara úmida; (E) - fruto de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão fora do local de inoculação); (F) - fruto de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão surgindo a partir do ponto de inoculação). 28

Figura 4. Isolamento, a partir de solo, utilizando fragmentos de frutos de cacau clone ‘CCN51’ e maçã como isca. (A) - fragmento de cacau depositado sobre amostra de solo umedecida com ADE; (B) - maçã (com ferimento) depositada sobre amostra de solo umedecida com ADE; (C) - incubação dos frutos da maçã e fragmentos de cacau (sobre o solo) em câmara úmida; (D) - fragmento de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão surgindo a partir do ponto de contato com o solo); (E) - fragmento de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (surgimento de sinais, porém sem sintomas aparentes de podridão); (F e G) -

fruto de maçã após 5 dias de incubação em contato com o solo (sem sintomas de podridão); (H e I) - fruto de maçã após 5 dias de incubação em contato com o solo (sintomas de podridão).

..... 29

Figura 5. Isolamento, a partir de serapilheira, utilizando fragmentos de frutos de cacau clone ‘CCN51’ e maçã como isca. (A e B) - fragmento de cacau depositado sobre amostra de serapilheira misturada com solo autoclavado e umedecido com ADE; (C e D) - fruto de maçã (com ferimento) depositado sobre amostra de serapilheira misturada com solo autoclavado e umedecido com ADE; (E e F) - isolamento indireto de *Phytophthora* spp., a partir de fruto/isca sintomático, em meio BDA-PARP..... 30

Figura 6. Testes de patogenicidade e agressividade. (A) - preparação de câmara úmida com papel toalha depositado em caixas plásticas e ADE; (B) - frutos de cacau sadios acondicionados em caixas plásticas; (C-E) - frutos de cacau inoculados com discos de micélio; (F) - frutos de cacau clone CCN51 apresentando sintomas de podridão-parda sete DAI; (G) - frutos de cacau clone FB206 apresentando sintomas de podridão-parda sete DAI 45

Figura 7. Percentual de isolados de *Phytophthora* spp. por sistemas de cultivo. SAF = sistema agrofloresta seringueira/cacau; Coco = consórcio coco/cacau; Pleno Sol, e Cabruca no estado da Bahia, Brasil. 48

Figura 8. Percentual de isolados de *Phytophthora* spp. por clones..... 48

Figura 9. Porcentual dos isolados sequenciados por espécies observadas em cada sistema de cultivo..... 50

Figura 10. Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada nas sequências nucleotídicas do gene β -tub de *Phytophthora* spp. Os isolados utilizados na análise multigênica estão destacados em vermelho..... 52

Figura 11. Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada nos dados concatenados dos genes β -tub-EF1 α -HSP90 de *Phytophthora* spp. Os isolados relatados no presente trabalho

estão destacados em vermelhoramos. O ramos espessos possuem probabilidade posterior maior ou igual a 0,99 pela análise de Inferencia Bayesiana.	53
Figura 12. Curvas de crescimento micelial dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. em meios de cultivo BDA, CA, MEA e V8.	54
Figura 13. Características culturais dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. em diferentes meios de cultura.	57
Figura 14. Comparação do crescimento micelial de <i>Phytophthora</i> sp. e <i>P. palmivora</i> em diferentes meios de cultivo, segundo a tabela 6.	57
Figura 15. Morfologia de <i>Phytophthora</i> spp. obtidos em meio de cultura CA. Clamidósporo (A) e esporângios (B) do isolado 925 F IIS D (<i>Phytophthora</i> provável sp. nov.) obtidos a partir de culturas em meio CA. Oósporo (C), clamidósporo (D) e esporângio (E) do isolado 895 F IIS D (<i>P. palmivora</i>) obtidos a partir de culturas em meio CA. Oósporo foi produzido a partir do pareamento de <i>P. palmivora</i> com isolado de <i>P. capsici</i> mating type A2.	59
Figura 16. Agressividade dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. em diferentes clones de cacau. As inoculações foram realizadas próximo ao pedúnculo dos frutos.	64
Figura 17. Agressividade dos isolados de <i>Phytophthora</i> spp. em diferentes clones de cacau. As inoculações foram realizadas próximo à ponta dos frutos.	64

RESUMO GERAL

DECLOQUEMENT, Jennifer Nathalie Yolande. Caracterização morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp. associadas ao cacau (*Theobroma cacao* L.). 2018. 86p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A podridão-parda (*Phytophthora* spp.) é considerada fator limitante para produção de cacau (*Theobroma cacao* L.) devido à alta incidência da doença em frutos nos campos de cultivo. Além disso, o patógeno pode induzir sintomas de cancro nos ramos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi identificar as espécies de *Phytophthora* associadas ao cacau sob diferentes sistemas de cultivos na região Sul do estado da Bahia. Amostras de frutos e ramos sintomáticos, solo e serapilheira foram coletadas nos sistemas de produção cabruca, agroflorestal, consórcio cacau/coco e pleno sol. Isolados de *Phytophthora* spp. foram obtidos em meio seletivo BDA-PARP. DNA total foi extraído a partir de culturas monohifais, e utilizado como molde para amplificação e sequenciamento de diferentes regiões genômicas (B-TUB, COXII, EF1 α , ITS e HSP90). Testes de patogenicidade e agressividade foram realizados em diferentes clones de cacau (CCN51, FB206, PS1319, VB1151 e MP01-104). As análises filogenéticas realizadas revelaram a presença de duas espécies infectando o cacau nos quatro sistemas de cultivos avaliados, um sendo *P. palmivora* e a outra uma provável espécie nova a ser descrita. Este é o primeiro relato de *Phytophthora* sp. causando a podridão-parda em cacau. Dentre os diferentes clones testados, *Phytophthora* sp. demonstrou ser mais agressivo que *P. palmivora*, uma variação fisiológica intraespecífica para o crescimento micelial também foi observado e *Phytophthora* sp. mais uma vez se mostrou superior, apresentando a maior taxa de crescimento indendentemente dos meios de cultivo testados .

Palavras-chaves: Oomiceto, morfologia, filogenia

GENERAL ABSTRACT

DECLOQUEMENT, Jennifer Nathalie Yolande. Morpho-molecular characterization and pathogenicity of *Phytophthora* spp. associated with cacao (*Theobroma cacao* L.). 2018. 86p. Dissertation (Master of Science in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Brown rot (*Phytophthora* spp.) is considered a limiting factor for cocoa production (*Theobroma cacao* L.) due to the high incidence of disease in fruits in field crops. Besides, the pathogen can induce canker symptoms in the branches. In this context, the objective of this work was to identify the *Phytophthora* species associated to cocoa under different cultivation systems in the southern region of Bahia state. Samples of fruits and symptomatic branches, soil and litter were collected in cabruca, agroforestry, cocoa / coconut consortium and full sun cultivation systems. Isolates from *Phytophthora* spp. were obtained on PDA-PARP selective medium. Total DNA was extracted from monohifal cultures and used as template for amplification and sequencing of different genomic regions (B-TUB, COXII, EF1 α , ITS and HSP90). Pathogenicity and aggressiveness tests were performed on different cocoa clones (CCN51, FB206, PS1319, VB1151 and MP01-104). Phylogenetic analyzes revealed the presence of two species infecting cocoa in the four evaluated systems, one identified as *P. palmivora* and the another one can probable be a new species to describe. This is the first time that *Phytophthora* sp. is reported causing brown rot in cocoa. Among the different tested clones, *Phytophthora* sp. was more aggressive than *P. palmivora*, a variation physiologic intraspecific for mycelial growth was also observed and *Phytophthora* sp. once again superior was shown, presenting the largest tax of growth no matter what kind of culture medium tested.

Key-words: Oomycete, morphology, phylogeny.

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma planta perene originária da região Amazônica pertencendo a família Malvaceae. A cultura do cacau, e seus produtos derivados (especialmente chocolate e bebidas), apresentam grande importância socioeconômica em todo o mundo, movimentando bilhões de dólares todos os anos (Ndukwu *et al.*, 2010; Bailey & Meinhardt, 2016). Durante muito tempo, o Brasil foi o maior produtor mundial de cacau. Entretanto, devido a ocorrência de doenças como vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e podridão-parda (*Phytophthora* spp.), o Brasil perdeu a posição de líder mundial, e atualmente ocupa a sexta posição. Em 2013, a produtividade média de amêndoas secas de cacau no Brasil foi de 0,37 t/ha, enquanto na Costa do Marfim (maior produtor mundial) foi de 0,58 t/ha (Agrianual, 2017). Em plantios de materiais genéticos melhorados onde são aplicadas boas práticas de manejo na cadeia produtiva, foi comprovado que o rendimento médio pode alcançar 3,0 t/ha. (Maharaj *et al.*, 2005; Pang, 2006).

O cacauzeiro é plantado sob diferentes sistemas de cultivo, sendo a cabruca o mais comumente encontrado no estado da Bahia, onde é plantado sob a sombra da Mata Atlântica. Atualmente, plantios de cacau a pleno sol vêm sendo implantados no Brasil, alcançando os mais altos índices de produtividade. Além disso, o cacau pode ser cultivado em sistemas agroflorestais (SAF de cacau e seringueira) ou em consórcio com culturas como coqueiro e açaí. É importante salientar que essas espécies vegetais comumente encontradas em consórcio com o cacauzeiro são também hospedeiras de diferentes espécies de *Phytophthora* (*P. heveae*, *P. capsici* e *P. palmivora*), as quais são relatadas infectando cacau. Apesar de mais produtivo, o sistema a pleno sol pode induzir maior competição entre plantas, e ainda levar a maior suscetibilidade do cacauzeiro ao ataque de pragas e doenças (Silva Neto *et al.*, 2001).

No Brasil, o cacau representa uma fonte econômica importante para alguns estados tais como Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso e Pará, com problemas fitossanitários

como vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), podridão-parda dos frutos e cancro (*Phytophthora* spp.), e antracnose (*Colletotrichum* spp.) sendo considerados fatores limitantes para produção de cacau (Rocha & Ram, 1971; Pereira *et al.*, 1980; Bailey & Meinhardt, 2016). Atualmente, a região Sul do estado da Bahia é o principal polo produtor, com uma produção em torno de 165 mil toneladas em 2016, seguida pela região Norte do país com aproximadamente 104 mil toneladas. Apesar dos maiores índices de produção, a Bahia apresenta menor produtividade (0,34 t/ha) que a região Norte (0,72 t/ha), principalmente devido à maior incidência de doenças naquela região (Luz *et al.*, 2001; Agriannual, 2017).

Na tentativa de diminuir as perdas induzidas por doenças, foram desenvolvidos clones de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa. Além do controle genético, têm sido adotadas práticas culturais como poda de ramos sintomáticos e controle químico. Entretanto, epidemias severas contínuas de podridão-parda são observadas nos campos de cultivo.

A podridão-parda é uma das principais doenças nas regiões produtoras de cacau em todo o mundo, sendo observados também sintomas de cancos nos ramos das plantas infectadas. Diferentes espécies de *Phytophthora* têm sido relatadas como as principais causadoras da podridão-parda, destacando-se *P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. heveae*. *P. megakarya* é a espécie mais destrutiva, e até o momento, é considerada praga quarentenária ausente no Brasil. As espécies mais comuns em ordem decrescente no Brasil são *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. capsici* e *P. heveae* (Ali *et al.*, 2016; Bailey & Meinhardt, 2016).

Tradicionalmente, a identificação das espécies de *Phytophthora* foi baseada em características morfológicas. No entanto, a identificação precisa de *Phytophthora* spp. deve ser realizada pela comparação de sequências de DNA de diferentes regiões genômicas de *Phytophthora* spp. (Martin *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2017). Recentemente, um método baseado em PCR espécie-específica foi desenvolvido para a identificação das principais

espécies de *Phytophthora* em cacau (Ali *et al.*, 2016). Apesar da importância socioeconômica da cultura do cacau no Brasil, especialmente para a região Nordeste, epidemias severas contínuas de *Phytophthora* são observadas nos campos de cultivo, levando a grandes perdas todos os anos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar as principais espécies de *Phytophthora* spp. infectando o cacau sob diferentes sistemas de cultivo na região Sul da Bahia. Especificamente, os objetivos foram: (i) avaliar o melhor método para isolamento de *Phytophthora* spp. nos diferentes substratos; (ii) isolar *Phytophthora* spp. a partir de frutos e ramos infectados, solo e serapilheira; (iii) identificar as diferentes espécies de *Phytophthora* através de características morfológicas e abordagem multigênica; (iv) testar a patogenicidade e agressividade dos isolados de *Phytophthora* spp. em diferentes clones de cacau.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cacauero

Originário da região amazônica, o cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma Malvaceae que pode medir de 5 a 8 metros de altura e 4 a 6 metros de diâmetro. A planta possui características morfológicas diferentes conforme o ambiente de desenvolvimento. Em condições florestais, as plantas podem atingir até 20 metros de altura devido a competição por luz. As folhas são de coloração verde-escura quando atingem a maturidade, de formato oblongado e acuminado, com nervura central proeminente. Anualmente, um cacauero pode produzir mais de 100 mil flores, divididas em dois picos de floração, sendo que apenas 5% são fertilizadas e 0,1% dão origem aos frutos. A flor é hermafrodita e homógama, no entanto sua morfologia limita a polinização exclusivamente a insetos. O cacauero possui frutos de coloração verde ou roxa quando jovens, mudando para amarelo ou alaranjado quando maduros. A cor do fruto varia de acordo com o clone, assim como o seu tamanho, formato, e quantidade e tamanho das amêndoas/sementes. Após a polinização, a maturação dos frutos ocorre em 140 a 205 dias, sendo necessário em média 167 dias, o que permite dois ciclos anuais. As sementes são produzidas dentro do fruto, envolvidas por uma camada de polpa branca e têm formato elipsoide a ovoide medindo de 2 a 3 cm de comprimento (Silva Neto *et al.*, 2001).

O cacau, cujo nome científico significa “alimento dos deuses”, foi considerado sagrado durante muito tempo. Não há registros de quem descobriu o cacau, mas existem relatos mostrando que já era consumido e venerado pelos maias e astecas. Os maias usavam o cacau para criar uma bebida de ritual compartilhada durante as cerimônias de casamento, fornecendo assim uma das primeiras ligações conhecidas entre chocolate e romance. Desde então, o homem aproveitou o cacau sob todas as formas, incorporando-o em seus costumes. Atualmente, o consumo anual ultrapassa os 4,5 milhões de toneladas de amêndoas secas (World Cocoa Foundation, 2018).

Entre as formas de aproveitamento dos frutos do cacau, a principal é a produção de chocolate. A semente é o principal produto comercializado após fermentação, secagem e torra. Finalmente, são moídas para produção do ‘liquor de cacau’, e após prensagem a manteiga e a massa de cacau são separadas (matérias primas do chocolate). Além da utilização na indústria alimentícia, a manteiga de cacau é empregada nas indústrias farmacêutica e cosmética. A polpa, devido às suas características açucaradas, é utilizada para produção de geleias, vinhos, licor e sucos, enquanto a casca serve para alimentação animal ou fertilizante (Luz *et al.*, 2001).

Levado para Europa pelos espanhóis no fim do século XVI, o cacau foi utilizado para desenvolver a indústria chocolateira. No Brasil, o cacau começou a ser cultivado no sul da Bahia (em cidades como Ilhéus e Itabuna) em torno de 1746, levando ao desenvolvimento da economia da região. Rapidamente, o Brasil tornou-se o maior produtor/exportador mundial de cacau, chegando a exportar 70 mil toneladas em 1880. Em 2013, a produção brasileira de amêndoas de cacau foi de 256.186 toneladas, com produtividade média de 0.37 t/ha, e ocupando a sexta posição mundial (ABICAB, 2018; Agriannual, 2017). Atualmente, a Costa do Marfim é o maior produtor mundial de cacau, com uma produtividade média de 0.58 t/ha em 2013, tendo produzido 1.448.992 toneladas.

No Brasil, o cacau representa uma fonte econômica de grande importância nos estados do Amazonas, Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso e Pará. Na Bahia, a principal região produtora do país, a produção foi de 165 mil toneladas em 2016, seguida pela região Norte do país com aproximadamente 104 mil toneladas. Apesar dos maiores índices de produção, a Bahia apresenta menores índices de produtividade (0,34 t/ha) que a região Norte (0,72 t/ha), principalmente devido à maior incidência de doenças naquela região (Luz *et al.*, 2001; Agriannual, 2017).

2.2. Principais doenças

Introduzido na Bahia, o cacau expandiu-se principalmente na região Sudeste do estado, onde a economia foi sustentada principalmente pelo cultivo deste fruto. Em 1989, a região sofreu uma grande crise causada pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa (*Monillioththora perniciosa*), gerando assim grandes impactos econômicos, sociais e ambientais (Andrade *et al.*, 2011). Até introdução da vassoura-de-bruxa, a podridão-parda (*Phytophthora* spp.) era considerada a principal doença afetando a cultura do cacau nessa região (Kimati *et al.*, 1997).

O primeiro relato da vassoura-de-bruxa foi em 1895 no Suriname, posteriormente sendo encontrada no Equador, Colômbia, Venezuela, Guianas, Ilhas do Caribe e Brasil. O fungo *M. perniciosa* provoca hipertrofia dos ramos e uma brotação intensa das gemas laterais dando um aspecto de vassoura. Os ramos doentes apresentam um diâmetro maior que os ramos saudáveis, com entrenós curtos e folhas grandes, curvadas e retorcidas. Quando a infecção ocorre através das flores, os frutos ficam subdesenvolvidos, apresentando formatos de “morangos” e morrem prematuramente, podendo também ser observado superbrotamento da almofada floral, sintoma conhecido como vassoura-de-almofada. Quando a infecção se desenvolve um pouco mais tarde, o fruto pode apresentar formato de “cenoura”, atingindo um tamanho de 15 cm, ficando escuros e endurecidos após a morte. Os frutos infectados com 2 a 3 meses de idade podem se desenvolver até o estágio de maturação, apresentando uma mancha circular escura e deprimida na parte externa da casca. Neste caso, o fungo atinge a polpa e as amêndoas apodrecem e ficam aderidas umas às outras. Quando a infecção ocorre próximo à maturação, frutos de 5 a 6 meses de idade, os danos se limitam apenas à casca e o fungo não atinge a polpa (Silva Neto *et al.*, 2001). Atualmente, existem clones de cacau resistentes à vassoura-de-bruxa, que associada a boas práticas culturais, permitem ao produtor minimizar as perdas causadas pela doença (Bailey & Meinhardt, 2016).

Outra espécie de *Moniliophthora* é responsável por grandes prejuízos na produção de cacau em diversas regiões como Peru, Venezuela e Colômbia. Conhecida como monilíase, a doença é causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora roreri*, sendo considerada praga quarentenária ausente (A1) no Brasil (MAPA, 2018). A introdução desse patógeno no Brasil teria consequências devastadoras, podendo levar a epidemias severas como o caso da vassoura-de-bruxa na Bahia, tendo os mesmos reflexos socioeconômicos (MAPA, 2018; Bailey & Meinhardt, 2016). Em frutos infectados, pode ser observado amadurecimento precoce, presença de manchas de coloração marrom, e esporulação abundante que pode cobrir totalmente a superfície do fruto. O fungo pode ainda atingir a parte mais interna do fruto e colonizar a polpa e as sementes, deixando-as impróprias para consumo (Kimati *et al.*, 1997). Em alguns casos, não são observados sintomas na superfície dos frutos (apesar de polpa e sementes serem afetadas), sendo conhecidas como ‘infecções ocultas’. A monilíase pode causar perdas entre 50 a 90 % da produção (Kimati *et al.*, 1997).

A podridão-carvão, causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae*, é uma doença observada nos frutos de cacau infectados. Considerado parasita secundário, o patógeno geralmente ataca plantas em condições de estresse, provocando uma podridão rápida e destrutiva dos frutos. Logo após infecção, é observada uma lesão de aspecto mole na superfície do fruto, que evolui rapidamente provocando o endurecimento da casca, a qual apresenta um aspecto quebradiço e esponjoso. Em ambientes úmidos, pode ser observada a presença de picnídios de coloração preta. Os esporos cobrem a superfície do fruto dando aparência de carvão, podendo ser facilmente removidos com a mão. O fungo costuma atacar frutos contaminados por *Phytophthora*, ou a região de enxertia, aproveitando-se de uma abertura para se desenvolver (Kimati *et al.*, 1997).

2.3. Podridão-parda

Atualmente, com o desenvolvimento de clones resistente a vassoura-de-bruxa e o manejo adequado da doença, a podridão-parda voltou a figurar como a principal doença do cacaueteiro no Brasil (Kimati *et al.*, 1997), levando a perdas de cerca de 20 a 30 % da produção anual (Oliveira & Luz, 2005).

2.3.1. Sintomatologia

As diferentes espécies de *Phytophthora* responsáveis pela podridão-parda em cacaueteiro apresentam o mesmo tipo de sintoma, com diferença na agressividade e na distribuição geográfica (Bailey & Meinhardt, 2016). Os maiores danos causados por *Phytophthora* spp. no cacaueteiro são as infecções em frutos. Um dos primeiros sintomas observados no campo é a aparição de pequenas manchas escurecidas na superfície da casca visível aproximadamente 30 horas após a infecção em frutos em qualquer estágio de desenvolvimento. Em condições de alta umidade, em 3 a 5 dias a lesão expande-se e o oomiceto produz esporângios esbranquiçados na superfície do fruto. Em frutos jovens, os sintomas mais comuns são: manchas, enrugamento e posterior escurecimento, podendo ser facilmente confundido com murcha fisiológica. Quando frutos já desenvolvidos são infectados, as amêndoas podem ser parcialmente ou totalmente aproveitadas (Oliveira & Luz, 2005; Silva Neto *et al.*, 2001).

A doença também pode se desenvolver no tronco devido a dispersão do micélio e estruturas reprodutivas do patógeno a partir de frutos e folhas infectadas, apresentando sintomas de cancro. Neste caso, observe-se manchas escuras de forma arredondadas na superfície da casca do tronco. Em estágios mais avançados, pode ser observada exsudação e necrose do tecido, podendo matar a planta ao se aprofundar até o lenho (Oliveira & Luz, 2005; Silva Neto *et al.*, 2001).

