

Documentos

Brasília, DF / Março, 2024

Aspectos da cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e sua interação com *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa



Embrapa

Recursos Genéticos
e Biotecnologia

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura e Pecuária**

e-ISSN 0102-0101

Documentos 388

Março, 2024

Aspectos da cultura do cupuaçuzeiro
(*Theobroma grandiflorum*) e sua
interação com *Moniliophthora perniciosa*,
agente causal da vassoura de bruxa

*Loeni Lüdke Falcão
Joseilde Oliveira Silva-Werneck
Marcelo de Macedo Brígido
Lucilia Helena Marcellino*

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2024

**Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Parque Estação Biológica – PqEB
Av. W5 Norte (final)
CEP: 70770-917 Brasília, DF
www.embrapa.br/
recursos-geneticos-e-biotecnologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Priscila Grynberg

Secretária-executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros

*Andrielle Câmara Amaral Lopes; Bruno
Machado Teles Walter; Débora Pires
Paula; Edson Junqueira Leite; Marcos
Aparecido Gimenes; Solange Carvalho
Barrios Roveri José*

Edição executiva

Ana Flávia do Nascimento Dias

Revisão de texto

Lucília Helena Marcellino

Joseilde Oliveira Silva-Werneck

Normalização bibliográfica

Rosamares Rocha Galvão

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Maria Goreti Braga dos Santos

Foto da capa

Júlia Lüdke Falcão

Adilson Werneck

Publicação digital: PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Aspectos da cultura do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e sua interação com
Moniliphthora perniciosa, agente causal da vassoura de bruxa / Loeni Lüdke Falcão
[et al.]. - Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2024.

PDF (23 p.) : il. color. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia, 388)

1. Cupuaçu. 2. Praga. 3. Preservação. I. Falcão, Loeni Lüdke. II. Série

CDD (21. ed.) 634.98

Rosamares Rocha Galvão (CRB-1/2122)

© 2024 Embrapa

Autores

Loeni Lüdke Falcão

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciências Biológicas - Biologia Molecular, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Joseilde Oliveira Silva-Werneck

Engenheira-agrônoma, PhD em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Marcelo de Macedo Brígido

Biólogo, doutor em Bioquímica, professor titular da Universidade de Brasília (UnB)

Lucília Helena Marcellino

Bióloga, doutora em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Apresentação

A preservação da floresta amazônica é de imensa importância socioeconômica e ambiental, regulando o clima, protegendo a biodiversidade e sustentando comunidades, sendo um tema central de discussão no cenário nacional e internacional. A cultura do cupuaçuzeiro, árvore nativa da Amazônia, surge como potencial aliada na preservação. Além de gerar emprego e renda para as comunidades locais, essa cultura pode proteger o ecossistema. Contudo, desafios como a doença vassoura de bruxa ameaçam sua sustentabilidade. Para que a cultura do cupuaçuzeiro contribua de forma efetiva para a preservação da floresta amazônica, é importante investir em pesquisas para o desenvolvimento de variedades resistentes que aliem produtividade e qualidade. Para contribuir na obtenção destas variedades, o conhecimento a respeito da genética molecular do cupuaçuzeiro é de primordial importância. Neste contexto, a equipe da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e parceiros têm investigado os aspectos moleculares da interação *Theobroma-Moniliophthora perniciosa*. Este documento apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema que compõe parte da tese de doutorado de Loeni Lüdke Falcão, intitulada “Genômica funcional da interação cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa”, desenvolvida na Embrapa e defendida na Universidade de Brasília, em 2023. O documento traz informações sobre os aspectos socioeconômicos da cultura, o programa de melhoramento da Embrapa, características do patossistema *Theobroma-Moniliophthora perniciosa* e os estudos moleculares relacionados a este patossistema.

Marcelo Lopes da Silva

Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Cultura do cupuaçuzeiro	9
Características socioeconômicas	9
Cupuaçuzeiro em sistema agroflorestal (SAF)	11
Bancos de germoplasma	12
Programa de melhoramento	13
Patossistema <i>Theobroma-Moniliophthora perniciosa</i>	14
Ciclo da doença	16
Produção de esporos	16
Início da infecção	17
Fase biotrófica – estabelecimento da doença	18
Transição da fase biotrófica para necrotrófica	22
Estudos moleculares relacionados à doença VB em cupuaçuzeiro	24
Referências	27

Cultura do cupuaçuzeiro

Características socioeconômicas

O cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum] é uma planta nativa da região Amazônica, provavelmente do estado do Pará e do estado do Maranhão (Ducke, 1946; Ducke, 1953; Cuatrecasas, 1964). A espécie foi distribuída por toda região Norte, possivelmente pelas populações indígenas que viviam na Amazônia (Calzavara et al., 1984). Quanto à classificação botânica, o cupuaçuzeiro é da ordem Malvales; família Malvaceae; gênero *Theobroma*; espécie: *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.