O patógeno pode ainda infectar folhas e raízes. A infecção das folhas não é tão importante quanto a dos frutos, mas deve ser levada em consideração por servir como fontes de inóculo. Os sintomas nas folhas se manifestam 24 horas após a infecção, pelo aparecimento de pontos escuros, atingindo rapidamente as nervuras, as quais necrosam e a folha se torna seca e de coloração castanha. O micélio e estruturas reprodutivas do patógeno são produzidos na superfície da folha infectada (Luz *et al.*, 2001).

2.3.2 Etiologia

A podridão-parda é causada por um conjunto de espécies de *Phytophthora* (Luz *et al.*, 2001), um “pseudo-fungo” pertencendo ao Reino Straminipila, Filo Oomycota, Classe Oomycetes, Ordem Peronosporales, Família Phytiaceae (Ho, 2018). Existem 313 espécies de *Phytophthora* atualmente relatadas no mundo, sendo 7 dessas causadoras da podridão-parda em cacau (Ho, 2018; Bailey & Meinhardt, 2016). No Brasil, a doença foi por vários anos atribuída à espécie *Phytophthora palmivora*, porém, posteriormente descobriu-se que outras espécies como *P. capsici* e *P. citrophthora* também estavam associadas à doença, levando a ocorrência de epidemias severas contínuas (Silva Neto *et al.*, 2001). Diferentes espécies de *Phytophthora* (*P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*) têm sido relatadas como as principais causadoras da podridão-parda em todo o mundo, sendo que 4 das principais espécies foram relatadas no país (End *et al.*, 2014; Guest, 2007; Ali *et al.*, 2016; Faleiro *et al.*, 2004). *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 & Meinhardt, 2016). *Phytophthora citrophthora* e *P. capsici* também têm sido descritas como sendo de importância econômica para a cultura do cacau no Brasil (Lawrence *et al.*, 1990; Bailey & Meinhardt, 2016). Estima-se que as perdas, em cacau, causadas por *P. palmivora* podem variar entre 20-30% em todo

o mundo, podendo levar a morte cerca de 10% das plantas (Flood *et al.*, 2004; Bailey & Meinhardt, 2016).

2.3.3. Morfologia

As espécies de *Phytophthora* produzem micélio branco, cenocítico, hialino, apresentando alguns septos em culturas velhas. Os esporangióforos apresentam ramificação simpodial ou irregular e produzem esporângios ovoides, obpiriformes a limoniformes, podendo germinar diretamente (formando um tubo germinativo) ou indiretamente (liberando zoósporos) (Luz *et al.*, 2001; Ho, 2018). Os esporangios podem ser papilados, semipapilados ou não-papilados, caducos ou persistentes (Bush *et al.*, 2006). Os zoósporos são hialinos, ovoides, biflagelados e são liberados pelo ápice dos esporângios. Estas estruturas, propágulos móveis, são a principal unidade de infecção, se dispersando pela água e encistando na superfície do hospedeiro, posteriormente germinando e infectando o hospedeiro (Luz *et al.*, 2001; Ho, 2018). O patógeno pode produzir clamidósporos, estruturas de sobrevivência, de coloração hialina a amarela/castanha, esféricos, intracelulares ou terminais, de parede fina, sendo delimitados por septo, germinando produzindo esporângios (Ho, 2018). *Phytophthora* spp. podem ser homotáticas ou heterotáticas. Durante a reprodução sexual, ocorre o contato gametangial entre oogônio e anterídio, produzindo um oósporo inicialmente hialino, que se torna amarelado a castanho com parede espessa (Luz *et al.*, 2001). O oósporo tem formato esférico com um único oôgonio, quando possui, apresenta um periplama fino. O anterídio pode ser anfígeno ou parágino (Ho, 2018; Erwin *et al.*, 1983). Ao germinar, o oósporo emite um tubo germinativo produzindo um a dois esporângios na sua extremidade ou se desenvolvendo diretamente como micélio (Luz *et al.*, 2001).

2.3.4. Epidemiologia e controle

As espécies de *Phytophthora* causadoras da podridão-parda possuem um ciclo de vida semelhante entre elas, se dividindo numa fase sexuada e uma fase assexuada. A fase sexuada é a mais frequentemente encontrada na natureza (Kudjordjie, 2015).

A fase sexuada de *Phytophthora* spp. pode apresentar uma reprodução homotálica ou heterotálica, sendo que no segundo caso, é necessário o acasalamento de dois isolados compatíveis denominados *mating-type* (A1 e A2) para ocorrer a formação dos oósporos (Erwin *et al.*, 1983; Luz *et al.*, 2001; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018). Na ocorrência da fase sexuada, ainda que raramente, pode-se apresentar uma alteração decorrente da quebra de resistência por apresentar alta variabilidade genética (Kudjordjie, 2015). Para algumas espécies nunca foi identificado o *mating-type*, daí foram consideradas estéreis, como é o caso de *P. citrophthora* (Luz *et al.* 2001).

Na fase assexuada o *Phytophthora* sp. produz clamidósporos (estruturas de sobrevivências) e em condições favoráveis (umidade relativa >80%, temperatura entre 20 e 25°C e disponibilidade de água livre) germinam e dão origem aos esporângios (Akrofi *et al.*, 2015; Luz *et al.*, 2001; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018). Os esporângios então liberam os zoósporos (presença de flagelo para locomoção) que podem ser dispersos a longas distâncias pela água e infectar outras plantas. Outra forma de infecção pelos zoósporos ocorre à partir dos respingos d'água que levam as estruturas presente no solo para a superfície dos frutos, estes encistam, penetram no tecido da planta e causa infecção (germinação indireta). A infecção pode ser direta através do micélio, neste caso, ocorre a produção de um tubo germinativo que penetra o tecido do hospedeiro (germinação direta) (Oliveira *et al.*, 2014; Kudjordjie, 2015; Ho, 2018).

O controle da podridão-parda é realizado pelo manejo rigoroso da cultura no campo, removendo os tecidos sintomáticos para reduzir a fonte de inóculo e aumentando o espaçamento entre as plantas para diminuir a umidade e aumentar a aeração nas entrelinhas. O controle

químico é feito com base de cobre, de forma protetiva e tem sido o método mais utilizado pelos produtores para evitar que as plantas fiquem doentes. No entanto, não é o mais eficiente e apresenta inconvenientes logísticos e ambientais, além do seu custo alto para pequenos produtores (Kudjordjie, 2015).

O desenvolvimento de clones resistentes a *Phytophthora* sp. é o mais eficiente dos métodos de controle desenvolvidos a longo prazo. Apesar de existir a possibilidade de quebra de resistência, a menor ocorrência da fase sexuada de *Phytophthora* permite um maior manejo da resistência nos campos de produção. No caso de *P. megakaria*, medidas quarentenárias são adotadas a fim de evitar a entrada do patógeno no Brasil (Kudjordjie, 2015).

2.4. Sistemas de cultivo

Grande parte do cacau do sul da Bahia é produzido sob o sistema ‘cabruca’. O cacau cabruca é produzido sob a floresta nativa, e o nome cabruca vem do verbo ‘cabrocar’ que representa a ação de cortar parte da floresta nativa para plantar cacau (Lobão, 2007). Foi considerado por muito tempo um método bastante produtivo, apesar da dificuldade de manejo, por possuir uma relação equilibrada entre as plantas, beneficiando assim ao cultivo do cacau.

Apesar do ambiente ser desfavorável ao desenvolvimento de pragas como a broca-do-fruto (*Conopomorpha cramerella*), grande predador para o cultivo de cacau (Sanchez, 2011), ou de doenças fungicas tais como vassoura-de-bruxa ou podridão-parda, a produtividade sob esses sistema de cultivo é inferior aos demais sistemas de cultivo tal como o sistema pleno sol (Cassano *et al.*, 2009).

No cultivo cabruca, o sombreamento irregular do cultivo, favorece uma maior heterogeneidade de desenvolvimento das plantas, podendo até mesmo diminuir a produtividade. O método cabruca é um plantio realizado em área desuniforme, o que

impossibilita o controle de irrigação e adubação, além da menor densidade de plantas (Piasentin & Saito, 2014; Silva Neto *et al.*, 2001).

O cacau também é comumente cultivado no sistema agroflorestal (SAF), onde numa mesma área são plantadas mudas de cacau e plantas de interesse econômico, com pelo menos um tipo de planta lenhosa (Nair, 1993). Os SAFs tentam se aproximar ecologicamente de uma floresta, possibilitando um desenvolvimento equilibrado entre as plantas, limitando o uso de produtos químicos, adubação artificial e irrigação controlada (Piasentin & Saito, 2014).

O dossel de copas formado pela diversidade de espécies vegetais proporciona cobertura de solo através da deposição de camada densa de matéria orgânica, gerada continuamente pela queda de folhas e ramos. Isso aumenta a proteção do solo contra erosão, diminui o escoamento superficial da água de chuva (aumentando o tempo de infiltração), reduz a temperatura do solo, aumenta a quantidade de matéria orgânica e, conseqüentemente, melhora as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Piasentin & Saito, 2014; Silva Neto *et al.*, 2001). Além disso, por se tratar de conjunto de culturas de interesse econômico, os SAFs apresentam alto valor agregado através do aproveitamento dos produtos de cada cultura. No caso do cacau, várias espécies vegetais podem ser usadas em SAF, sendo a principal cultura a seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Silva Neto *et al.*, 2001).

A produtividade do sistema SAF é maior que no cabruca, porém menor que no pleno sol. Por ser um sistema que exige maiores cuidados para implementação, devido principalmente às dificuldades de manejo de culturas diferentes num mesmo ambiente, o sistema SAF não é o mais utilizado (Piasentin & Saito, 2014; Silva Neto *et al.*, 2001). É importante ressaltar que o sistema SAF pode apresentar um risco para o cultivo do cacau por serem ambos hospedeiros de *P. capsici*, *P. cirophthora*, *P. heveae* e *P. palmivora*, umas das principais espécies responsáveis pela padrdão parda (Pereira *et al.*, 1996).

O consórcio de cacau e culturas como o coco tem como principais objetivos o melhor aproveitamento da área de cultivo, onde o cacau é plantado nas entrelinhas (6 metros) da plantação de coqueiro, e a exploração econômica de duas culturas distintas numa mesma área. Semelhante ao SAF, o consórcio cacau-coco necessita de um sistema de manejo mais complexo por se tratar de duas culturas distintas numa mesma área de plantio, com produtividade média sendo menor que o sistema a pleno sol (Silva Neto *et al.*, 2001). Uma ampla variedade de outras culturas como açaí (*Euterpe oleracea*) e mamão (*Carica papaya*) também são plantadas em consórcio com o cacau. No caso do consórcio cacau-coco, foi relatado a ocorrência de *P. palmivora* em coqueiro, este podendo servir como fonte de contaminação para os cacauzeiros (Garcia *et al.*, 1999).

Finalmente, o cultivo a pleno sol é largamente utilizado em todo o mundo para a produção de cacau, sendo considerado o método mais produtivo. O cacauzeiro é muito sensível durante os primeiros anos de vida e precisa de sombra para se desenvolver (Adafax, 2013). Os danos causados pelo sol podem ser devastadores para uma planta jovem, formando rachaduras nos ramos e no tronco, e podendo levar a morte da planta. Como solução para esse problema, as mudas de cacau são plantadas debaixo de bananeiras, que têm as funções de sombreamento para o cacau, e quebra vento (o cacau plantado numa área desprovida de árvores é muito mais suscetível aos efeitos do vento, que pode danificar as plantas de cacau ainda jovens). As bananeiras também são fonte de renda nos primeiros anos do cultivo, quando o cacau ainda não está produzindo. O cultivo a pleno sol permite um melhor controle das condições de desenvolvimento das plantas e facilita o manejo (Sodré, 2017). Este método permite a plantação adensada sob irrigação e adubação controlada, aumentando consideravelmente a produtividade quando são aplicadas boas práticas de manejo. No entanto, a competição ocorrendo entre as plantas é muito maior, por isso a ocorrência de doenças no sistema pleno sol é mais importante que no sistema cabruca, por exemplo (Sodré, 2017; Silva Neto *et al.*, 2001).

2.5. Métodos de identificação

Devido à grande variabilidade intra e interespecífica, o trabalho de identificação morfológica de *Phytophthora* spp. se torna bastante difícil. Diversos critérios morfológicos e biométricos foram adotados por de chaves de identificação tais como Waterhouse (1963), Newhook *et al.* (1978) e Stamps *et al.* (1990) no intuito de facilitar a identificação, revelando-se muitas vezes insuficientes. Atualmente, é indispensável o uso de marcadores genéticos (além de caracteres morfológicos) na identificação, classificação e estudos de diversidade. Inicialmente, foram utilizados marcadores obtidos por eletroforese de proteínas totais, isoenzimas, polimorfismos de DNA e RNA, análise de cariótipo, serologia, antígenos e sondas de DNA espécie-específicas. O sequenciamento de diferentes regiões genômicas (abordagem multigênica) como β -tubulina (β -tub), Citocromo Oxidase Subunidade II (COXII), Fator De Elongação 1 α (EF1 α), *Internal Transcribed Spacer* (ITS) e *Heat Shock Protein 90* (HSP90) têm se mostrado eficiente na identificação das diferentes espécies de *Phytophthora* (Martin *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2017; Faleiro *et al.*, 2004). Recentemente, foi desenvolvido um método de identificação baseado em PCR espécie-específica, permitindo a rápida identificação das quatro principais espécies de *Phytophthora* afetando o cacauero (*P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*) (Ali *et al.*, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras

Amostras de cacau (frutos e ramos) apresentando sintomas típicos de infecção por *Phytophthora* spp. foram coletadas em Junho/Julho e Dezembro de 2017 nos municípios de Porto Seguro (cultivo a pleno sol), Eunápolis [consórcio coco (*Cocos nucifera*)/cacau], Barro Preto (cabruca) e Igrapiúna [agrofloresta seringueira (*Hevea brasiliensis*)/cacau], no estado da Bahia, Brasil. Adicionalmente, com o objetivo de avaliar uma possível relação entre a presença de estruturas do patógeno sobrevivendo no solo e a observação de doença nos frutos e ramos, foram coletadas amostras de solo e serapilheira (principalmente folhas de cacau no solo) próximo (50cm X 20cm) da base das plantas de cacau. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel, e as amostras de solo em sacos plásticos do tipo *zip-lock*. Quando necessário, foi adicionado água destilada esterilizada (ADE) para manter as amostras úmidas. Os materiais coletados foram armazenadas em caixas de isopor e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do *Mars Center for Cacao Science* (MCCS).

Os frutos sintomáticos foram coletados com auxílio de uma tesoura de poda (desinfestada superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 2% v/v), e obtidas as medidas de distância entre o fruto (pedúnculo) e solo (Figuras 1A e B). As amostras de cancro foram coletadas, a partir da região de transição entre tecidos doente e sadio, com auxílio de lâmina de aço desinfestada superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 2% v/v (Figuras 1C e D). Nos pontos onde foram coletados frutos, foram obtidas amostras de solo e serapilheira. Inicialmente foram coletadas as folhas (serapilheira) cobrindo a superfície do ponto de coleta do solo (Figura 1E) e, em seguida, amostrado solo (5-10cm de profundidade; Figura 1F) para isolamento de *Phytophthora* spp. As amostras foram identificadas com o número do ponto de coleta (contendo os dados de coordenadas geográficas) seguido das letras 'F', 'FS' e 'S', para amostras de fruto, serapilheira e solo, respectivamente.



Figura 1. Amostras coletadas em condições de campo. (A e B) - frutos de cacau clone ‘CCN51’ apresentando sintomas típicos de infecção por *Phytophthora* spp. (podridão-parda); (C e D) - ramos de cacau clone ‘CCN51’ apresentando sintomas de cancro; (E) - amostra de serapilheira coletada próximo a base de plantas de cacau clone ‘PS1319’; (F) - amostra de solo coletada próximo a base de plantas de cacau clone ‘PS1319’.

3.2. Isolamento e armazenamento dos isolados

3.2.1. Obtenção dos isolados de frutos

Frutos sintomáticos foram lavados em água corrente e detergente, e secos em papel. Foram removidos fragmentos (4x4cm) da região de transição entre tecidos doente e sadio, e levados para câmara de fluxo laminar. A desinfestação superficial do tecido vegetal foi realizada em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio (2% v/v; 5 min), lavados duas vezes em ADE e secos em papel toalha esterilizado. O isolamento de *Phytophthora* spp. também foi realizado sem desinfestação superficial dos fragmentos de frutos. Em condições assépticas, foram obtidos fragmentos menores (0,5cmx0,5cm) da região interna do tecido vegetal (50% doente e 50% sadio), depositados em meio BDA-PARP (batata-dextrose-ágar contendo antibióticos pimaricina, ampicilina e rifampicina e fungicida PCNB respectivamente em concentrações de 10; 250; 10 e 100 mg/L), o meio BDA sintético, seguindo as recomendações do fabricante (Kasvi) e mantidos a 25°C por 48h (Jung *et al.*, 2003; Ruano-Rosa *et al.*, 2018; Alfenas *et al.*, 2016). O crescimento micelial a partir dos fragmentos dos frutos, foi repicado em meio de cultivo LIT3 (composto de massa de tomate, cenoura e carbonato de cálcio) preparação caseira da empresa Mars Cacau (Figura 2).

Após a obtenção das culturas puras, os isolados foram depositados na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília e armazenados em água esterilizada (Método de Castellani), com seis discos miceliais de 5 mm de diâmetro, obtidos à partir de culturas em CA, foram transferidos para tubos de 2 mL contendo 1 mL de água destilada esterilizada. Para o armazenamento em glicerol foram retirados seis discos miceliais de 5 mm de diâmetro, obtidos à partir de culturas em CA e transferidos para tubos de 2 mL contendo 1 mL de glicerol a 10 %. Por fim o armazenamento realizado em BDA coberto por óleo mineral, retirou-se apenas 1 disco micelial de 5 mm de diâmetro, obtido à partir de cultura em CA e transferido para tubos de 5 mL contendo meio BDA inclinado. Aproximadamente 5 a 7 dias após o crescimento

micelial, atingindo a superfície total do meio de cultivo, foi adicionado o óleo mineral à 17°C da marca Nujól (Gonçalves *et al.*, 2007).

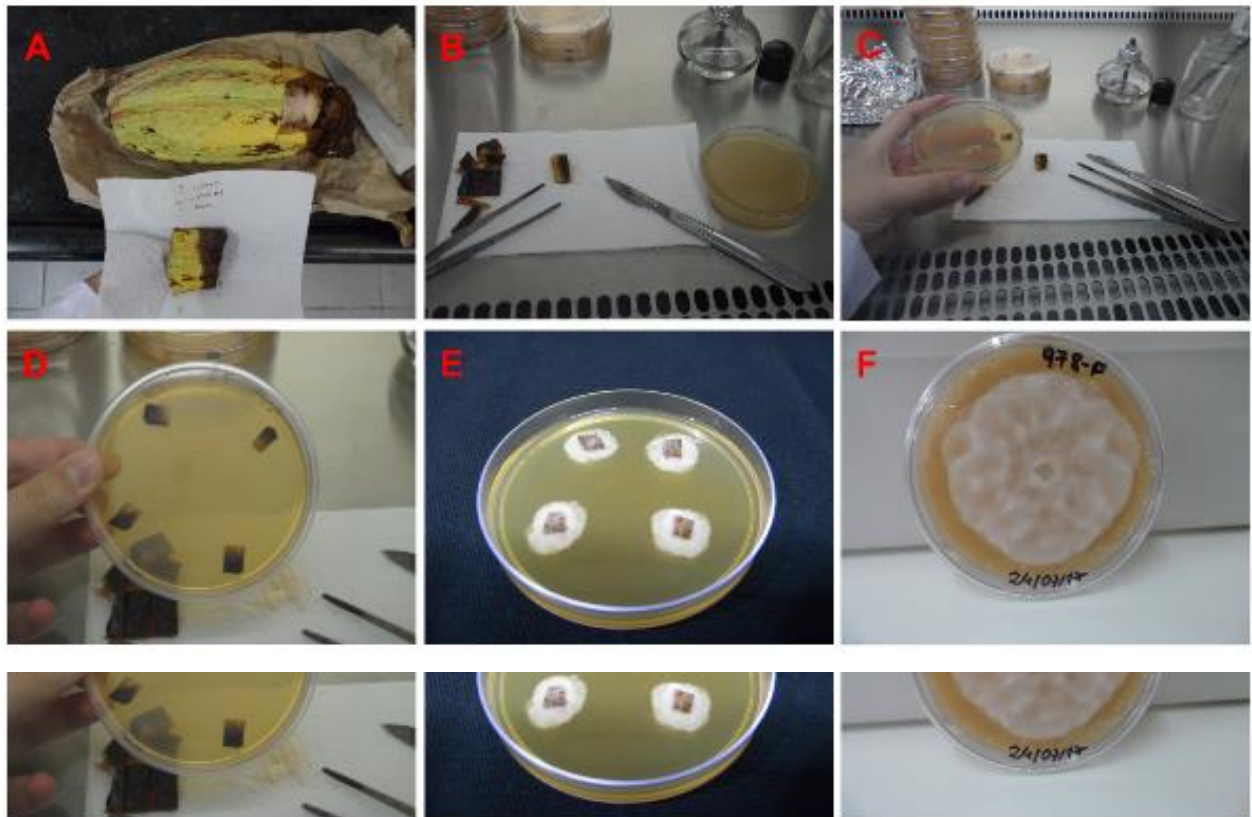


Figura 2. Isolamento de *Phytophthora* spp. a partir de fruto sintomático. (A) - fragmento obtido após limpeza superficial do fruto com água e detergente; (B-D) - fragmentos provenientes da região de transição entre tecidos sadio e doente, depositados em meio BDA-PARP; (E) - crescimento micelial após 48h de incubação a 25°C; (F) - isolado de *Phytophthora* spp. em meio LIT3 após 72h de incubação a 25°C.

3.2.2. Obtenção dos isolados de solo e serapilheira

Para isolamento de *Phytophthora* spp. a partir das amostras de solo e serapilheira, foram utilizados frutos de cacau e maçã como isca. Frutos sadios de cacau (cinco meses) ‘clone CCN51’ foram lavados em água corrente e sabão, secos em papel, e realizado ferimento (2cmx2cmx1cm) com auxílio de furador de cortiça previamente flambado. Amostras de solo foram umedecidas com ADE, depositadas na superfície dos frutos (com ferimento), e mantidos em câmara úmida a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias. As iscas apresentando sintomas de podridão foram utilizadas para isolamento indireto em meio BDA-PARP (Figura 3) (Alfenas *et al.*, 2016).

Para os frutos de maçã, foram realizados 5-6 ferimentos (em pontos equidistantes) na superfície dos frutos com auxílio de palito esterilizado. As maçãs foram depositadas no saco plástico do tipo *zip-lock* contendo as amostras de solo umedecidas com ADE, direcionando a superfície com ferimentos em contato com solo possivelmente infestado por *Phytophthora* spp. Os sacos foram mantidos fechados a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias. Adicionalmente, fragmentos de frutos de cacau ‘clone CCN51’ foram utilizados como isca. As iscas apresentando sintomas de podridão foram utilizadas para isolamento indireto em meio BDA-PARP (Figura 4).

Para isolamento a partir das amostras de serapilheira, as folhas foram misturadas com solo esterilizado e umedecido com ADE. Foram utilizados frutos de maçã e fragmentos de cacau como isca, seguindo o protocolo descrito anteriormente para amostras de solo. Os recipientes tipo béquer (contendo serapilheira e iscas) foram cobertos com papel alumínio e mantidos a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5-7 dias. As iscas apresentando sintomas de podridão foram utilizadas para isolamento indireto em meio BDA-PARP (Figura 5).

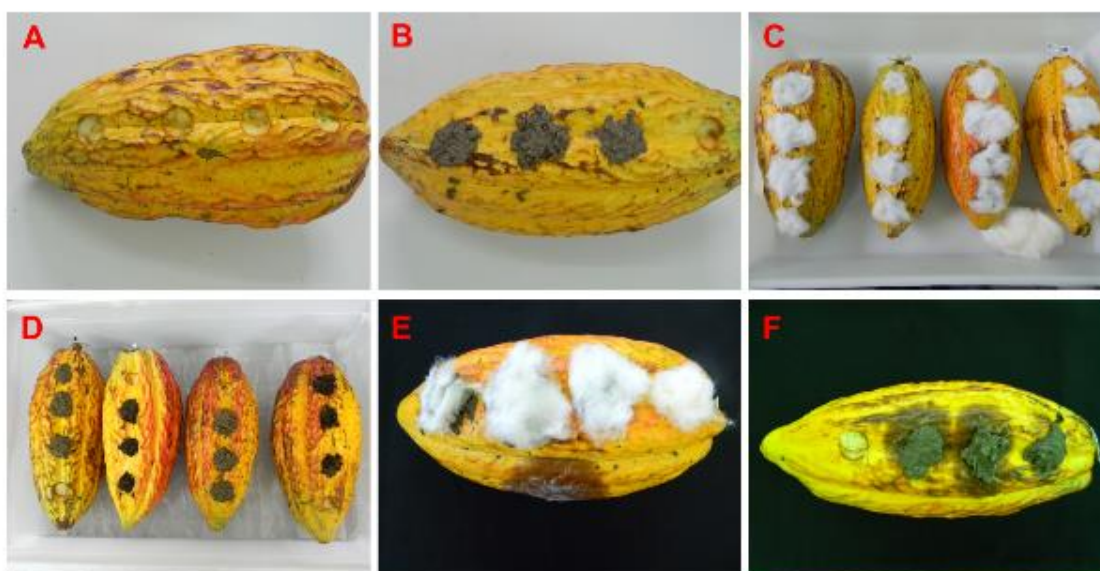


Figura 3. Isolamento, a partir de solo, utilizando frutos de cacau clone ‘CCN51’ como isca. (A) - ferimentos realizados na superfície do fruto/isca sadio; (B) - deposição de amostras de solo (umedecida com ADE) em frutos (com ferimento); (C e D) - incubação dos frutos em câmara úmida; (E) - fruto de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão fora do local de inoculação); (F) - fruto de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão surgindo a partir do ponto de inoculação).

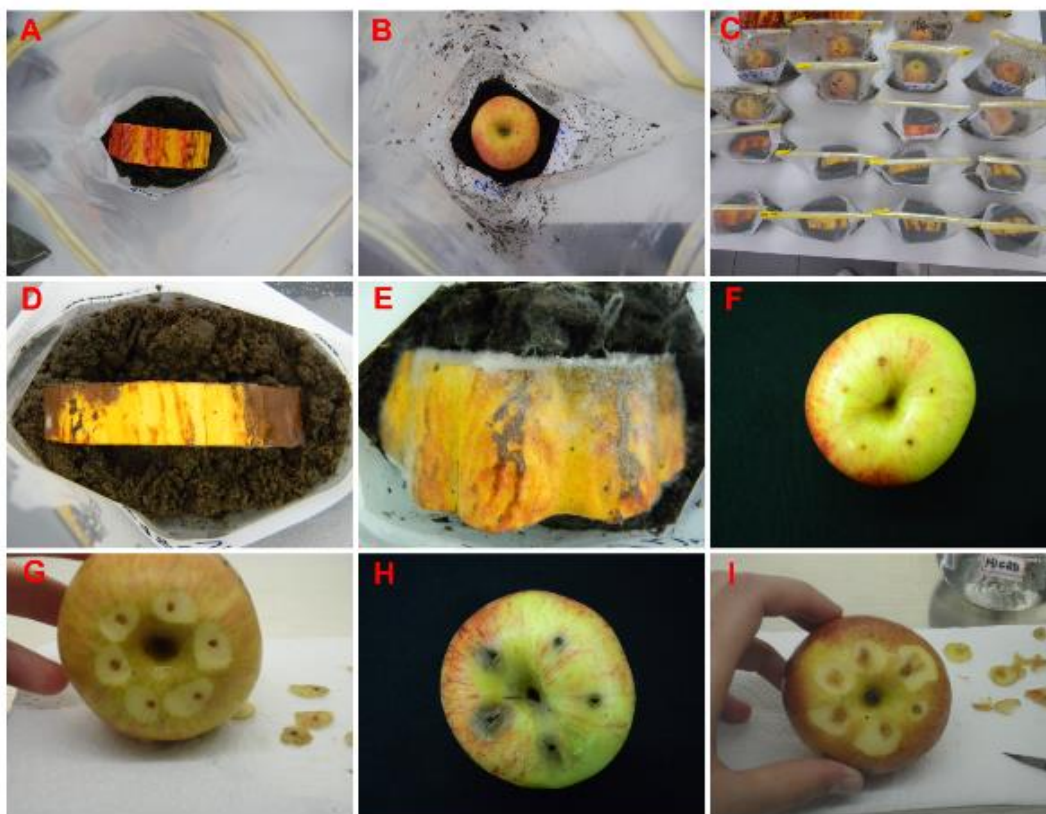


Figura 4. Isolamento, a partir de solo, utilizando fragmentos de frutos de cacau clone ‘CCN51’ e maçã como isca. (A) - fragmento de cacau depositado sobre amostra de solo umedecida com ADE; (B) - maçã (com fermento) depositada sobre amostra de solo umedecida com ADE; (C) - incubação dos frutos da maçã e fragmentos de cacau (sobre o solo) em câmara úmida; (D) - fragmento de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (sintomas de podridão surgindo a partir do ponto de contato com o solo); (E) - fragmento de cacau após 5 dias de incubação em câmara úmida (surgimento de sinais, porém sem sintomas aparentes de podridão); (F e G) - fruto de maçã após 5 dias de incubação em contato com o solo (sem sintomas de podridão); (H e I) - fruto de maçã após 5 dias de incubação em contato com o solo (sintomas de podridão).

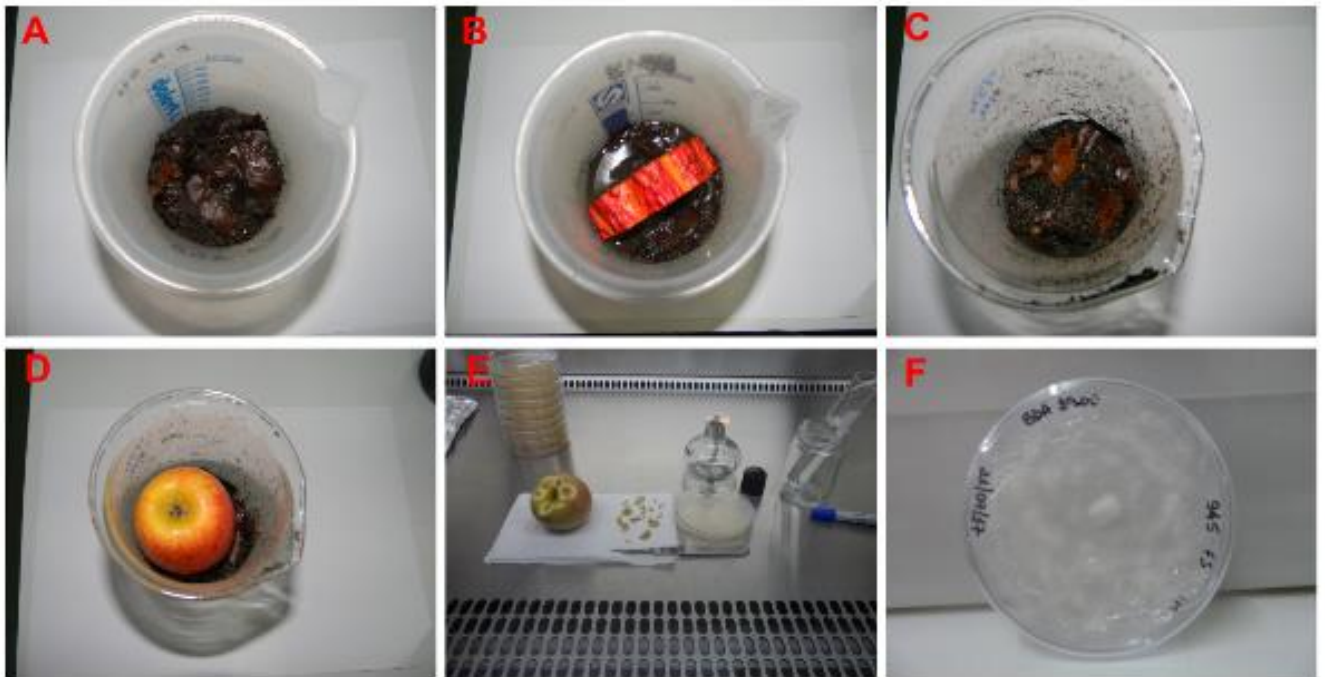


Figura 5. Isolamento, a partir de serapiheira, utilizando fragmentos de frutos de cacau clone ‘CCN51’ e maçã como isca. (A e B) - fragmento de cacau depositado sobre amostra de serapiheira misturada com solo autoclavado e umedecido com ADE; (C e D) - fruto de maçã (com fermento) depositado sobre amostra de serapiheira misturada com solo autoclavado e umedecido com ADE; (E e F) - isolamento indireto de *Phytophthora* spp., a partir de fruto/isca sintomático, em meio BDA-PARP.

3.3. Extração do DNA

No intuito de garantir pureza genética dos isolados, foram inicialmente obtidas culturas monohifais. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio cenoura-ágar (CA- sendo utilizado 200g de cenoura batidas no liquidificador e filtradas para 1 litro de meio) coberto com papel celofane esterilizado, e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 3 a 5 dias. O crescimento micelial foi removido com auxílio um palito de madeira estéril e depositado em microtubos de 1,5 mL contendo 50 μL de tampão Tris-EDTA (TE), quatro *beads* de metal e 600 μL de *Nuclei Lysis Solution*. A extração de DNA total foi realizada utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) conforme Pinho *et al.* (2012). Para avaliar a qualidade do DNA obtido, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,7%, corado com GelRed (Biotium) e

visualizado sob luz UV. As amostras foram armazenadas a -20°C para serem utilizadas posteriormente.

3.4. Amplificação e sequenciamento

DNA total dos diferentes isolados foram utilizados, individualmente, como molde para amplificação de diferentes regiões genômicas via *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para identificação preliminar, foi inicialmente amplificada e sequenciada a região parcial do gene β -tubulina de todos os isolados. Para confirmação da identificação, isolados representativos de cada espécie e local de coleta foram selecionados para amplificação e sequenciamento de regiões genômicas adicionais (COXII, EF1 α , ITS e HSP90). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 12,5 μ : 6,25 μ L de MyTaq MasterMix 2x, 0,3 μ L de cada iniciador (Tabela 1), 4,25 μ L de água ultrapura (Milli-Q) e 1 μ L de DNA molde (25 ng/ μ L). Os parâmetros utilizados durante os ciclo da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 1,5 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 20 s, 60°C (β -tubulina) por 45 s, e 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 5 min. A temperatura de anelamento variou de acordo com a região genômica a ser amplificada: 62°C (HSP90), 60°C (EF1 α), 50°C (COXII) e 58°C (ITS). Além disso, foram utilizados tempos de extensão distintos: COXII e ITS (45 s), EF1 α (1 min) e HSP90 (1 min e 30 s). A confirmação do tamanho e pureza dos produtos de PCR foi realizada via eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com GelRed (Biotium) e visualizado sob luz UV. Finalmente, os produtos de PCR foram enviados para Macrogen Inc., (Coréia do Sul) para serem purificados e sequenciados comercialmente.

Tabela 1. Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento de regiões genômicas dos isolados de *Phytophthora* spp.

Região genômica	Primer	Sequencia do Primer (5' to3')	Referência
ITS	DC6	GAGGGACTTTTGGGTAATCA	Bonants <i>et al.</i> , 1997
	LR0	GCT TAA GTT CAG CGG GT	Choi <i>et al.</i> , 2006
COX2	COX2-F	GGC AAA TGG GTT TTC AAG ATC C	Hudspeth <i>et al.</i> , 2000
	COX2-R	CCA TGA TTA ATA CCA CAA ATT TCA CTA C	Hudspeth <i>et al.</i> , 2000
EF1 α	EF1AF	TCA CGA TCG ACA TTG CCC TG	Blair <i>et al.</i> , 2008
	EF1AR	ACG GCT CGA GGA TGA CCA TG	Blair <i>et al.</i> , 2008
HSP90	HSP90F1	GCT GGA CAC GGA CAA GAA CC	Blair <i>et al.</i> , 2008
	HSP90R2	CGT GTC GTA CAG CAG CCA GA	Blair <i>et al.</i> , 2008
B-TUB	BTubF1	GCC AAG TTC TGG GAG GTC ATC	Blair <i>et al.</i> , 2008
	BtubR1	CCT GGT ACT GCT GGT ACT CAG	Kong <i>et al.</i> , 2004

3.5. Análise de sequências e filogenia

As sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas utilizando o programa DNAbaser, e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foi corrigido por comparação das sequências senso e anti-senso. As sequências parciais do gene β -tubulina foram inicialmente analisadas com o algoritmo BLASTn e o banco de dado não-redundante GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para determinar as espécies com as quais elas compartilham maior identidade. Após identificação inicial, isolados representativos de cada espécie e localidade foram utilizados para reconstrução filogenética por inferência Bayesiana dos dados concatenados das regiões β -tubulina, EF1 α e HSP90. Os conjuntos de dados compreenderam os isolados relatados no presente trabalho, e sequências de *Phytophthora* spp. a partir dos clados 2, 4 e 5 (Blair *et al.*, 2008; Martin & Radmer, 2009; Coffey *et al.*, 2009; Bezuidenhout *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017). Alinhamentos múltiplos foram obtidos utilizando o software MEGA 7, e ajustados manualmente. Árvores filogenéticas Bayesianas foram inferidas para os

conjuntos de dados individual (β -tubulina) e concatenados (β -tubulina, EF1 α e HSP90) empregando o método de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). MrMODELTEST 2.3 (Posada e Buckley, 2004) foi utilizado para selecionar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos cada região gênica. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com o *Akaike Information Criterion* (AIC). A análise de inferência Bayesiana (IB) foi concluída com MrBayes v. 3.1.2 (Rannala & Yang, 1996; Mau *et al.* 1999; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) no CIPRES *web portal* (Miller *et al.*, 2010). Duas replicações com quatro cadeias cada foram conduzidas por 10^7 de gerações, amostrando a cada 10^3 gerações, resultando em um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas como uma fase *burn-in*. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang, 1996) foram determinados a partir da árvore consenso gerada com as 7.500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos.

Tabela 2. Banco de dados utilizado para análise filogenética.

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. acerina</i>	61H1	Não informado	Não informado	KX250713	KX250716	KX250714	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. acerina</i>	61H2	Não informado	Não informado	KX250720	KX250723	KX250721	Solo	Italia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. aff. capsici</i>	22F5	Não informado	Não informado	KX250706	KX250709	KX250707	<i>Nicotiana tabacum</i>	Carolina do Norte, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. aff. citrophthora</i>	26H4	AY995364.1	Não informado	KX250615	KX250618	KX250616	NI	NI	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. aff. himalsilva</i>	61G4	Não informado	Não informado	KX250622	KX250625	KX250623	<i>Castanopsis</i> sp.	Nepal	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. agathidicida</i>	67D5	Não informado	Não informado	KX251077	KX251080	KX251078	<i>Agathis australis</i>	Nova Zelândia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. alticola</i>	47G5	Não informado	Não informado	KX251007	KX251010	KX251008	<i>Eucalyptus dunnii</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. arenaria</i>	55C2	Não informado	Não informado	KX251014	KX251017	KX251015	Solo	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. arenaria</i>	62B7	Não informado	Não informado	KX251021	KX251024	KX251022	Solo	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. bisheria</i>	29D2	Não informado	Não informado	KX250874	KX250877	KX250875	<i>Rubus idaeus</i> cv. canby	Wisconsin, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. bisheria</i>	PD_00066	HQ261503.1	GU221940.1	EU080742	EU080745	EU080743	<i>Fragaria</i> \times <i>ananassa</i>	Carolina do Norte, USA	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. bisheria</i>	PD_00051	Não informado	JF771251.1	EU080613	EU080616	EU080614	<i>Rhododendron</i> sp.	Carolina do Norte, USA	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. bisheria</i>	P11311	Não informado	GU221941	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Martin & Radmer, 2009
<i>P. bisheria</i>	P7191	GU259076	GU221942	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Martin & Radmer, 2009
<i>P. botryosa</i>	22H8	EF423556.1	Não informado	KX250524	KX250527	KX250525	<i>Heavae</i> sp.	Tailandia	Yang <i>et al.</i> , 2017

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. botryosa</i>	46C2	KF317072.1	Não informado	KX250531	KX250534	KX250532	<i>Hevea brasiliensis</i>	Tailândia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. botryosa</i>	62C6	Não informado	Não informado	KX250538	KX250541	KX250539	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malásia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. botryosa</i>	PD_00144	JN618803.1	GU221948.1	EU079935	EU079938	EU079936	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malásia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. botryosa</i>	P6945	Não informado	GU221948	EU079935	EU079938	EU079936	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malásia	Martin & Radmer, 2009
<i>P. botryosa</i>	P3425	Não informado	GU221946	Não informado	Não informado	Não informado	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malásia	Martin and Radmer, 2009
<i>P. capensis</i>	62C1	Não informado	Não informado	KX250727	KX250730	KX250728	<i>Curtisia dentata</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. capensis</i>	62C2	Não informado	Não informado	KX250734	KX250737	KX250735	Água de riacho	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. capensis</i>	62C3	Não informado	Não informado	KX250741	KX250744	KX250742	<i>Olea campensis</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. capensis</i>	P1822	GU191219	Não informado	GU191325	Não informado	GU191196	Água de riacho	África do Sul	Bezuidenhout <i>et al.</i> , 2010
<i>P. capensis</i>	P1823	GU191231	Não informado	GU191327	Não informado	GU191198	<i>Olea campensis</i>	África do Sul	Bezuidenhout <i>et al.</i> , 2010
<i>P. capensis</i>	P1819	GU191232	JQ439415	GU191328	Não informado	GU191199	<i>Curtisia dentata</i>	África do Sul	Martin & Radmer, 2009
<i>P. capsici</i>	22F4	KF317073.1	Não informado	KX250636	KX250639	KX250637	<i>Capsicum annum</i>	Novo México, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. capsici</i>	P0630	AB367519	JF771280	EU080420	EU080423	EU080421	<i>Syzygium aromaticum</i>	Indonésia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. capsici</i>	P10386	GU259417	Não informado	EU079544	EU079547	EU079545	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. capsici</i>	P0253	Não informado	GU318299	EU080852	EU080855	EU080853	<i>Theobroma cacao</i>	México	Blair <i>et al.</i> , 2008

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. castaneae</i>	22H6	Não informado	Não informado	KX251084	KX251087	KX251085	<i>Castanea</i> sp.	Japão	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. castaneae</i>	30E7	Não informado	Não informado	KX251091	KX251094	KX251092	Solo	China	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. castaneae</i>	61J7	Não informado	Não informado	KX251098	KX251101	KX251099	Solo	Taiwan	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. citricola</i>	33H8	Não informado	Não informado	KX250748	KX250751	KX250749	<i>Citrus sinensis</i>	Taiwan	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. citricola</i>	33J2	Não informado	Não informado	KX250755	KX250758	KX250756	<i>Citrus</i> sp.	Japão	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. citricola</i>	P1814	GU191217	JQ439419	GU191321	Não informado	GU191192	<i>Citrus</i> sp.	África do Sul	Martin & Radmer, 2009
<i>P. citricola</i>	P10338	GU259256	Não informado	EU079526	EU079529	EU079527	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. citricola</i>	P6624	GU191230	Não informado	GU191326	Não informado	GU191197	<i>Fragaria x ananassa</i>	NI	Bezuidenhout <i>et al.</i> , 2010
<i>P. citrophthora</i>	03E5	Não informado	AY129208.1	KX250545	KX250548	KX250546	Água de irrigação	Virginia, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. citrophthora</i>	26H3	JF810420.1	Não informado	KX250552	KX250555	KX250553	NI	NI	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. citrophthora</i>	PD_00041	JN618789.1	JN618606.1	EU080538	EU080541	EU080539	<i>Theobroma cacao</i>	Indonésia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. citrophthora</i>	P6310	Não informado	Não informado	EU080538	EU080541	EU080539	<i>Theobroma cacao</i>	Indonésia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. cocois</i>	67D6	Não informado	Não informado	KX251105	KX251108	KX251106	<i>Cocos nucifera</i>	Hawaii, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. colocasiae</i>	22F8	AY995371.1	Não informado	KX250559	KX250562	KX250560	<i>Colocasia esculenta</i>	NI	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. colocasiae</i>	35D3	KF317076.1	Não informado	KX250566	KX250569	KX250567	<i>Colocasia esculenta</i>	Hawaii, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. colocasiae</i>	P10341	Não informado	Não informado	EU080385	EU080388	EU080386	<i>Syringa</i> sp.	Inglaterra	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. elongata</i>	33J3	Não informado	Não informado	KX250881	KX250884	KX250882	NI	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. elongata</i>	33J4	Não informado	Não informado	KX250888	KX250891	KX250889	NI	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. elongata</i>	55C4	Não informado	Não informado	KX250895	KX250898	KX250896	Solo	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. frigida</i>	47G6	Não informado	Não informado	KX250902	KX250905	KX250903	<i>Eucalyptus smithi</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. frigida</i>	47G7	Não informado	Não informado	KX250909	KX250912	KX250910	<i>Eucalyptus smithi</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. frigida</i>	47G8	Não informado	Não informado	KX250916	KX250919	KX250917	<i>Eucalyptus smithi</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. glovera</i>	31E5	Não informado	Não informado	KX250643	KX250646	KX250644	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brasil	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. glovera</i>	62B4	Não informado	Não informado	KX250650	KX250653	KX250651	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brasil	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. glovera</i>	P10618	Não informado	GU222019	Não informado	EU080219	EU080217	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. glovera</i>	P10619	Não informado	GU222020	EU080223	EU080226	EU080224	<i>Nicotiana tabacum</i>	Brasil	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. glovera</i>	P1037	GU259434	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Coffey <i>et al.</i> , 2009
<i>P. heveae</i>	22J1	Não informado	Não informado	KX251112	KX251115	KX251113	<i>Hevae</i> sp.	Malaysia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. heveae</i>	22J2	Não informado	Não informado	KX251119	KX251122	KX251120	Solo	Tennessee, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. himalsilva</i>	61G2	Não informado	Não informado	KX250573	KX250576	KX250574	<i>Quercus leucotricophora</i>	Nepal	Yang <i>et al.</i> , 2017

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. himalsilva</i>	61G3	Não informado	Não informado	KX250580	KX250583	KX250581	<i>Quercus leucotricophora</i>	Nepal	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. inflata</i>	PD_00024	Não informado	Não informado	EU080385	EU080388	EU080386	<i>Syringa</i> sp.	Reino Unido	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. inflata</i>	28D1	Não informado	Não informado	KX250762	KX250765	KX250763	<i>Fagus sylvatica</i>	Nova York, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. inflata</i>	28D3	Não informado	Não informado	KX250769	KX250772	KX250770	<i>Fagus sylvatica</i>	Nova York, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. inflata</i>	P7491	FJ801973	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	<i>Sambucus tenuifolium</i>	Inglaterra	Coffey <i>et al.</i> , 2009
<i>P. meadii</i>	22G5	AY995391.1	Não informado	KX250587	KX250590	KX250588	<i>Citrus</i> sp.	India	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. meadii</i>	61J9	Não informado	Não informado	KX250594	KX250597	KX250595	<i>Hevea brasiliensis</i>	India	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. meadii</i>	PD_00137	JN618785.1	JF771509.1	EU079888	EU079891	EU079889	<i>Hevea brasiliensis</i>	India	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. meadii</i>	P6128	GU259180	GU222061	EU079874	EU079877	EU079875	<i>Elettaria cardamomum</i>	India	Coffey <i>et al.</i> , 2009
<i>P. meadii</i>	P7493	GU259325	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Coffey <i>et al.</i> , 2009
<i>P. megakarya</i>	22H7	Não informado	Não informado	KX251028	KX251031	KX251029	<i>Theobroma cacao</i>	África	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. megakarya</i>	61J5	Não informado	Não informado	KX251035	KX251038	KX251036	<i>Theobroma cacao</i>	Cameroon	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. megakarya</i>	61J6	Não informado	Não informado	KX251042	KX251045	KX251043	<i>Theobroma cacao</i>	Nigéria	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. megakarya</i>	P8516	Não informado	GU222067	EU079970	EU079973	EU079971	<i>Theobroma cacao</i>	São Tomé	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. megakarya</i>	P8517	Não informado	Não informado	EU079977	EU079980	EU079978	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. mengei</i>	42B2	Não informado	Não informado	KX250657	KX250660	KX250658	<i>Persea americana</i>	California, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. mengei</i>	42B3	Não informado	Não informado	KX250664	KX250667	KX250665	<i>Persea americana</i>	California, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. mengei</i>	P1273	GU259125	GU222074	Não informado	Não informado	Não informado	<i>Persea americana</i>	California, USA	Martin & Radmer, 2009
<i>P. mengei</i>	P10139	GU259252	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Coffey <i>et al.</i> , 2009
<i>P. mengei</i>	P0513	GU191234	Não informado	GU191332	Não informado	GU191203	<i>Persea americana</i>	México	Bezuidenhout <i>et al.</i> , 2010
<i>P. mexicana</i>	45G4	Não informado	Não informado	KX250671	KX250674	KX250672	<i>Solanum lycopersicum</i>	Argentina	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. mexicana</i>	P0646	Não informado	GU222075	EU080703	Não informado	EU080704	<i>Solanum lycopersicum</i>	México	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. multivesiculata</i>	PD_00001	FJ801426.1	JF771528.1	EU080066	EU080069	EU080067	<i>Cymbidium</i> sp.	Nova Zelândia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. multivesiculata</i>	30D4	Não informado	Não informado	KX250923	KX250926	KX250924	<i>Cymbidium</i> sp.	Nova Zelândia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. multivesiculata</i>	P10327	Não informado	Não informado	EU079500	EU079503	EU079501	<i>Cymbidium</i> sp.	Nova Zelândia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. multivora</i>	55C5	Não informado	Não informado	KX250776	KX250779	KX250777	Solo	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. multivora</i>	P10458	Não informado	Não informado	EU079582	EU079585	EU079583	<i>Gardenia</i> sp.	California, USA	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. multivora</i>	STEU 6268	GU191226	Não informado	GU191312	Não informado	GU191183	<i>Agathosma crenulata</i>	África do Sul	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. multivora</i>	P7902	HQ261625	GU221976	EU080236	Não informado	Não informado	<i>Pinus radiata</i>	California, USA	Martin & Radmer, 2009
<i>P. occultans</i>	65B9	JX978155.1	Não informado	KX250601	KX250604	KX250602	<i>Buxus sempervirens</i>	Nova Zelândia	Yang <i>et al.</i> , 2017

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. pachypleura</i>	61H6	Não informado	Não informado	KX250783	KX250786	KX250784	Solo	Reino Unido	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. pachypleura</i>	61H7	Não informado	Não informado	KX250790	KX250793	KX250791	<i>Acuba japonica</i>	Reino Unido	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. pachypleura</i>	61H8	Não informado	Não informado	KX250797	KX250800	KX250798	Solo	Reino Unido	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. palmivora</i>	22G8	Não informado	Não informado	KX251049	KX251052	KX251050	<i>Citrus</i> sp.	Florida, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. palmivora</i>	22G9	Não informado	Não informado	KX251056	KX251059	KX251057	<i>Theobroma cacao</i>	Costa Rica	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. palmivora</i>	P0255	Não informado	GU222099	EU080339	EU080342	EU080340	<i>Theobroma cacao</i>	Costa Rica	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. palmivora</i>	P0113	GU259121	GU222098	EU080465	EU080468	EU080466	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. pini</i>	22F1	Não informado	Não informado	KX250804	KX250807	KX250805	<i>Rhododendron</i> sp.	Virginia, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. pini</i>	45F1	Não informado	Não informado	KX250811	KX250814	KX250812	<i>Pinus resinosa</i>	Minnesota, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. plurivora</i>	22E9	Não informado	Não informado	KX250818	KX250821	KX250819	<i>Kalmia latifolia</i>	Australia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. plurivora</i>	22F2	Não informado	Não informado	KX250825	KX250828	KX250826	<i>Rhododendron</i> sp. cv. "Olga Mezitt"	Nova York, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. plurivora</i>	33H9	Não informado	Não informado	KX250832	KX250835	KX250833	<i>Rhododendron</i> sp.	Alemania	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. plurivora</i>	P10679	Não informado	Não informado	EU079640	EU079643	EU079641	<i>Juglans regia</i>	Nova Zelândia	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. plurivora</i>	P1611	GU191233	Não informado	GU191330	Não informado	GU191201	Não informado	Não informado	Coffey <i>et al.</i> , 2009

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. quercetorum</i>	15C7	Não informado	Não informado	KX251063	KX251066	KX251064	Solo	Carolina do Norte, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. quercetorum</i>	15C8	Não informado	Não informado	KX251070	KX251073	KX251071	Solo	Carolina do Norte, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. quercetorum</i>	MD9.2	Não informado	Não informado	EU080901	EU080904	EU080902	Não informado	Não informado	Blair <i>et al.</i> , 2008
<i>P. quercetorum</i>	P15555	HQ261657.1	GU222124	Não informado	Não informado	Não informado	<i>Quercus rubra rhizosphere</i>	USA	Martin & Radmer, 2009
<i>P. quercina</i>	30A4	Não informado	Não informado	KX252648	KX252651	KX252649	<i>Quercus robur</i>	Alemania	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. quercina</i>	30A5	Não informado	Não informado	KX252655	KX252658	KX252656	<i>Quercus robur</i>	Alemania	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. quercina</i>	30A7	Não informado	Não informado	KX252662	KX252665	KX252663	<i>Quercus</i> sp.	Serbia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. siskiyouensis</i>	41B7	Não informado	Não informado	KX250678	KX250681	KX250679	Água de riacho	Óregon, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. siskiyouensis</i>	41B8	Não informado	Não informado	KX250685	KX250688	KX250686	Solo	Óregon, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. siskiyouensis</i>	P15122	HQ261674	GU222137	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Martin & Radmer, 2009
<i>P. sp.</i> 22F3	22F3	Não informado	Não informado	KX250846	KX250849	KX250847	NI	Ohio, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. sp.</i> 27D9	27D9	Não informado	Não informado	KX250839	KX250842	KX250840	Folha	China	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. sp.</i> 38J5	38J5	Não informado	Não informado	KX250930	KX250933	KX250931	Água de riacho	Virginia, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. sp.</i> 46C3	46C3	Não informado	Não informado	KX250629	KX250632	KX250630	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malasia	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. sp.</i> 56G1	56G1	Não informado	Não informado	KX250853	KX250856	KX250854	<i>Taxus</i> sp.	Pennsylvania, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017

Espécie	Isolado	Regiões genômicas					Hospedeiro/Substrato	Local de coleta	Referência
		ITS ¹	COXII ²	B-tubulina	HSP90 ³	EF1 α ⁴			
<i>P. sp. taxon emzansi</i>	61F2	Não informado	Não informado	KX250860	KX250863	KX250861	<i>Agathosma betulina</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. taxon emzansi</i>	61F3	Não informado	Não informado	KX250867	KX250870	KX250868	<i>Agathosma betulina</i>	África do Sul	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>P. terminalis</i>	65B8	Não informado	Não informado	KX250608	KX250611	KX250609	<i>Pachysandra terminalis</i>	Nova Zelândia	Yang <i>et al.</i> , 2017
Outgroup									
<i>Elongisporangium undulatum</i>	P10342	FJ802126.1	JQ439490.1	EU080441.1	EU080443.1	EU080442.1	<i>Larix sp.</i>	Reino Unido	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>Phytophthium vexans</i>	P3980	HQ261730.1	GU222165.1	EU080484.1	EU080486.1	EU080485.1	NI	NI	Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>HaloPhytophthora fluviatilis</i>	57A9	Não informado	Não informado	KX252669.1	KX252672.1	KX252670.1	Água de riacho	Virginia, USA	Yang <i>et al.</i> , 2017

¹ITS = Internal Transcribed Spacer , ²COXII= citocromo oxidase subunidade II, ³HSP90 = Heat Shock Protein 90 (HSP90), ⁴ EF1 α = fator de alongação 1 α .

3.6. Caracterização morfológica

Foram avaliadas as dimensões e formato de esporângios, clamidósporos e oósporos (quando presentes) de isolados representativos de cada espécie de *Phytophthora* identificada filogeneticamente. Isolados foram crescidos em meio CA, o micélio superficial coletado com auxílio de agulha esterilizada, e depositado em solução lactoglicerol entre lâmina e lamínula. As medições e imagens de 50 esporângios e 50 clamidósporos foram obtidas em microscópio de luz Leica DM 2500 provido de câmera digital Leica DFC 490, acoplada a um computador contendo o programa LeicaQwin – Plus (Jung *et al.*, 2003; Abad & Coffey., 2011; Ruano-Rosa *et al.*, 2018).

3.7. Testes de patogenicidade e agressividade

Patogenicidade e agressividade de quatro isolados de *Phytophthora* (três isolados de *Phytophthora* provável sp. nov. e um isolado de *P. palmivora*) foram avaliadas em frutos de cacau clones CCN51, FB206, MB01-104, PS1319 e VB1151, seguindo o delineamento intereamente casualizado. Frutos sadios com 4-5 meses de idade foram lavados em água corrente e sabão, secos em papel, e inoculados com disco de micélio obtidos a partir de culturas com quatro dias em meio LIT3, sendo cinco frutos por isolado por clone de cacau, totalizando 125 frutos, incluindo os controles negativos. Como controle negativo, foram utilizados discos de meio LIT3 sem crescimento micelial (Figura 6). A patogenicidade dos isolados remanescentes da coleção foi testada em frutos de cacau clone CCN51 utilizando a metodologia descrita anteriormente. A inoculação foi realizada na superfície dos frutos sadios sem ferimentos. Os frutos foram mantidos em câmara úmida por sete dias a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo avaliado o diâmetro das lesões diariamente.

A agressividade dos quatro isolado de *Phytophthora* spp. inoculados nos diferentes clones de cacau foi avaliada através do ajuste por modelos de regressão linear com efeitos mistos disponível no pacote LME4 (Bates *et al.*, 2015). No modelo foram considerados como efeitos fixos os fatores tempo e clones de cacau. Todas as análises foram realizadas com o fator clone aninhado ao fator tempo, eliminando-se a dependência entre os resíduos gerada pelas medidas repetidas. Para verificar a significância estatística da variação entre os isolados de *Phytophthora* spp. a cada clone de cacau, foram gerados dois modelos de regressão independentes: os modelos nulos considerando apenas a variação entre os clones (modelos 1 e 3, tabelas 7 e 8), e os modelos alternativos utilizando como fator de aleatorização os diferentes isolados (modelos 2 e 4, tabelas 7 e 8). Para determinar a performance dos modelos alternativos, ou seja, que a variação entre os isolados representa um fator realmente significativa, os modelos nulos foram comparados aos modelos alternativos utilizando-se a análise de variância. Considerando que foram realizadas inoculações independentes nas regiões superior (próximo ao pedúnculo) inferior (próximo a ponta do fruto) dos frutos, as medidas foram consideradas em análises separadas, sendo os modelos 1 e 2 representativos da região superior e 3 e 4 da região inferior. Todas as análises foram realizadas no software R (Development Core Team, 2008).



Figura 6. Testes de patogenicidade e agressividade. (A) - preparação de câmara úmida com papel toalha depositado em caixas plásticas e ADE; (B) - frutos de cacau saudáveis acondicionados em caixas plásticas; (C-E) - frutos de cacau inoculados com discos de micélio; (F) - frutos de cacau clone CCN51 apresentando sintomas de podridão-parda sete DAI; (G) - frutos de cacau clone FB206 apresentando sintomas de podridão-parda sete DAI .

3.8. Caracterização cultural

Características de crescimento *in vitro* foram obtidas para os isolados de *Phytophthora* (três isolados de *Phytophthora* sp. nov. e um isolado de *P. palmivora*) utilizados nos testes de agressividade. Discos de micélio (5 mm de diâmetro), a partir de culturas com 7 dias de idade, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo os meios BDA, V8, CA ou EMA (extrato de malte-água), e mantidos por 15 dias a 21°C em sala controlada (Ruano-Rosa *et al.*, 2018). Foram utilizadas quatro repetições por isolado por meio de cultura, seguindo o delineamento inteiramente casualizado, sendo cada placa de Petri uma unidade experimental.

O diâmetro (em duas posições perpendiculares) das colônias foi avaliado diariamente, e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula (Dias *et al.*, 2005):

$$\text{IVCM} = \frac{\Sigma(D - D_a)}{N}$$

Sendo: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual; D_a= diâmetro médio anterior; N= número de dias após repicagem.

O crescimento micelial foi avaliado através do ajuste por modelos lineares disponíveis no pacote STATS. Considerando a dependência temporal do experimento (diâmetro das colônias mensurado em tempos repetidos), os dados foram aninhados pelo fator tempo (mensurado em dias após repicagem) de modo a satisfazer a premissa de independência dos erros. A comparação múltipla entre grupos (entre isolados e meios de cultura, ambos aninhados por tempo) foi realizada através do teste de Tukey HSD. Uma avaliação alternativa do crescimento dos isolados de *Phytophthora* spp. foi realizada utilizando-se o modelo de Baranyi de crescimento bacteriano (Baranyi e Roberts, 1994). O modelo assume um perfil de crescimento composto de duas fases: a primeira equivalente a fase ‘lag’, com crescimento próximo a zero durante os tempos iniciais da análise; na segunda fase inicia-se o crescimento ‘logístico’, adquirindo um perfil sigmoide a medida que os isolados alcançam o limite máximo de crescimento, que é determinado pelo alcance das bordas da placa de Petri. A análise foi realizada no pacote ‘GROWTHRATES’. Todas as análises foram realizadas no software R.

As características culturais como coloração, produção de pigmentos e tipo de micélio aéreo foram avaliadas 15 dias após repicagem nos diferentes meios de cultura.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos isolados

Dos 243 isolados (Tabela 9) obtidos a partir dos diferentes sistemas de cultivo se obteve, : 36,62% oriundos de pleno sol (dos isolados), 28,17% de agrofloresta seringueira/cacau, 26,06% de consórcio coco/cacau e 9,15% de cabruca (Figura 7). Quando levado em consideração os clones de cacau, os materiais com maior número de isolados foram os clones CCN51 (30,99%) e Cepec 2004 (17,61%) (Figura 8). O clone CCN51 representou 27,03%, 28,85%, 32,5% e 46,51% dos isolados provenientes dos cultivos em consórcio, pleno sol, agroflorestal e cabruca, respectivamente. Já o clone Cepec 2004 representou 26,92% e 29,73% dos isolados encontrados nos sistemas de cultivos a pleno sol e consórcio, respectivamente. Dos 243 isolados, 142 foram caracterizados molecularmente, sendo repartidos entre os diferentes sistema de cultivo (Figura 9).

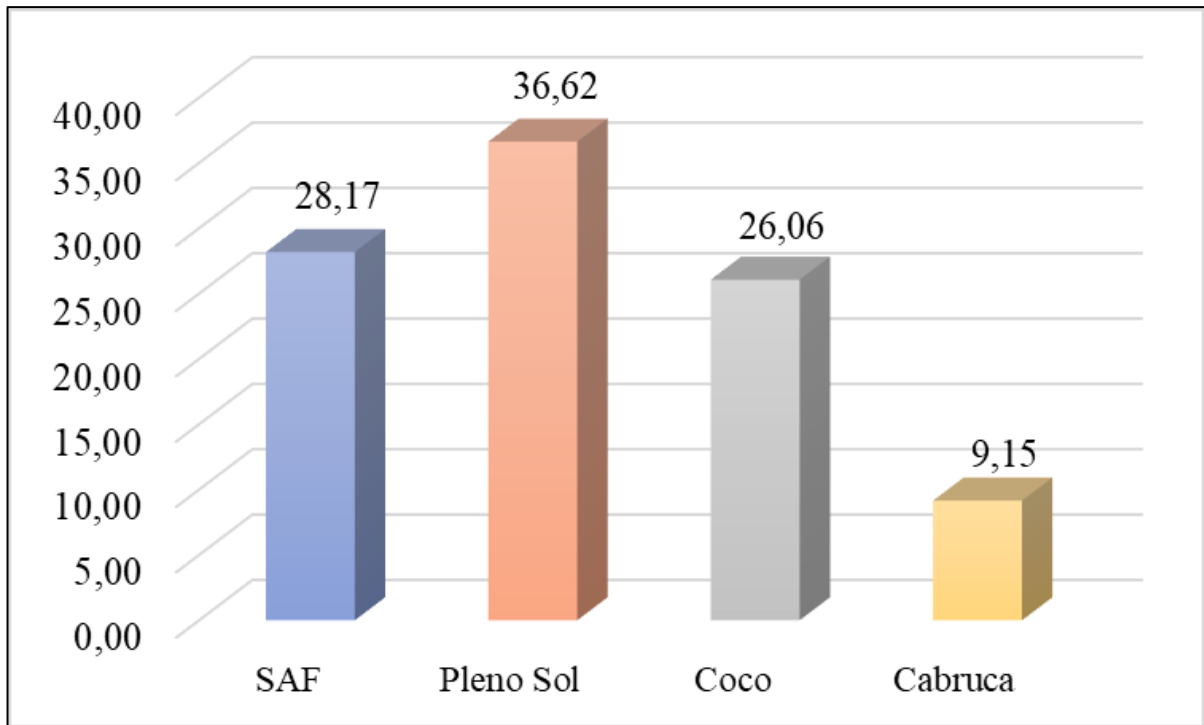


Figura 7. Percentual de isolados de *Phytophthora* spp. por sistemas de cultivo. SAF = sistema agrofloresta seringueira/cacau; Coco = consórcio coco/cacau; Pleno Sol, e Cabruca no estado da Bahia, Brasil.

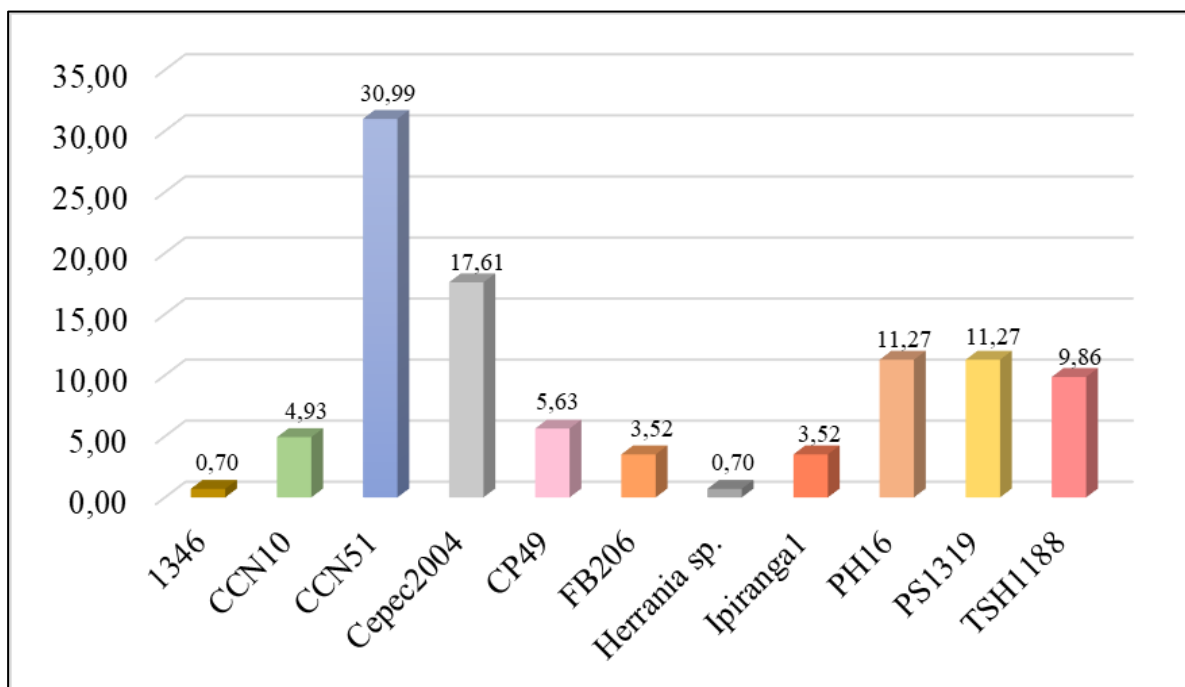


Figura 8. Percentual de isolados de *Phytophthora* spp. por clones.

4.2 Caracterização molecular de *Phytophthora* spp.

Sequências nucleotídicas parciais do gene β -tubulina foram obtidas a partir de 137 isolados (o restante da coleção será considerada em trabalhos futuros). Análise *blastn* mostrou que 97 sequências (70.8%) pertencem a espécies dentro do gênero *Phytophthora*, enquanto 40 sequências são de *Phytopythium* spp. (29.2%), repatidos nos diferentes sistemas de cultivo, sendo aproximadamente um terço proveniente do sistema pleno sol (Figura 9). Dado o fato de *Phytopythium* spp. causar doença em diversas espécies vegetais, a patogenicidade desses isolados em cacauzeiro será avaliada em trabalhos posteriores. Árvore filogenética de inferência Bayesiana das 137 sequências mostrou a formação de três clados distintos (Figura 10). Os isolados de *Phytophthora* spp. formaram dois grupos proximamente relacionados, com o clado I contendo isolados pertencentes a espécie *P. palmivora*, e o clado II com representantes de uma possível nova espécie (*Phytophthora* provável sp. nov.) (Figura 10). Os isolados de *Phytopythium* spp. formaram um clado separado (clado III) (Figura 10).

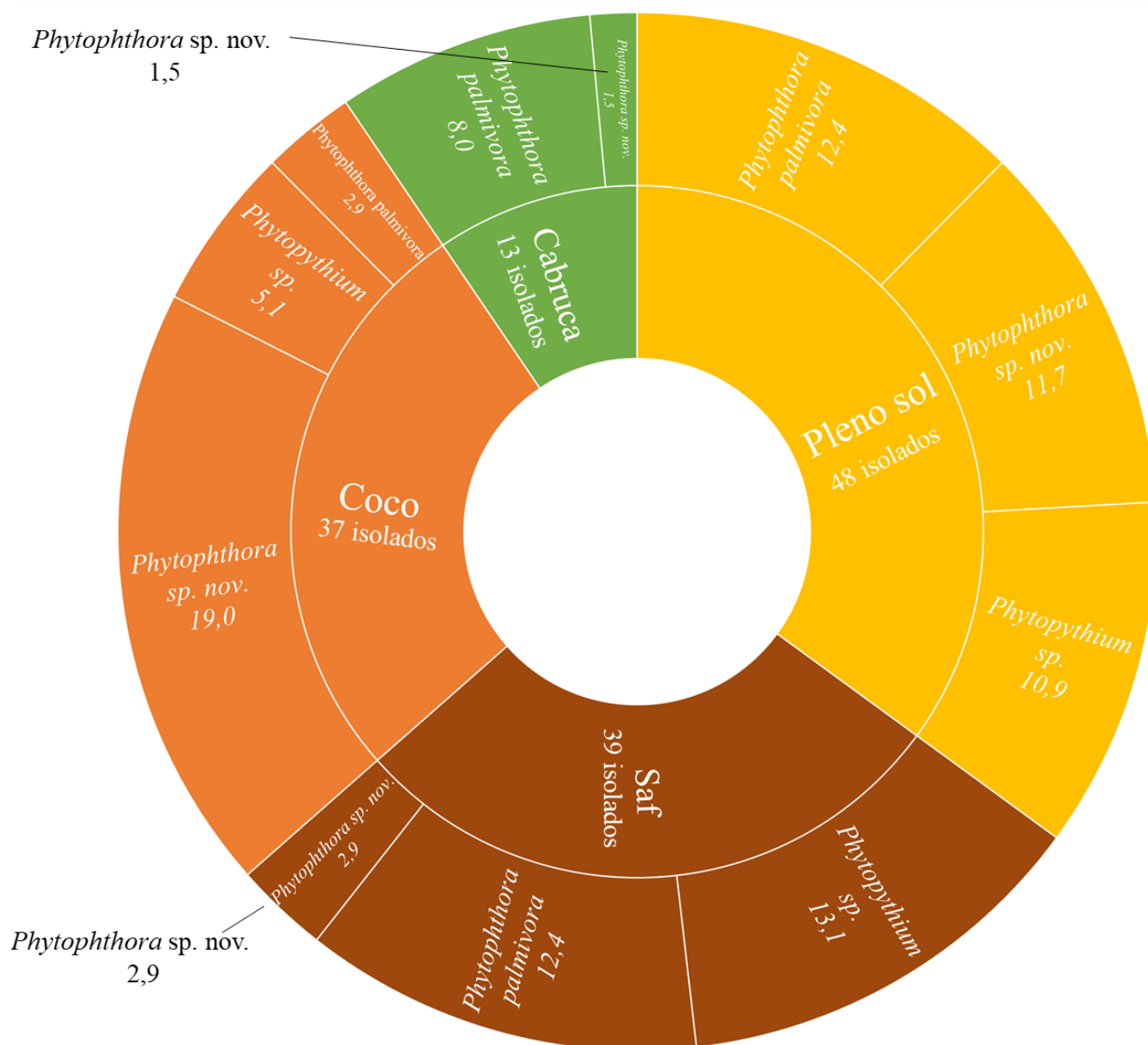


Figura 9. Porcentual dos isolados sequenciados por espécies observadas em cada sistema de cultivo

Considerando os clados I e II (β -tubulina), foram selecionados isolados representativos das duas espécies de *Phytophthora* para confirmação da identificação utilizando abordagem multigênica. Sete isolados relatados no presente trabalho (quatro isolados de *Phytophthora* provável sp. nov. e três isolados de *P. palmivora*) juntamente com 121 isolados encontrados depositados na plataforma do GenBank (tabela 2), foram utilizados para inferir a árvore filogenética Bayesiana com o conjunto de dados de sequências concatenadas das regiões β -tubulina (sítios 1-1.107), EF1 α (sítios 1.108-1.926) e HSP90 (sítios 1.927-2.825), resultando

numa matriz contendo 2.825 sítios. Na árvore de dados concatenados pode ser observado que os isolados provenientes do clado II (β -tubulina) são proximamente relacionados, porém agruparam separados de outras espécies de *Phytophthora* já conhecidas, reforçando a ideia de que podem representar uma possível nova espécie (Figura 11). Para os isolados do clado I (β -tubulina), foi confirmada a identificação como pertencentes a espécie *P. palmivora* (Figura 11).

Considerando a identificação parcial da região β -tubulina dos isolados, observou-se que no sistema pleno sol as duas espécies de *Phytophthora* foram encontradas em proporções equivalentes. Nos sistemas SAF e cabruca, observou-se uma maior ocorrência de isolados pertencentes do clado I previamente identificados como *P. palmivora*, enquanto no consórcio cacau-coco observou-se uma maior ocorrência de isolados pertencentes do clado II (Figuras 9 e 10).

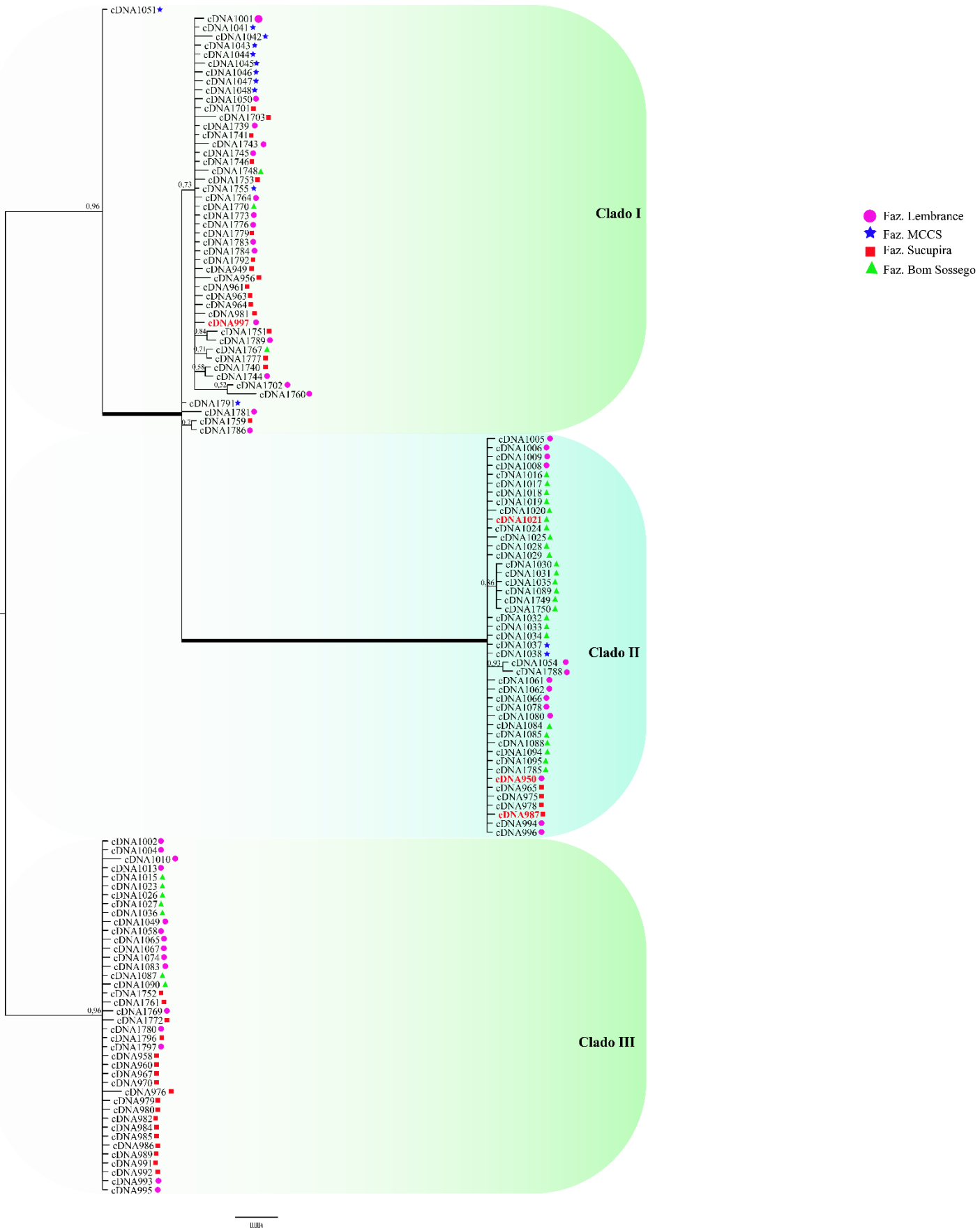


Figura 10. Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada nas sequências nucleotídicas do gene β -tub de *Phytophthora* spp. Os isolados utilizados na análise multigênica estão destacados em vermelho.

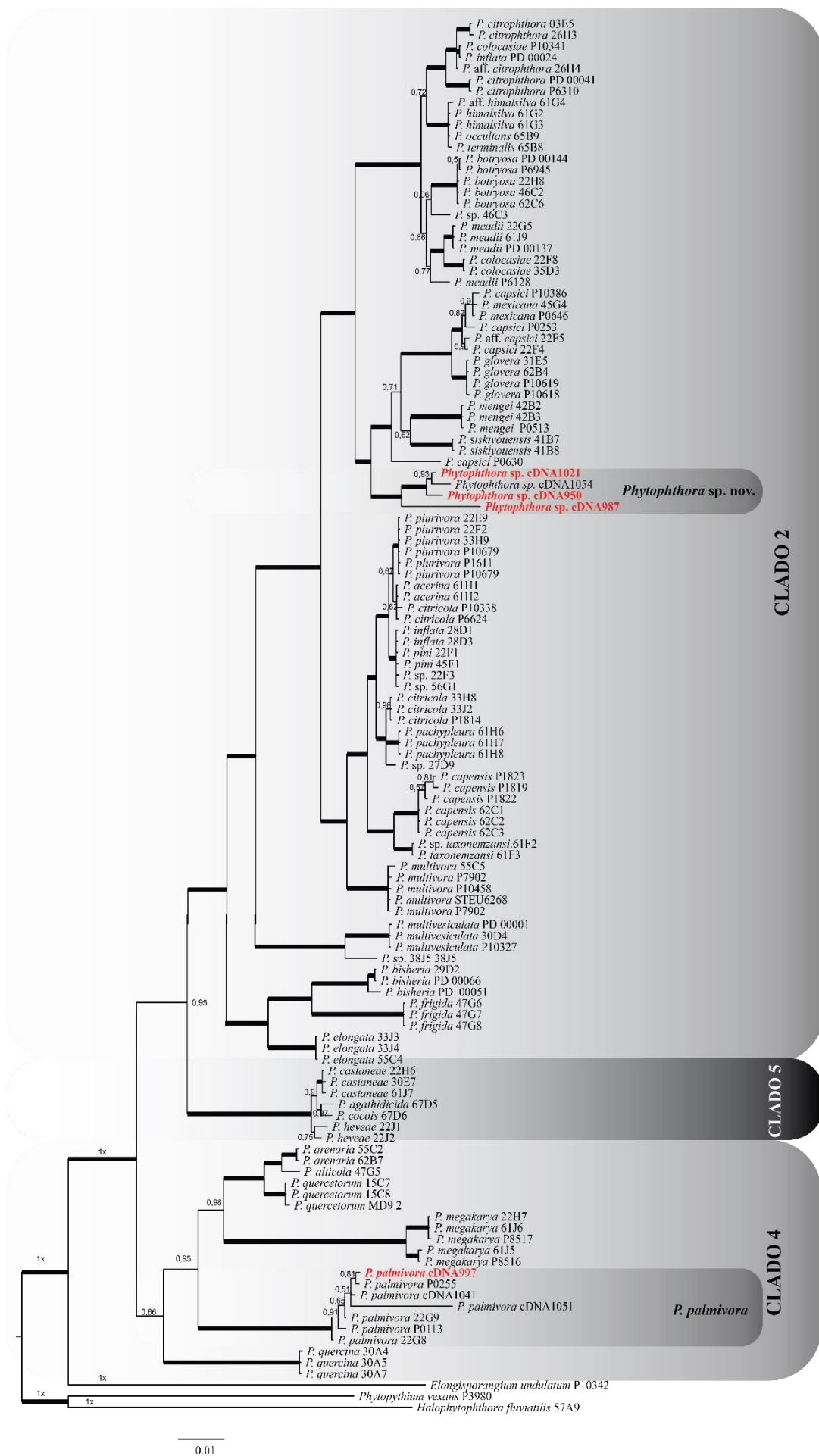


Figura 11. Árvore filogenética de inferência Bayesiana baseada nos dados concatenados dos genes β -tub-EF1 α -HSP90 de *Phytophthora* spp. Os isolados relatados no presente trabalho estão destacados em vermelhos. O ramos espessos possuem probabilidade posterior maior ou igual a 0,99 pela análise de Inferencia Bayesiana.

4.3. Caracterização morfológica de *Phytophthora* spp.

4.3.1. Características culturais

Em meio BDA, os isolados de *Phytophthora* sp. nov. apresentaram índice de velocidade de crescimento médio - IVCM de aproximadamente 5,4 mm/dia, enquanto *P. palmivora* cresceu a uma taxa de 1,27 mm/dia (Figura 12). Em meios CA, MEA e V8, os isolados de *Phytophthora* sp. nov. apresentaram IVCM de aproximadamente 13, 10 e 13 mm/dia, respectivamente. Já *P. palmivora* apresentou taxas de crescimento próximas de 11, 7 e 10 mm/dia nos meios CA, MEA e V8, respectivamente (Figura 12).

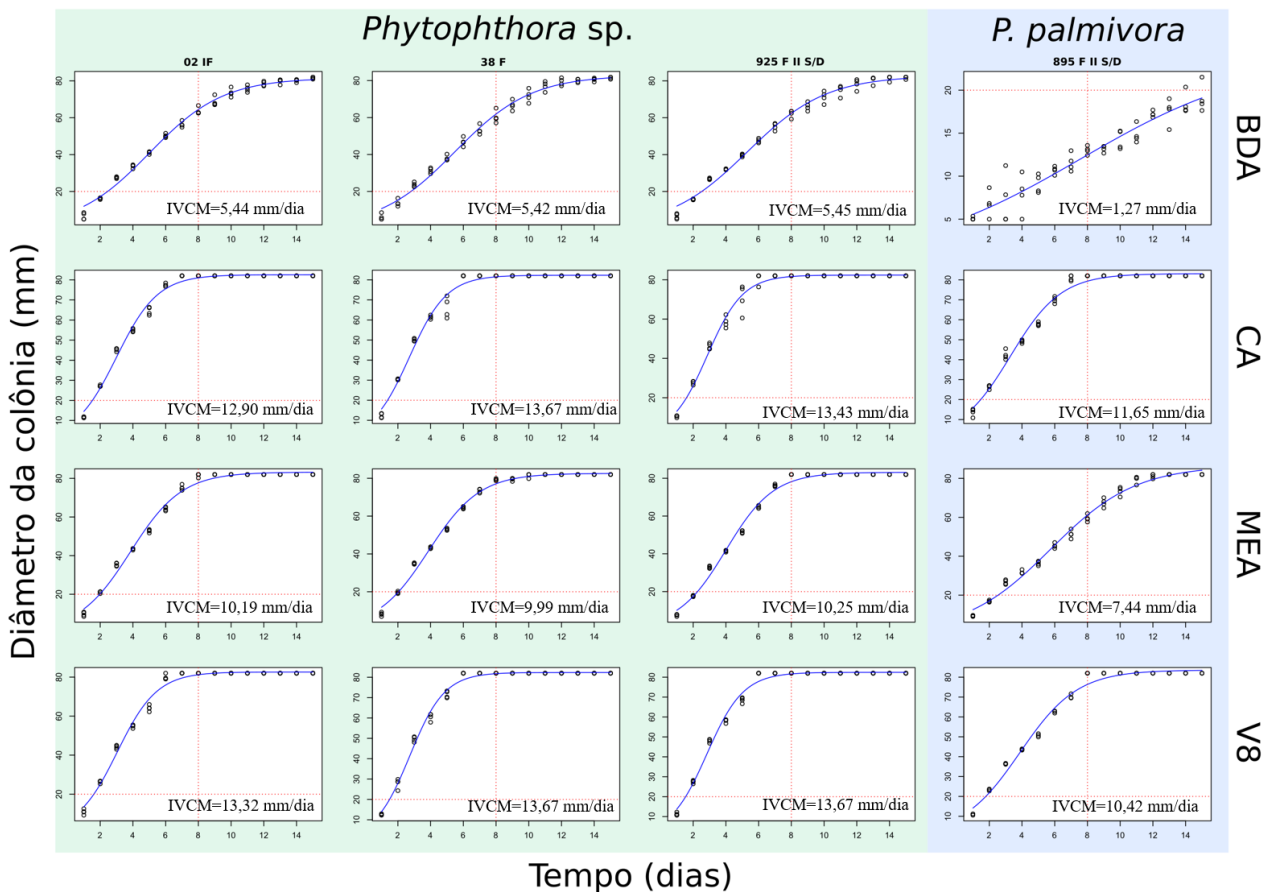


Figura 12. Curvas de crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* spp. em meios de cultivo BDA, CA, MEA e V8.

O ajuste por modelos lineares evidenciou uma variação significativa no crescimento micelial entre os diferentes isolados ($F = 60.824$, $p < 0,0001$) e meios de cultura ($F = 103.142$, $p < 0,0001$) avaliados (Tabelas 3 e 4). Todos os isolados de *Phytophthora* sp. nov. mostraram taxas de crescimento micelial similares entre si, porém significativamente maiores do que *P. palmivora* (Tabelas 3-5 e Figura 14). Pode ser observado ainda que os meios CA, MEA e V8 foram mais eficientes em promover o crescimento de *Phytophthora* spp., quando comparados ao BDA, apresentando maiores índices de crescimento (Tabela 4). Os isolados de *Phytophthora* obtidos a partir de cacau não se desenvolveram bem em BDA, enquanto que no meio CA e V8 os isolados apresentaram um comportamento semelhante, com uma maior taxa de crescimento (Figura 14 e Tabela 5). O meio CA demonstrou ser um ótimo meio de cultivo para as espécies trabalhadas, podendo ser indicado como padrão para o isolamento, repicagem e armazenamento das culturas do gênero *Phytophthora*, tendo seu custo de preparação menor em relação aos demais.

O meio MEA demonstrou-se heterogêneo entre os isolados, comparando com os demais meios onde os isolados tiveram um comportamento mais homogêneo (Figura 14).

Tabela 3. Ajuste por modelos lineares do crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* spp. em meios BDA, CA, MEA e V8.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Soma dos quadrados média	F	Significância
ANOVA					
Tempo (dias)	1	355914	355914	1653,90	<.0001
Tempo/Isolado	3	39268	13089	60,82	<.0001
Tempo/Meio de cultura	3	66588	22196	103,14	<.0001
Resíduos	937	201640	215		

Tabela 4. Análise do crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* spp. nos meios BDA, CA, MEA e V8, usando o teste Tukey.

Contraste	Graus de liberdade	Estimativa	Erro padrão	t student	Significância
TUKEY HSD – Isolado					
02 IF – 38 F	937	0,001	1,178	0,00	1,0000
02 IF – 895 F II SD	937	12,982	1,199	10,83	<.0001
02 IF – 985 F II SD	937	-0,049	1,178	-0,04	1,0000
38 F – 895 F II SD	937	12,981	1,199	10,83	<.0001
38 F – 985 F II SD	937	-0,050	1,178	-0,04	1,0000
895 F II SD – 985 F II SD	937	-13,032	1,199	-10,87	<.0001
TUKEY HSD – Meio de cultura					
BDA - CA	937	-18,136	1,178	-15,39	<.0001
BDA - MEA	937	-14,744	1,178	-12,51	<.0001
BDA - V8	937	-17,325	1,199	-14,45	<.0001
CA - MEA	937	3,392	1,178	2,88	0,0212
CA - V8	937	0,810	1,199	0,68	0,9062
MEA - V8	937	-2,582	1,199	-2,15	0,1372

Em meio BDA, os isolados de *Phytophthora* sp. nov. possuem crescimento branco, ralo e imerso, formando círculos concêntricos pronunciados de acordo com o crescimento. Em meio CA, MEA e V8, mais cotonoso e aéreo sendo mais cotonoso em CA e menos em V8, a presença de círculos concêntricos no crescimento micelial nos três meios foi menor que no meio BDA (Figura 13). O crescimento micelial em meio CA foi mais rápido que nos demais meios, sendo o crescimento mais lento em BDA (Tabela 4 e Figura 12).

Da mesma forma que *Phytophthora* sp. nov., em meio BDA, o isolado de *P. palmivora* apresentou crescimento micelial branco, ralo e imerso. Em meio CA, MEA e V8, os isolados apresentaram crescimento micelial branco, cotonoso e aéreo, sendo mais aéreo em CA e menos em V8. A presença de círculos concêntricos no crescimento micelial nos três meios foi menor que no meio BDA (Figura 13). O crescimento micelial em meio CA foi superior aos demais meios, sendo o crescimento em BDA, menor. Os isolados de *Phytophthora* sp. nov. apresentaram um crescimento micelial superior ao isolado de *P. palmivora* (Tabela 4 e Figura 12).

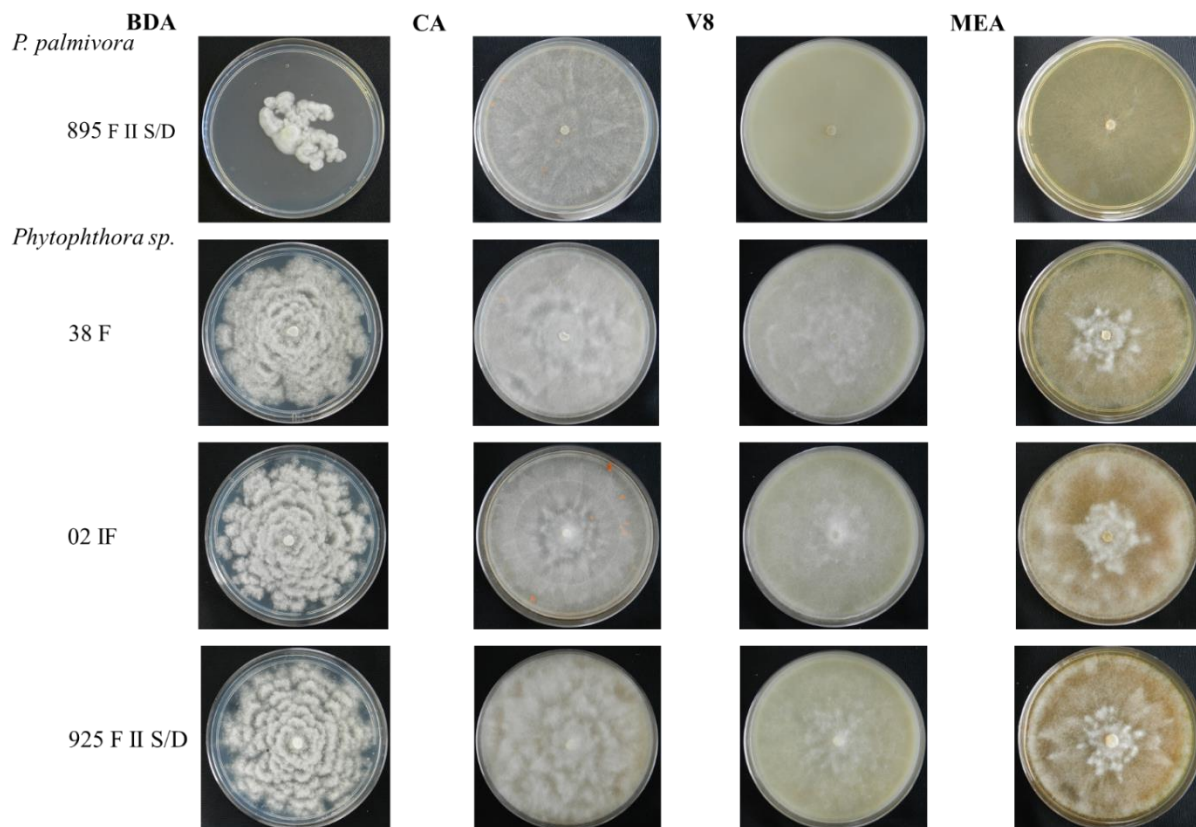


Figura 13. Características culturais dos isolados de *Phytophthora* spp. em diferentes meios de cultura.

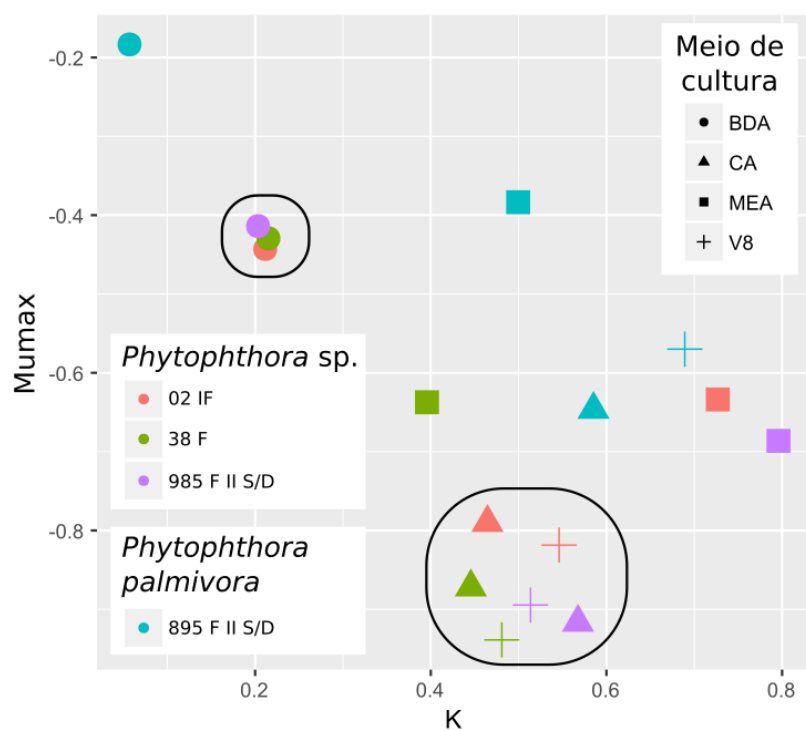


Figura 14. Comparação do crescimento micelial de *Phytophthora* sp. e *P. palmivora* em diferentes meios de cultivo, segundo a tabela 6.

Tabela 5. Taxa de crescimento dos isolados testados por meio de cultura, Mumax sendo a função representando a taxa de crescimento. Quanto menor o Mumax, maior a taxa de crescimento.

Isolado Meio de cultura	y0	Mumax	K	h0	r ²
<i>Phytophthora</i> sp.					
02 IF					
BDA	8,184	-0,443	0,212	3,759	0,991
CA	7,492	-0,790	0,465	2,870	0,992
MEA	7,347	-0,634	0,727	2,397	0,992
V8	6,835	-0,819	0,546	2,607	0,990
38 F					
BDA	7,356	-0,429	0,215	3,622	0,990
CA	7,549	-0,872	0,446	2,920	0,984
MEA	6,847	-0,637	0,396	2,933	0,994
V8	6,348	-0,939	0,481	2,655	0,993
985 F II S/D					
BDA	8,459	-0,414	0,203	3,833	0,990
CA	6,091	-0,917	0,568	2,443	0,988
MEA	5,764	-0,686	0,796	2,042	0,992
V8	6,497	-0,895	0,514	2,614	0,991

y0 = valor inicial de abundância,

Mumax = taxa máxima de crescimento (1 / hora),

K = capacidade de carga (máx. abundância),

h0 = parâmetro especificando o estado fisiológico inicial de organismos (por exemplo, células) e, consequentemente, a fase lag (h0 = taxa de crescimento máxima * fase lag).

4.3.2. Características morfológicas

O espécime de *Phytophthora* sp. nov. 925FIISD (Figura 15, A e B) possui esporângios ovóides a piriformes, papilados, persistentes. Esporângios hialinos, 27 –76 × 21.5 – 45.5 µm, papila proeminente, 5 × 10.5 µm, relação entre comprimento e largura igual a 1.47, ovóide a piriforme. Clamidósporos hialinos, globosos, 24.5 – 35 µm de diâmetro. Para *Phytophthora* sp. nov. não foi observado a produção de oosporos (Tabela 6). Em meio de cultura CA foi observado grande produção de clamidósporos imerso no meio.

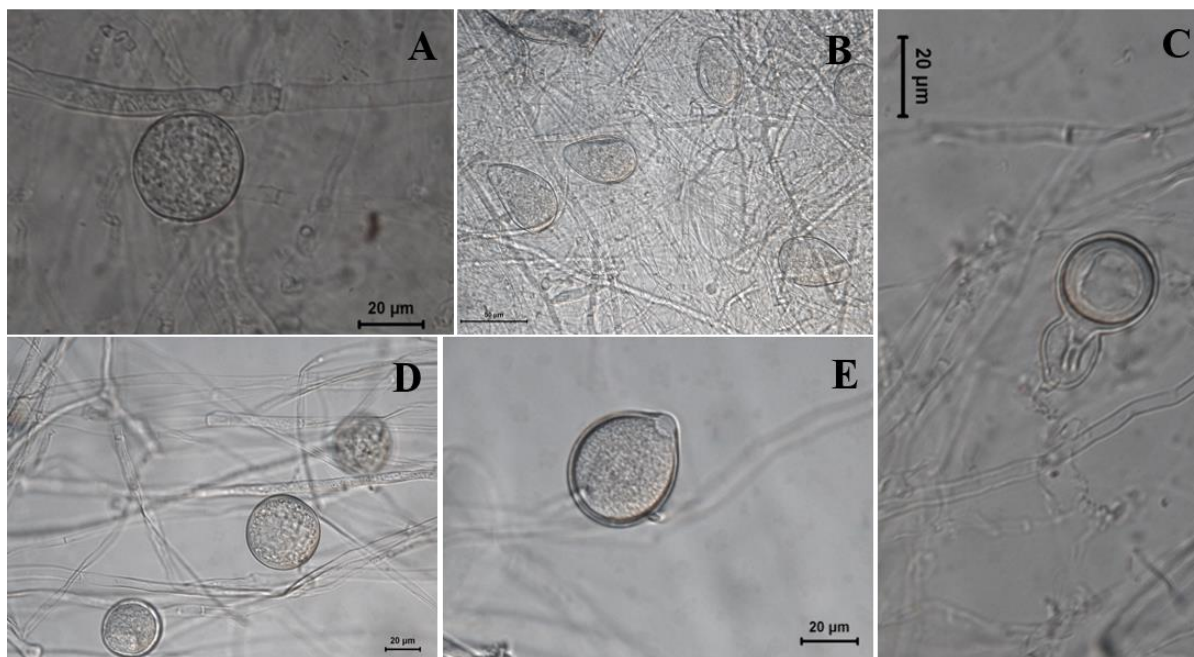


Figura 15. Morfologia de *Phytophthora* spp. obtidos em meio de cultura CA. Clamidósporo (A) e esporângios (B) do isolado 925 F IIS D (*Phytophthora* provável sp. nov.) obtidos a partir de culturas em meio CA. Oósporo (C), clamidósporo (D) e esporângio (E) do isolado 895 F IIS D (*P. palmivora*) obtidos a partir de culturas em meio CA. Oósporo foi produzido a partir do pareamento de *P. palmivora* com isolado de *P. capsici* mating type A2.

Para *P. palmivora* 895FIIS/D (Figura 15, C-E) possui esporângios ovóides a piriformes, papilados. Esporângios hialinos, $34.5\text{--}56.5 \times 24.5\text{--}47.5 \mu\text{m}$, relação entre comprimento e largura do esporângio igual a 1.33, de forma ovóide a piriforme, terminando em uma papila proeminente, $6 \times 9 \mu\text{m}$. Clamidósporos hialinos, globosos, solitários, $30\text{--}47.5 \mu\text{m}$ de diâmetro. Foi observado oosporos quando isolado foi pareado com isolado A2 de *P. capsici*, caracterizando assim o isolado *P. palmivora* 895FIIS/D como heterotático com mating type A1. *P. palmivora* formou grande quantidade de clamidósporos imersos em meio CA.

Tabela 6. Medidas (μm) das estruturas reprodutivas e de sobrevivência de *Phytophthora* spp.

Isolado	Código*	Esporângio (μm)	Papila (μm)	Clamidósporo (μm)	
<i>Phytophthora</i> sp. nov.	cDNA1021	Média	52 –35.5	5–10.5	30
		Mínimo	27– 22	3–7	19.5
		Máximo	75.5 –45.5	8–14.5	45.5
<i>P. palmivora</i>	cDNA997	Média	46.5–36.5	6–9	36.5
		Mínimo	34.5–25	3.5–5.5	30
		Máximo	56–48	9.5–14	47.5

*O Código se refere ao código utilizado para montar as árvores filogenéticas.

4.4. Testes de patogenicidade e agressividade

4.4.1. Patogenicidade dos isolados da coleção de *Phytophthora* spp.

Apenas 52,7% dos isolados (118 isolados) foram patogênicos em frutos de cacau clone CCN51, causando sintomas típicos de podridão-parda até 7 dias após inoculação. Entre os 118 isolados patogênicos, 80,5% (95 isolados) foram obtidos a partir de frutos, 14,4% (17 isolados) de solo e 5,1% (seis isolados) de serapilheira. Os frutos utilizados como controle negativo não apresentaram sintomas da doença.

4.4.2. Patogenicidade e agressividade em diferentes clones de cacau

Os isolados apresentaram variação de comportamento no teste de patogenicidade e agressividade em frutos de cacau dos clones CCN51, FB206, MB01-104, PS1319 e VB1151. As variações foram observadas tanto entre um mesmo isolado (repetições), quanto entre um isolado e os demais (Figuras 16 e 17). Da mesma forma que durante o crescimento *in vitro*, os isolados de espécie nova e o isolado de *P. palmivora* apresentaram comportamentos diferentes entre si *in vivo*. Os isolados de provável espécie nova foram mais agressivos que *P. palmivora* independentemente do clone inoculado (Tabela 7 ver modelo 2 – Coeficientes, Tabela 8 ver modelo 4 – Coeficientes). O clone FB206, conhecido por ser o mais suscetível dos cinco clones testados, se revelou ser o clone mais suscetível em presença de *P. palmivora*. No entanto, não houve diferença significativa entre os demais clones testados em presença dos isolados da

provável espécie nova. O clone CCN51, inoculado com *P. palmivora*, apresentou uma suscetibilidade ligeiramente inferior à do clone FB206. Entretanto, os isolados da provável espécie nova apresentaram uma agressividade semelhante nos dois clones. Os clones MB01-104, PS1319 e VB1151 apresentaram um padrão de agressividade parecido para cada isolado testado, sendo o isolado *P. palmivora* sempre o menos agressivo (Tabela 7 ver modelo 2 – Efeitos fixos, Tabela 8 ver modelo 4 – Efeitos fixos). Observou-se uma variação entre os isolados de espécie nova, sendo que um deles se mostrou mais agressivo que os demais em todas as circunstâncias.. Os isolados apresentaram diferenças de agressividade entre o local de inoculação e uma variação entre as repetições, sendo observada uma heterogeneidade entre as 5 repetições (Figuras 16 e 17). Foram observados resultados homogêneos na inoculação na parte superior do fruto, enquanto na parte inferior, o isolado 02 IF apresentou uma agressividade geral maior e os outros foram ligeiramente inferiores. O isolado 925 F II S/D apresentou uma agressividade menor em FB206. O isolado de *P. palmivora* se expressou de maneira homogênea independentemente do local de inoculação (Figuras 16 e 17).

Tabela 7. Resultados dos modelos de regressão mista aplicados por modelo linear mistos representativos da agressividade dos isolados de *Phytophthora* spp. inoculados na parte superior do fruto em diferentes clones de cacau.

Porção superior								
MODELO 1 (nulo)								
Efeitos fixos	Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	GL	t	Pr(> t)	Cod. Sig*.	
	Intercept	1,4275	7,7335	5,3378	0,185	0,86		
	Dia : Clone CCN51	9,1045	0,6009	590,0004	15,152	<2e-16	***	
	Dia : Clone FB 206	13,4117	0,6009	590,0004	22,32	<2e-16	***	
	Dia : Clone MB 11 106	7,8827	0,6384	590,0003	12,348	<2e-16	***	
	Dia : Clone PS 1319	7,4955	0,6009	590,0004	12,474	<2e-16	***	
	Dia : Clone VB 1151	5,8089	0,6221	590,0221	9,338	<2e-16	***	
Coefficientes	Isolado	Intercept	CCN51	FB 206	MB 11 106	PS 1319	VB 1151	
	02 IF	22,247712	9,104536	13,41173	7,882714	7,495489	5,80885	
	38 F	8,98052	9,104536	13,41173	7,882714	7,495489	5,80885	
	895 F IISD	-8,353183	9,104536	13,41173	7,882714	7,495489	5,80885	
	925 F IISD	10,387423	9,104536	13,41173	7,882714	7,495489	5,80885	
	controle	-26,124971	9,104536	13,41173	7,882714	7,495489	5,80885	
Significância do efeito geral	Fonte de variação	SQ	MSQ	GL	Den DF	F	Pr (>F)	
	Dia : Clone	137326	27465	5	590,01	107,47	<2.2e-16	
MODELO 2 (alternativo)								
Efeitos fixos	Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	GL	t	Pr(> t)	Cod. Sig*.	
	Intercept	1,201	1,951	5,869	0,616	0,56124		
	Dia : Clone CCN51	9,166	2,725	5,004	3,364	0,02	*	
	Dia : Clone FB 206	13,473	3,086	5,001	4,366	0,00725	**	
	Dia : Clone MB 11 106	7,944	2,154	5,012	3,688	0,01412	*	
	Dia : Clone PS 1319	7,557	1,817	5,024	4,158	0,00875	**	
	Dia : Clone VB 1151	6,137	2,058	4,919	2,982	0,03137	*	
Coefficientes	Isolado	Intercept	CCN51	FB 206	MB 11 106	PS 1319	VB 1151	
	02 IF	5,7797126	16,05538735	19,2115822	13,8874019	10,7122986	12,3756556	
	38 F	1,9209195	10,60791076	17,5674652	10,5753033	10,6640058	5,8352903	
	895 F IISD	-3,8614791	4,75803446	14,0022293	6,6086683	8,3034868	2,8607876	
	925 F IISD	2,6182085	14,32070747	16,1986152	8,6663877	7,9821961	9,4850763	
	controle	-0,4517582	0,08934084	0,3874526	-0,0154939	0,1241572	0,1289317	
Significância do efeito geral	Fonte de variação	SQ	MSQ	GL	Den DF	F	Pr (>F)	
	Dia : Clone	3312	662,41	5	6,0252	3,9994	0,06039	
Modelos								
Modelo 1: Diametro ~ Dia : Clone + (1 Isolado)								
Modelo 2: Diametro ~ Dia : Clone + (Dia : Clone Isolado)								
	DF	AIC	BIC	logLik	deviance	Chisq	ChiDf	Pr(>Chisq)
Modelo 1	8	5027,4	5062,5	-2505,7	5011,4			
Modelo 2	28	4836,7	4959,6	-2390,3	4780,7	230,71	20	<2.2E-016

Tabela 8. Resultados dos modelos de regressão mista aplicados por modelo linear mistos representativos da agressividade dos isolados de *Phytophthora* spp. inoculados na parte inferior do fruto em diferentes clones de cacau.

Porção inferior								
MODELO 3 (nulo)								
Efeitos fixos	Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	GL	t	Pr(> t)	Cod. Sig*.	
	Intercept	0.1911	6.9038	5.5454	0.028	0.979		
	Dia : Clone CCN51	8.8027	0.6711	589.0013	13.116	<2e-16	***	
	Dia : Clone FB 206	11.6277	0.6760	589.0046	17.200	<2e-16	***	
	Dia : Clone MB 11 106	9.3423	0.7130	589.0011	13.103	<2e-16	***	
	Dia : Clone PS 1319	5.9530	0.6711	589.0013	8.870	<2e-16	***	
	Dia : Clone VB 1151	6.2737	0.6973	589.0266	8.997	<2e-16	***	
Coefficientes	Isolado	Intercept	CCN51	FB 206	MB 11 106	PS 1319	VB 1151	
	02 IF	17.705376	8.802697	11.62769	9.342317	5.95302	6.273742	
	38 F	9.888509	8.802697	11.62769	9.342317	5.95302	6.273742	
	895 F IISD	-7.156351	8.802697	11.62769	9.342317	5.95302	6.273742	
	925 F IISD	5.303312	8.802697	11.62769	9.342317	5.95302	6.273742	
	controle	-24.785487	8.802697	11.62769	9.342317	5.95302	6.273742	
Significância do efeito geral	Fonte de variação	SQ	MSQ	GL	Den DF	F	Pr (>F)	
	Dia : Clone	112524	22505	5	589.01	70.681	<2.2e-16	
MODELO 4 (alternativo)								
Efeitos fixos	Fonte de variação	Estimativa	Erro padrão	GL	t	Pr(> t)	Cod. Sig*.	
	Intercept	-0.1144	1.8226	6.9689	-0.063	0.9517		
	Dia : Clone CCN51	8.8860	2.2703	5.0070	3.914	0.0112	*	
	Dia : Clone FB 206	11.7689	3.3002	5.0028	3.566	0.0161	*	
	Dia : Clone MB 11 106	9.4256	2.7189	5.0073	3.467	0.0179	*	
	Dia : Clone PS 1319	6.0363	1.7120	5.0376	3.526	0.0166	*	
	Dia : Clone VB 1151	6.6325	2.1780	4.9757	3.045	0.0288	*	
Coefficientes	Isolado	Intercept	CCN51	FB 206	MB 11 106	PS 1319	VB 1151	
	02 IF	1.1029302	13.9024335	18.1297522	15.60260175	10.693318512	12.3796994	
	38 F	2.5435381	9.8968750	16.6844299	15.35195849	6.729165681	6.4821758	
	895 F IISD	-5.0879254	6.8582500	17.5129453	5.87028199	4.572246162	3.2594743	
	925 F IISD	1.2551938	13.2342336	6.3109283	10.27214768	8.192324581	11.0902810	
	controle	-0.3859075	0.5382908	0.2062034	0.03119303	-0.005353804	-0.049160	
Significância do efeito geral	Fonte de variação	SQ	MSQ	GL	Den DF	F	Pr (>F)	
	Dia : Clone	3811.2	762.24	5	5.7415	3.9807	0.06502	
Modelos								
Modelo 3: Diametro ~ Dia : Clone + (1 Isolado)								
Modelo 4: Diametro ~ Dia : Clone + (Dia : Clone Isolado)								
	DF	AIC	BIC	logLik	deviance	Chisq	ChiDf	Pr(>Chisq)
Modelo 3	8	5147.3	5182.4	-2565.6	5131.3			
Modelo 4	28	4920.2	5043.1	-2432.1	4864.2	267.04	20	<2.2e-16
*Códigos de significância:	***	**	*	.				
	0.001	0.01	0.05	0.1	1			

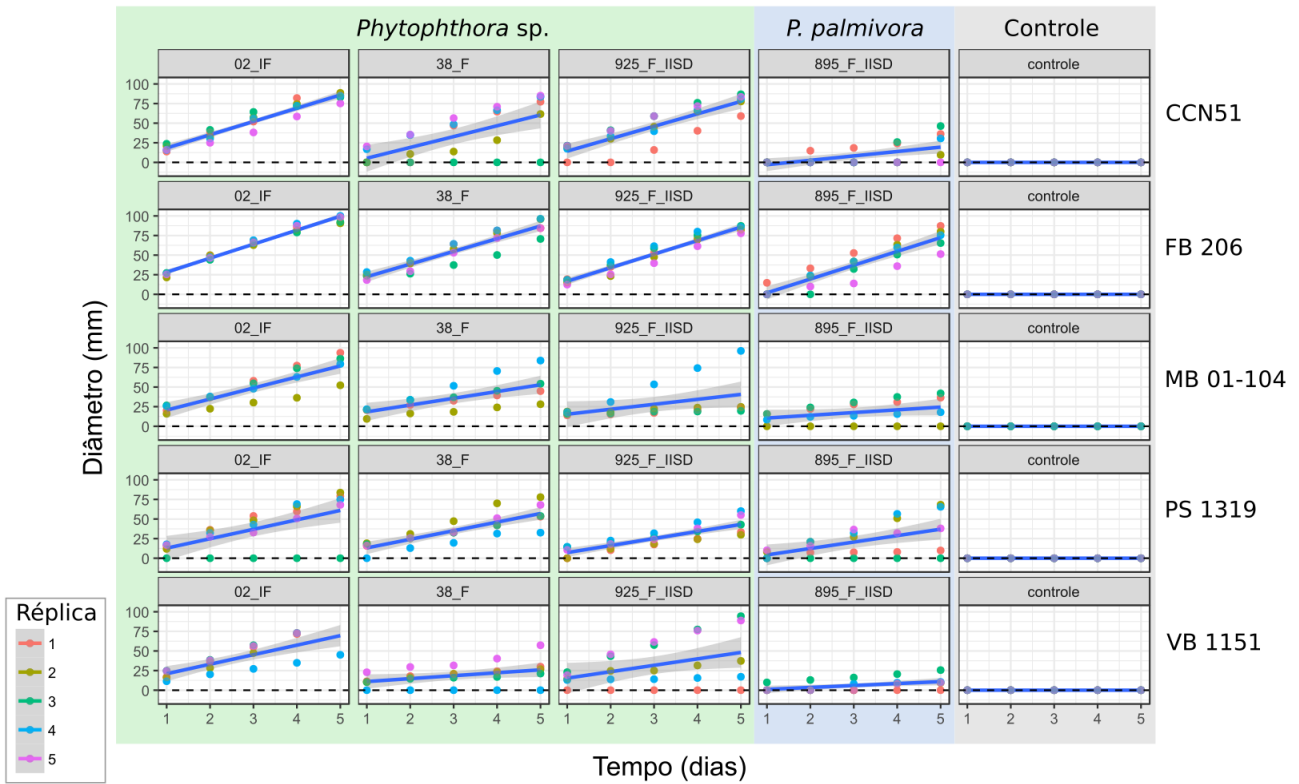


Figura 16. Agressividade dos isolados de *Phytophthora* spp. em diferentes clones de cacau. As inoculações foram realizadas próximo ao pedúnculo dos frutos.

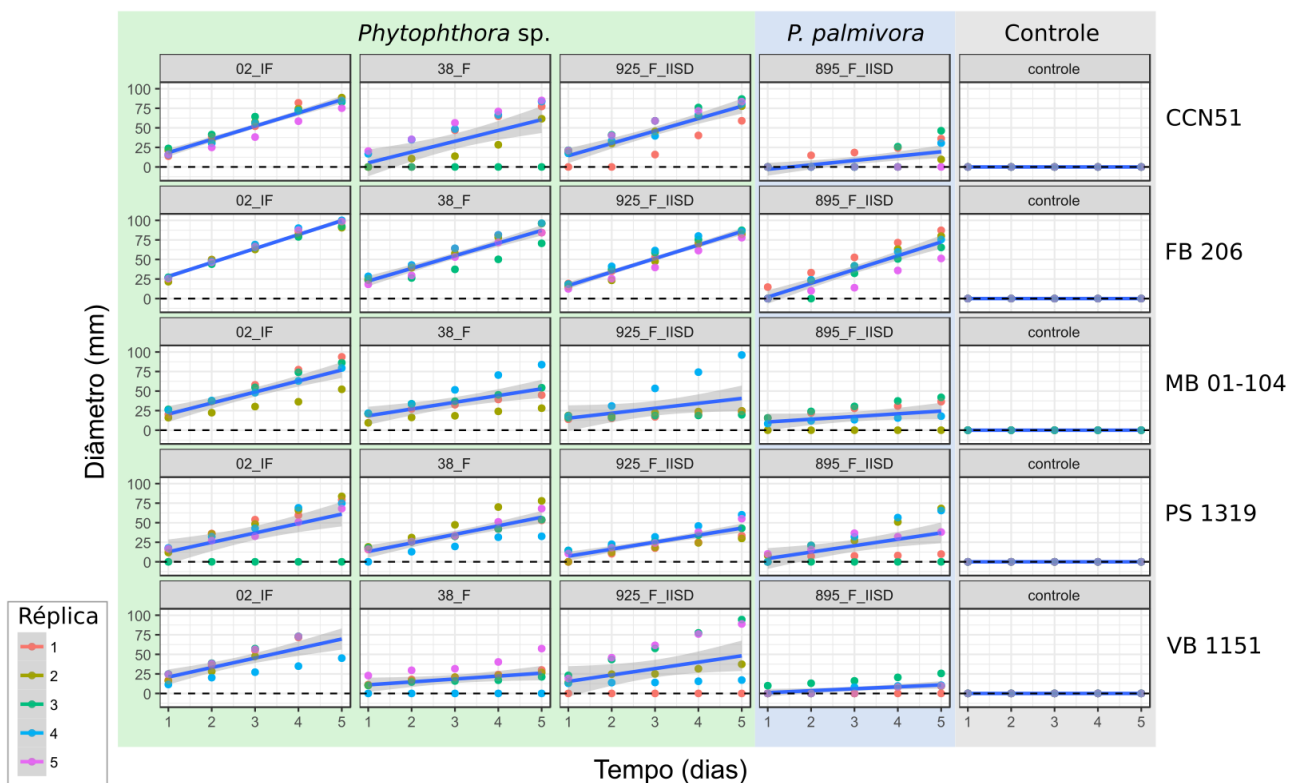


Figura 17. Agressividade dos isolados de *Phytophthora* spp. em diferentes clones de cacau. As inoculações foram realizadas próximo à ponta dos frutos.

Tabela 9. Isolados utilizados durante o estudo.

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	01F II S/D	1784	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	Cepec 2004	Solo/Entrelinha	893-S LINHA IC	994/1942	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	Cepec 2004	Solo/Entrelinha	893-S LINHA IM	995	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	Cepec 2004	Solo/Entrelinha	893-S ICF	-	-	SIM	-
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	893-S IM	993	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	894-S ICF	996/1940	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	894F II S/D	1800	-	SIM	-
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	895F II S/D	997	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN 51	Fruto	900F II C/D	1783	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN 51	Fruto	900F II S/D	1789	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN 51	Fruto	901F II S/D	1764	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN 51	Fruto	902F II C/D	1001	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN 51	Solo	902-S IM	1002	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	CCN 51	Solo	904-S IM	1004	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	CCN 51	Serapilheira	904 FL/S IM	1003	-	NÃO	-
Pleno sol	CCN 51	Solo	905-S IC	1399	-	NÃO	-
Pleno sol	CCN 51	Solo	905-S ICF	1005/1945	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	CCN 51	Fruto	906F II S/D	1400	-	SIM	-
Pleno sol	CP 49	Fruto	907F II C/D	1408	-	SIM	-
Pleno sol	CP 49	Fruto	907F II C/D A	1007	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	CP 49	Fruto	907F II S/D	1915	-	SIM	-
Pleno sol	CP 49	Solo	907-S IM	1409	-	NÃO	-
Pleno sol	CP 49	Solo	907-S ICF	1392	-	SIM	-
Pleno sol	CP 49	Fruto	908F II S/D	-	-	SIM	-
Pleno sol	CP 49	Fruto	909F II S/D	1697	-	NÃO	-
Pleno sol	CP 49	Fruto	910F II S/D	1008	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	Ipiranga 1	Fruto	912F II S/D	1009	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Pleno sol	TSH 1188	Solo	913-S IM	1402	-	NÃO	-
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	915F II C/D	1744	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	915 F	1760	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	915F II S/D	1955	-	SIM	-
Pleno sol	TSH 1188	Solo	915-S IM	1010	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	916F II S/D	1011	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	916-S ICF	1012/1947	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	918F II C/D	1016	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	918F II S/D	1017	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Solo	917-S IC	1015	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Cacau-coco	CCN 51	Solo	917-S IM	1758	-	NÃO	-
Cacau-coco	CCN 51	Serapilheira	917 F/S IM	1014	-	NÃO	-
Cacau-coco	CCN 51	Fruto	919F II C/D	1018	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Fruto	919F II S/D	1019	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	925F II S/D	1021	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	925-S IM	1023	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	925-S ICF	-	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Serapilheira	925 FL/S IM	1022	-	NÃO	-
Cacau-coco	PS1319	Fruto	926F II C/D	1024	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Fruto	926F II S/D	-	-	SIM	-
Cacau-coco	PS1319	Solo	926-S IM	1026	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Cacau-coco	PS1319	Solo	926-S ICF	1025/1944	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Solo/Entrelinha	926-S Linha IM	1027	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Cacau-coco	TSH 1188	Fruto	927F II C/D	1028/1790	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	TSH 1188	Fruto	927F II S/D	1029	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Fruto	928F II C/D	1030	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Fruto	928F II S/D	1031	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β-tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Cacau-coco	CCN51	Fruto	929F II C/D	1032	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN51	Fruto	929F II S/D	1033	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Fruto	930F II S/D	1034	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CP 49	Solo	931-S IM	1036	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Cacau-coco	CP 49	Solo	931-S IME	1395	-	NÃO	-
Cacau-coco	CP 49	Solo	931-S ICF	-	-	SIM	-
Cacau-coco	CP 49	Fruto	931F II S/D	1035/1757	x	NÃO	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	PS1319	Solo	933-S IM	1396	-	NÃO	-
Cabruca	CCN51	Fruto	937F1-R1	1037	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cabruca	CCN51	Fruto	937F2-R2	1038	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cabruca	CCN51	Fruto	937F1-R3	1791	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	CCN51	Solo	937S IM	1407	-	SIM	-
Cabruca	CCN51	Serapilheira	937 FS IM	1039	-	NÃO	-
Cabruca	VB1151	Solo	938S IM	1040	-	NÃO	-
Cabruca	FB206	Fruto	939F1	1041	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	FB206	Fruto	939F2	1042	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	FB206	Fruto	939F3	1043	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	FB206	Fruto	940-F1	1044	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	FB206	Fruto	940-F2	1045	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	CCN51	Fruto	942F1	1046	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	CCN51	Fruto	942F2	1047	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	CCN51	Fruto	942F3	1048	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cabruca	CCN51	Solo	942S IM	1413/1415	-	NÃO	-
Cabruca	Herrania sp.	Fruto	945F HERRANIA SP	1051	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN51	Solo	943A-S IM	-	-	NÃO	-
Pleno sol	CCN51	Fruto	944A IF	1739	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN51	Fruto	945A IF	1050	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Pleno sol	CCN51	Serapilheira	945A FS IM	1052	-	NÃO	-
Pleno sol	CCN51	Solo	946A-S IM	1397	-	SIM	-
Pleno sol	CCN51	Fruto	02 IF	950	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	CCN51	Fruto	947 IF	1705/1855	-	SIM	-
Pleno sol	CCN51	Solo	947S IM	1409/1417	-	NÃO	-
Pleno sol	CCN51	Solo	948S IM	1055	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Serapilheira	950 FS IM	1908	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Solo	950S IM	1058	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	CP49	Serapilheira	952 FS IM	1060/1953	-	SIM	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Fruto	953 IF	1061	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	Ipiranga 1	Solo	953S IM	1062/1943	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	Ipiranga 1	Fruto	954 IF	1414	-	SIM	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Serapilheira	954 FS IM	1063	-	NÃO	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Solo	954S IM	1064	-	NÃO	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Fruto	955 IF	1066/1763	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	PS 1319	Fruto	956 IF	1394/1695	-	SIM	-
Pleno sol	PS 1319	Fruto	957 IF	1916	-	SIM	-
Pleno sol	PS 1319	Solo	958S IM	1067	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
Pleno sol	CP49	Fruto	959 F	1411	-	SIM	-
Pleno sol	CP49	Solo	960 S IM	1069	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Serapilheira	960 FS IM	1068	-	NÃO	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Serapilheira	961-FS IM	1070	-	NÃO	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Fruto	962 F	1406	-	NÃO	-
Pleno sol	Ipiranga 1	Solo	962 S IM	1071	-	NÃO	-
Pleno sol	Cepec 2004	Serapilheira	963 FS IM	1072	-	NÃO	-
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	964 F	1781	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	965 F	1743	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	965 S IM	1074	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
Pleno sol	Cepec 2004	Serapilheira	965 FS IM	1073	-	NÃO	-
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	966 F	1702	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	967 F	1949	-	SIM	-
Pleno sol	Cepec 2004	Serapilheira	967 FS IM (B)	1075	-	NÃO	-
Pleno sol	Cepec 2004	Fruto	968 F	1913	-	SIM	-
Pleno sol	TSH 1188	Serapilheira	969 FS IM	1077	-	NÃO	-
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	970 F	1078	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	TSH 1188	Serapilheira	970 FS IM	1079	-	NÃO	-
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	971 F	1080	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	TSH 1188	Serapilheira	971 FS IM (B)	1081	-	NÃO	-
Pleno sol	TSH 1188	Fruto	972 F	1788	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Pleno sol	TSH 1188	Solo	972 S IM	1083	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
Pleno sol	TSH 1188	Serapilheira	972 FS IM (A)	1082	-	NÃO	-
Pleno sol	TSH 1188	Serapilheira	972 FS IM (B)	1398	-	SIM	-
Cacau-coco	TSH 1188	Fruto	976 F	1084	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Fruto	977 F	1085	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Solo	977 S IM	1087	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
Cacau-coco	CCN 51	Serapilheira	977 FS IM (A)	1747	-	NÃO	-
Cacau-coco	CCN 51	Serapilheira	977 FS IM (B)	1086	-	SIM	-
Cacau-coco	CCN 51	Fruto	978 F	1088	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Solo	978 S IM (A)	1089/1939	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN 51	Solo	978 S IM (B)	1090	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
Cacau-coco	CCN 51	Fruto	979 F	-	-	SIM	-
Cacau-coco	CCN 51	Solo	979 S IM	1092	-	NÃO	-
Cacau-coco	CCN 51	Serapilheira	979 FS IM	1091	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	980 S IM	1906	-	NÃO	-

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	981 F	1094	x	NÃO	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	982 F	1095/1696	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	982 S IM	1097	-	SIM	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Serapilheira	982 FS IM	1096	-	NÃO	-
Cacau-coco	PS1319	Fruto	983 F	1098	x	NÃO	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Serapilheira	983 FS IM	1099	-	NÃO	-
Cacau-coco	PS1319	Solo	984 S IM	1101	-	NÃO	-
Cacau-coco	PS1319	Serapilheira	984 FS IM	1100	-	NÃO	-
Cacau-coco	TSH 1188	Fruto	985 F	1767	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cacau-coco	TSH 1188	Solo	985 S IM (A)	1103	-	NÃO	-
Cacau-coco	TSH 1188	Solo	985 S IM (B)	1104/1952	-	SIM	-
Cacau-coco	TSH 1188	Serapilheira	985 FS IM	1102	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Fruto	01A F	949	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Fruto	02A F	1914	-	SIM	-
SAF	CCN51	Solo	02A S IM	1416	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Serapilheira	02A FS IM	1904	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Solo	03 S IM	953	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Fruto	04 F	1787	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Solo	04 S IM	1403/1412	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Serapilheira	04 FS IM	954	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Serapilheira	05 FS IM	955	-	SIM	-
SAF	PH16	Fruto	6 F	956	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	PH16	Solo	06 S IM	958	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Serapilheira	06 FS IM	957	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Solo	07 S IM	1909	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Solo	09 S IM	960	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	CCN51	Fruto	10 F	961	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
SAF	PH16	Fruto	11 F	963	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Solo	12 S IM	-	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Fruto	13 F	965	x	NÃO	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
SAF	PS1319	Solo	13 S IM	1393/1404	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Solo	14 S IM	967	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Solo	16 S IM (B)	1951	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Solo	18 S IM	1405	-	NÃO	-
SAF	CCN10	Solo	19 S IM	970	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	CEPEC 2002	Solo	21 S IM	973	-	NÃO	-
SAF	CEPEC 2002	Serapilheira	21 FS IM B	972/1941	-	SIM	-
SAF	PH16	Fruto	22 F	1698	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Serapilheira	23 FS IM	1911	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Fruto	24 F	1779	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CEPEC 2002	Solo	25 S IM	976	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	CEPEC 2002	Solo	26 S IM	977	-	NÃO	-
SAF	PS1319	Fruto	27 F	-	-	NÃO	-
SAF	PH16	Fruto	28 F	978	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
SAF	PH16	Fruto	29 F	1703	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	PH16	Solo	29 S IM	979	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Fruto	30 F	1753	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	PH16	Solo	30 S IM	980	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Fruto	31 F	981	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	PH16	Solo	31 S IM	982	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Fruto	32 F	1704	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Fruto	33 F	1741	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Solo	33 S IM	984	x	NÃO	<i>Phytopythium</i> sp.
SAF	PH16	Fruto	34 F	1701	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
SAF	PH16	Solo	34 S IM B	985	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	PH16	Fruto	35 F	1740	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	PH16	Solo	35 S IM	986	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	CCN10	Fruto	36 F	1759	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN10	Solo	36 S IM	1401	-	NÃO	-
SAF	CCN10	Fruto	37 F	1792	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN10	Fruto	38 F	987	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
SAF	CCN10	Solo	38 S IM	989	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	CCN10	Solo	39 S IM	1910	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Solo	FSP 01-S	1752	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	CCN51	Fruto	FSP 02-F	1777	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Solo	FSP 02-S	1772	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	PS1319	Fruto	FSP 03-F	1756/1948	-	NÃO	-
SAF	CCN10	Fruto	FSP 04-F	1795/1853	-	NÃO	-
SAF	CCN51	Solo	FSP 06-S	1796	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	CCN10	Fruto	FSP 08-F	1746	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Solo	FSP 09-S	1761	x	NÃO	<i>Phytophthium</i> sp.
SAF	CCN51	Fruto	FSP 10-F	1751	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
SAF	CCN51	Solo	FSP 10-S	-	-	NÃO	-
Cabruca		1434 Fruto	Cabruca1434-F	1799	-	SIM	-
Cabruca		1346 Fruto	Cabruca1346-F	1755	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CP49	Fruto	X-19-F	1855	-	SIM	-
Pleno sol	CP49	Solo	X19-S	-	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Fruto	X-21-F	1776	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CP49	Serapilheira	X28-FL	1768	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Solo	X41-S	1762	-	NÃO	-
Pleno sol	CP49	Solo	X18F	1773	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>

Sistema de cultivo	Clone coletado	Substrato	Isolado	código cDNA	β -tubulina	Patogênico em frutos do clone CCN51	Identificação
Pleno sol	CP49	Fruto	X-46-F	1745	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN51	Fruto	284-F	-	-	SIM	-
Pleno sol	CCN51	Fruto	288-F	1786	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Pleno sol	CCN51	Fruto	289-F	1794	-	SIM	-
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	293-S	1780	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	297-S	1769	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Pleno sol	Cepec 2004	Solo	300-S	1797	x	NÃO	<i>Phytophythium</i> sp.
Pleno sol	PS1319	Solo	01BL-S	1754/1771	-	NÃO	-
Pleno sol	PS1319	Solo	03BL-S	1793/1950	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	304-F	1742	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cacau-coco	TSH1188	Fruto	306-F	1750	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	PS1319	Fruto	307-F	1765/1785	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN51	Fruto	308-F	1699	-	SIM	-
Cacau-coco	CCN51	Solo	308-S R	1766	-	SIM	-
Cacau-coco	CCN51	Solo	308-S M	1905	-	NÃO	-
Cacau-coco	CCN51	Fruto	310-F	1749	x	SIM	<i>Phytophthora</i> sp. nov.
Cacau-coco	CCN51	Solo	310-S	1700	-	SIM	-
Cacau-coco	CCN51	Solo	311-S	1775	-	NÃO	-
Cacau-coco	PS1319	Solo	315-S	1857/1907	-	NÃO	-
Cacau-coco	Ipiranga 01	Solo	318-S	1798	-	NÃO	-
Cacau-coco	TSH1188	Solo	322-S	1912	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	323-F	-	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	325 F	1770	x	NÃO	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cacau-coco	Cepec 2004	Solo	386 S	1774/1778	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Serapilheira	P298FL	1854	-	NÃO	-
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	988F	1748	x	SIM	<i>Phytophthora palmivora</i>
Cacau-coco	Cepec 2004	Fruto	A14-P27	-	-	NÃO	-

"-" = a definir; "x" = sequenciado

Os isolados marcados em vermelho foram selecionados para análise de sequencias genômicas adicionais (EF1 α ; HSP90; COXII e ITS).

5. DISCUSSÃO

No Brasil, já foi relatada a ocorrência de quatro espécies principais associadas a podridão-parda em cacauero: *P. palmivora*, *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. heveae* (Luz *et al.*, 2001). Faleiro *et al.* (2004), através de marcadores RAPD diferiram isolados de três espécies de *Phytophthora* oriundos principalmente de frutos do cacauero na Bahia: *P. capsici*, *P. citrophthora* e *P. palmivora*. Apenas duas espécies de *Phytophthora*, sendo uma *P. palmivora* e a outra *Phytophthora* provável sp. nov. foram identificadas nas análises realizadas nos sistemas de produção de cacau dos municípios coletados.

A distribuição dessas espécies nos diferentes sistemas de cultivo do cacau indicam que o sistema de cultivo pode interferir na diversidade de espécies de *Phytophthora*. Existem relatos de *P. palmivora* em seringueira, a qual é uma das plantas mais utilizadas nos sistemas agroflorestais (Pereira *et al.*, 1996). Neste trabalho, foi observado uma maior incidência de *P. palmivora* em sistema SAF, podendo estar relacionado com o fato de a seringueira também ser hospedeira do fungo. Já no sistema pleno sol, onde a competição entre as plantas é mais importante, a ocorrência das duas espécies foi de maneira proporcional. No consórcio cacau-coco, a espécie *P. palmivora* já foi anteriormente relatado causando doença em coqueiro (Garcia *et al.*, 1999), por isso hipoteticamos que esta seria a espécie mais encontrada no campo. No entanto observou-se uma maior ocorrência de *Phytophthora* sp. nov. nesse sistema de cultivo. Será necessário aprofundar o estudo para determinar se realmente existe uma relação significativa entre a presença de certas espécies e o tipo de sistema de cultivo.

Como relatado no trabalho de Oliveira *et al.* (2014), o mamoeiro é conhecido como hospedeiro de *P. palmivora*, no estudo mostrou que os fatores climáticos representam uma importante fonte de variação da agressividade dos isolados. Dado a essas observações será importante estabelecermos uma relação entre os fatores ambientais nos locais de coleta com a identificação das espécies. Também podemos supor que a ocorrência de *P. palmivora* em

abundância seja explicada pelos sistemas de cultivo avaliados. Além dos relatos de *P. palmivora* nos sistema SAF e consórcio cacau-coco, na área de coleta a pleno sol foi uma antiga área de cultivo de mamoeiro. Devido a ocorrência do fungo no mamoeiro e sua capacidade de sobrevivência alta no solo, pode-se relacionar com a ocorrência da espécie no sistema pleno sol também.

Após análise das regiões β -tubulina, EF1 α e HSP90, a provável espécie nova formou um clado próximo a espécie *P. capsici*, podendo ser considerada filogeneticamente como espécie irmã. No entanto, morfológicamente as duas espécies possuem diferenças no tamanho e formato dos esporângios. Enquanto *P. capsici* apresenta esporângios de tamanho 20 – 50 \times 15 – 42.5 μm , uni ou bipapilados de tamanho 6.02 – 7.05 μm , sendo o a largura dos esporângios maior que o comprimento (Díaz-Nájera *et al.*, 2015; Paz-Lima, 2006), *Phytophthora* sp. nov. apresentou esporângios maiores, 27 – 76 \times 21.5 – 45.5 μm , unipapilados de tamanho superior a papila de *P. capsici*, com 5 – 10.5 μm . Devido a essas características, é possível acreditar que se trata de uma espécie nova ou de um híbrido.

Metade dos isolados identificados como *Phytophthora* sp. pertence a uma espécie ainda desconhecida pela comunidade científica, a qual deve ser proposta como nova espécie seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Fungos e Plantas. Adicionalmente, foi observado que *P. megakaria*, a espécie mais agressiva para o cacauzeiro e considerada praga quarentenária ausente no Brasil, não foi encontrada nesse estudo.

O gênero *Phytophthora* possui uma diversidade extremamente importante inter e intraespecífica. Morfológicamente, as espécies encontradas apresentaram diferenças no tamanho e formato dos esporângios e clamidósporos. Por serem espécies filogeneticamente distintas, era esperada essa variação interespecífica. No entanto, essas diferenças morfológicas é encontradas dentro de uma mesma espécie, relatada em estudo anterior (Luz *et al.*, 2001),

confirmam a dificuldade na identificação do agente causal da podridão-parda baseando somente nas características morfológicas.

O uso da região genômica β -tubulina revelou ser eficiente para separar as espécies de *Phytophthora*. Atualmente o gênero possui muitas sequências, oriundo dos trabalhos de Martin *et al.* (2014), Yang *et al.* (2017) e Jung *et al.* (2017), para comparação das diferentes espécies, a partir das região β -tubulina, EF1 α e HSP90, utilizadas no presente trabalho. Essas três regiões genômicas revelaram-se eficiente para identificação a nível de espécies, distinguindo-se perfeitamente uma das outras. A menor disponibilidade de sequências para as regiões ITS e COX II oriundo dos trabalhos citados anteriormente não permitiu concatenar as cinco regiões para melhorar a análise. O trabalho de Ali *et al.* (2016) permite no presente, identificar as principais espécies afetando o cacaueiro, *P. megakarya*, *P. palmivora*, *P. capsici* e *P. citrophthora*, utilizando marcadores específicos para cada espécies.

O estudo *in vitro* demotrou que as espécies estudadas possuem índices de crescimento micelial maiores em meios CA, V8 e MEA do que em meio BDA. O meio BDA aparentou ser um meio problemático para cultivo *in vitro*, principalmente para isolados de *P. palmivora*, devido ao crescimento lento dos isolados testados. O meio CA apresentou-se como o melhor meio para cultivo de *Phytophthora* spp., por apresentar uma boa taxa de crescimento, facilidade de preparação e baixo custo, seguido pelo meio V8 que tem um custo um pouco maior para sua preparação, mas cuja a taxa de crescimento não foi significativamente diferente do meio CA.

O teste de patogenicidade e agressividade revelou que os isolados provenientes de frutos causaram mais doenças que os isolados obtidos à partir de solo e serapilheira. Dos isolados de solo e serapilheira que apresentaram sintoma de doença durante o teste de patogenicidade, quatro foram sequenciados, todos pertencendo ao gênero *Phytophthora*. Os resultados da análise filogenética combinados com os dados de patogenicidade indicam que muito provavelmente os isolados que não foram patogênicos em frutos sejam isolados de

Phytopythium. Outros estudos serão realizados futuramente com intuito identificar os isolados não-patogênicos para esclarecer se todos eles são pertencentes ao gênero *Phytopythium*.

O teste de patogenicidade dos quatro isolados selecionados para sequenciamento de regiões adicionais e análise morfológica mostrou que *P. palmivora* teve um comportamento coerente com os dados já conhecidos, demonstrando uma agressividade maior no clone FB206, conhecido pela sua suscetibilidade a espécie. Os isolados de *Phytophthora* provável sp. nov. apresentaram um comportamento muito mais heterogêneo comparado aos isolados de *P. palmivora*.

Os isolados de *Phytophthora* provável sp. nov. apresentaram uma crescimento micelial *in vitro* maior que o isolado de *P. palmivora*. A mesma observação foi feita com os dados de patogenicidade dos isolados de *Phytophthora* provável sp. nov., tendo apresentado uma maior agressividade independentemente do clone testado nos ensaios.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A região β -tubulina foi eficiente para a identificação prévia dos isolados de *Phytophthora*;
- *Phytophthora palmivora* e uma provável espécie nova de *Phytophthora* foram encontradas em associação com o cacauzeiro no Sudoeste da Bahia;
- *Phytophthora* provável sp. nov. é mais agressiva que *P. palmivora*;
- Existe uma variação fisiológica intraespecífica entre os isolados de *Phytophthora*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD Z.G., COFFEY M.C. 2010. Refined systematics (taxonomy, nomenclature and phylogenetics) of *Phytophthora* for more accurate morphological-molecular identification: The importance of types and authenticated specimens. 5th IUFRO *Phytophthoras* in Forests and Natural Ecosystems. Auckland and Rotorua, New Zealand.

ABICAB. Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados. <http://www.abicab.org.br/historia/> Acesso 13/01/2018.

ASSOCIAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA AGRICULTURA FAMILIAR DO ALTO XINGU – ADAFAX. 2013. Cultivo e manejo de cacauzeiros. São Félix do Xingu-PA.

AGRIANUAL <http://agrianual.com.br/> Acesso 2017.

AKROFI A.Y., AMOAKO-ATTA I., ASSUAH M., ASARE E.K. 2015. Black pod disease on cacao (*Theobroma cacao*, L) in Ghana: Spread of *Phytophthora megakarya* and role of economic plants in the disease epidemiology. *Crop Protection* 72, 66e75.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. 2016. Isolamento de fungos fitopatogênicos. Métodos em fitopatologia. Viçosa: 2ª Ed. UFV.

ALI, S.S., AMOAKO-ATTAH, I., BAILEY, R.A., STREM, M.D., SCHMIDT, M., AKROFI, A.Y., SURUJDEO-MAHARAJ, S., KOLAWOLE, O.O., BEGOUDE, B.A.D., TEN HOOPEN, G. M., GOSS, E., PHILLIPS-MORA, W., MEINHARDT, L.W., E BAILEY, B.A. 2016. 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*.

ANDRADE, J. C. P. ; SOUZA, P. S. V. N. ; MARQUES ; BEHRMANN, DAIANNE G. M. ; ROCHA, W. K. N. 2011. Economia do cacau no sul da bahia após vinte anos de crise. In: SOBER Nordeste - "Nordeste: desafios do desenvolvimento para a inclusão social". Petrolina.

BAILEY, B.A., E MEINHARDT, L.W. 2016. Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Springer International Publishing Switzerland.

BARANYI, J., ROBERTS, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol. 23, 277e294.

BATES D., MAECHLER M., BOLKER B., WALKER S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. Journal of Statistical Software, 67(1), 1-48.

BEZUIDENHOUT,C.M., DENMAN,S., KIRK,S.A., BOTHA,W.J., MOSTERT,L. AND MCLEOD,A.P. 2010. taxa associated with cultivated *Agathosma*, with emphasis on the *P. citricola* complex and *P. capensis* sp. nov. Persoonia 25, 3249. Plant Pathology, Stellenbosch University, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa.

BLAIR J.E., COFFEY M.D., PARK S-Y., GEISER D.M., KANG S. 2008. A multilocus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45: 266–277.

BONANTS PJM, HAGENAAR-DE WEERDT M, VAN GENT-PELZER MPE, LACOURT I, COOKE DEL AND DUNCAN JM. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the poly-merase chain reaction. European Journal of Plant Pathology 103: 345–355.

BUSH, E. A., STROMBERG, E. L., HONG, C., RICHARDSON, P. A., AND KONG, P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.

CASSANO C.R., SCHROTH G., FARIA D., DELABIE J.H.C., BEDE L. 2009. Landscape and farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of southern Bahia, Brazil. *Biodivers Conserv* 18:577–603.

CHOI YJ, HONG SB, SHIN HD. 2006. Genetic diversity within the *Albugo candida* complex (*Peronosporales*, Oomycota) inferred from phylogenetic analysis of ITS rDNA and COX2 mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40 p400–409.

DIAS M.D., POZZA E.A., ABREU M.S., MIRANDA E.O. 2005. Effect of temperature on micelial growth, production and conidial germination of *Colletotrichum* spp. from *Coffea arabica* L. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 3, p. 545-552.

DÍAZ-NÁJERA, J. F., VARGAS-HERNÁNDEZ, M., LEYVA-MIR, S. G., AYVAR-SERNA, S., MICHEL-ACEVES, A. C., & ALVARADO-GÓMEZ, O. G. 2015. Morphological and molecular identification of *Phytophthora capsici* L. in pipiana pumpkin and its greenhouse management. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 21(2), 157–168.

END, M.J., DAYMOND, A.J., E HADLEY, P. 2014. Technical guidelines for the safe movement of cacao germplasm. Revised from the FAO/IPGRI Technical Guidelines No 20 (Second Update, August 2014). Global Cacao Genetic Resources Network (CacaoNet), Bioversity International, Montpellier. FAOSTAT Online Database. <http://faostat.fao.org/>

ERWIN D.C., BARTNICKI-GARCIA S., TSAO P.H. 1983. *Phytophthora* its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota-USA.

FLOOD, J., GUEST, D., HOLMES, K.A., KEANE, P., PADI, B., E SULISTYOWATI, E. 2004. Cocoa under attack. In: J. Flood & R. Murphy (Eds.), Cocoa futures. Chinchina, CO: CABIFEDERACAFE. 164pp.

FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., CERQUEIRA, A.O., ROCHA, C.S.S., DANTAS NETO, A., FLORES, A.B., BAHIA, R.C.S. & FALEIRO, A.S.G. 2004. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacaueteiro com base em marcadores RAPD. Fitopatologia Brasileira 29:303-306.

GARCIA A., RIBEIRO G.D., RODRIGUES A.N.A. 1999. Ocorrência das principais doenças do coqueiro (*COCOS nucifera*. L.) em Rondônia e medidas de controle. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 22p.

GUEST D. 2007. Black pod: diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. Phytopathology, 97:1650-1653.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. 2007. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. Métodos em Fitopatologia, v. 01, p. 92-102.

Ho H.H. 2018. The Taxonomy and Biology of *Phytophthora* and *Pythium*. J Bacteriol Mycol Open Access 6(2): 00174.

HUDSPETH DSS, NADLER SA, HUDSPETH MES. 2000. A *cox2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. Mycologia, 92, 674–684.

JUNG T., NECHWATAL J., COOKE D.E.L., HARTMANN G., BLASCHKE M., OßWALD W.F., DUNCAN J.M. and DELATOUR C. 2003. *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. Mycol. Res. 107 (7): 772–789.

JUNG T., JUNG M.H., CACCIOLA S.O., CECH T., BAKONYI J., SERESS D., MOSCA S., SCHENA L., SEDDAIU S., ANTONELLA PANE A., SAN LIO G.M., MAIA C., ALFREDO CRAVADOR A., FRANCESCHINI A., SCANU B. 2017. Multiple new cryptic pathogenic *Phytophthora* species from Fagaceae forests in Austria, Italy and Portugal; IMA FUNGUS · 8(2): 219–244.

KIMATI H., AMORIM L., BERGAMIN FILHO A., CAMARGO L.E.A., REZENDE J.A.M. 1997. Manual de fitopatologia-volume 2. 3 ed. São Paulo-SP.

KUDJORDJIE E.N. 2015. *Phytophthora Megakarya* and *P. Palmivora* on theobroma cacao: aspects of virulence and the effects of temperature on growth and resistance to fungicides. University of Copenhagen.

KONG, P., HONG, C.X., TOOLEY, P.W., IVORS, K., GARBELOTTO, M., RICHARDSON, P.A. 2004. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. Lett. Appl. Microbiol. 38, 433–439.

Lobão D.E.V.P. 2007. Agroecossistema cacauero da bahia: cacauabruca e fragmentos florestais na conservação de espécies arbóreas. Unesp, Jaboticabal - São Paulo.

LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K. e BEZERRA, J.L. 2001. Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas- SP.

MAHARAJ, K., INDALSINGH, T., RAMNATH, D., E CUMBERBATCH, A. 2005. High density planting of cacao: The Trinidad and Tobago experience. In: F. Bekele, M. End, e A. B. Eskes (Eds.), Proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding for Improved Production Systems. Accra: INGENIC and the Ghana Cocoa Board, pp. 171-182.

MAPA <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-quarentena/lista-de-pragas-quarentenarias-ausentes-e-presentes.pdf/view>
Acesso 03/06/2018.

MAPA. Alerta quarentenário monilíase do cacauzeiro (*Moniliophthora roreri*). Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso 03/07/2018.

MARTIN F.N., BLAIR J.E., COFFEY M.D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. Fungal Genetics and Biology 66 , 19–32.

MILLER, M.A., HOLDER, M.T., VOS, R., MIDFORD, P.E., LIEBOWITZ, T., CHAN, L., HOOVER, P., WARNOW, T. 2010. The CIPRES Portals. Website <http://www.phylo.org/subsections/portal>.

NAIR P.K.R. 1993. An Introduction to Agroforestry. Florida, U.S.A.

NDUKWU, M.C., OGUNLOWO, A.S., OLUKUNLE, O.J. 2010. Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Drying Kinetics. Chilean Journal of Agricultural Research, 70(4):633-639.

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

OLIVEIRA, T.A.S.; BLUM, L.E.B.; DUARTE, E.A.A.; TAVARES, G.M.; LUZ, E.D.M.N. 2014. Fatores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. Summa Phytopathologica, v.40, n.3, p.256-263.

PANG, J.T.Y. 2006. Yield efficiency in progeny trials with cocoa. Experimental Agriculture, 42:289-299.

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

PEREIRA A.V.; PEREIRA E.B.C.; FIALHO J.F.; JUNQUEIRA N.T.V. 1996. Seringueira em sistemas agroflorestais. Planaltina: Embrapa-CPAC, 42p.

PIASENTIN F.B., SAITO C.H. 2014. Os diferentes métodos de cultivo de cacau no sudeste da Bahia, Brasil: aspectos históricos e percepções. Belém-PA. v. 9, n. 1, p. 61-78.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. 2012. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. Mycotaxon, v. 122, n. 1, p. 333-345.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systematic biology, v. 53, n. 5, p. 793-808.

RANNALA, B.; YANG, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. Journal of molecular evolution, v. 43, n. 3, p. 304-311.

R Development Core Team. R. 2008. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

ROCHA, H. M., E RAM, C. 1971. Cancro em cacauzeiros na Bahia. *Revista Theobroma (Brasil)*, 1:44-47.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, v. 19, n. 12, p. 1572-1574.

RUANO-ROSA D., SCHENA L., AGOSTEO G. E., MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S. O. 2018. *Phytophthora oleae* sp. nov. causing fruit rot of olive in southern Italy. *British Society for Plant Pathology*.

SÁNCHEZ S.E.M. 2011. Cacau e graviola : descrição e danos das principais pragas-de-insetos. UESC, Ilhéus-BA.

SILVA NETO P.J., MATOS P.G.G., MARTINS A.C.S., SILVA A.P. 2001. Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. Belém-PA, CEPLAC, 125p.

SODRÉ, G. A. 2017. Cultivo do cacauzeiro no estado da Bahia. Ilhéus, BA, MAPA/Ceplac/Cepec. 126.

World Cocoa Foundation. History of Cocoa <http://www.worldcocoafoundation.org/about-cocoa/history-of-cocoa/> Acesso 12/01/2018.

YANG,X., TYLER,B.M. AND HONG,C. 2017. An expanded multilocus phylogeny for the genus *Phytophthora*. Virginia Tech, USA.