T. grandiflorum é cultivado principalmente na região Norte do Brasil, sendo Amazonas e Pará os principais produtores (6.002 e 4.965 toneladas, respectivamente), e na região Nordeste, sendo a Bahia o maior produtor (6.297 toneladas). Pelo censo agropecuário do IBGE 2017¹, o Brasil produziu 21.240 toneladas de frutos, em 15.747 estabelecimentos rurais.

A Secretaria de Estado de Desenvolvimento Agropecuário e Pesca do Pará - SEDAP, com o apoio da Embrapa Amazônia Oriental (CPATU), tem estimulado o cultivo de cupuaçuzeiro, distribuindo sementes da cultivar BRS Carimbó desenvolvida pela Embrapa Amazônia Oriental². No entanto, essa é uma cultura que conta com pouco investimento em pesquisa. A cadeia produtiva ainda precisa ser devidamente estruturada e desenvolvida.

Cupuaçu, além de ser um dos sabores tropicais tipicamente brasileiro, foi designado fruta nacional pela Lei No 11.675, de 19 de maio

¹ Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cupuacu/br>.

² Disponível em: <https://www.sedap.pa.gov.br/boletim-cvis>.

de 2008. Essa cultura é importante para a economia de milhares de agricultores familiares e apresenta grande potencial para a bioeconomia nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Por ser uma cultura que se adapta ao sistema agroflorestal (SAF), pode ser de grande valia no desafio de conciliar o desenvolvimento econômico sustentável e a preservação da floresta, além de valorização da biodiversidade brasileira.

O fruto do cupuaçuzeiro pode ser aproveitado integralmente. A polpa é o principal produto tradicionalmente comercializado e utilizado in natura, ou desidratado ou cristalizado, ou na forma dos mais variados doces. Todavia, são crescentes os estudos para uso da polpa para saborizar diferentes tipos de produtos como, por exemplo, melhorando a palatabilidade de iogurte de leite de cabra; para fabricação de novos produtos, como panetones com farinha da casca e recheado com geleia de cupuaçu; para produção de barras de cereal e outros (Costa et al., 2022); e ainda, estudos para uso da polpa de cupuaçu na produção de alimentos funcionais contendo probióticos (Pereira et al., 2017).

As amêndoas podem ser fermentadas e utilizadas na fabricação de um produto de sabor e textura similar ao chocolate convencional, mas livre de cafeína e teobromina, o cupulate (Nazaré et al., 1990; Cohen et al., 2004). Além disso, trabalhos para melhorar a palatabilidade do cupulate, e uso do pó da amêndoa de cupuaçu em misturas com chocolate, denotam que há espaço para crescimento do uso de amêndoas de cupuaçu no mercado de alimentos (Ramos et al., 2022). Os produtos derivados das amêndoas trazem um diferencial interessante, como no caso da manteiga que é mais macia que a de cacau, o que se deve ao alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico (Ramos et al., 2022) e ao ponto de fusão mais alto, 33,9°C, enquanto que na manteiga de cacau é 31°C (Cohen et al., 2004). A maciez e o ponto de fusão mais alto conferem aspecto mais liso e macio ao produto.

Além disso, estudos estão sendo feitos para que moléculas encontradas nos frutos de cupuaçu possam ser utilizadas na indústria farmacêutica (Assmann et al., 2021). Na semente de cupuaçu, foram

encontrados alguns flavonoides importantes, como catequina e epicatequina, quercetina, kaempferol, entre outros (Pugliese et al., 2013). Jean-Marie et al. (2022) relatam a presença de compostos polifenólicos sulfatados singulares denominados teograndina I e II e derivados da hipolaetina (Jean-Marie et al., 2022). Além disso, estudos de digestibilidade demonstram que sementes de cupuaçu não causam efeitos tóxicos e apresentam inibição de α -amilases (97%), indicando potencial efeito antidiabético.

A casca do cupuaçu pode ser utilizada na alimentação humana ou animal. A farinha da casca é fonte de carboidratos e fibras e serve para usos diversos, entre eles panificação. Inclusive, com a possibilidade de substituição total ou parcial da farinha de trigo na elaboração de biscoitos, pães, *cookies* e outras massas (Silva et al., 2021; Costa, 2022).

Na literatura, há relatos de possibilidades de aproveitamento da casca de cupuaçu na indústria de diversas formas: produção de carvão, o qual apresenta alto poder calorífico e devido à ausência de celulose e hemicelulose, sua combustão não produz alcatrões (Santos et al., 2004); produção de biossorvente para remoção de corantes têxteis de solução aquosa, de bioenergia e produtos químicos de base biológica (Alves et al., 2022); produção de carvão microporoso, útil na adsorção de CO_2 (Cruz Junior et al., 2023).

Cupuaçuzeiro em sistema agroflorestal (SAF)

Os sistemas agroflorestais são uma forma sustentável para a agricultura, especialmente em solos menos férteis de terras altas da Amazônia brasileira. No entanto, muitas variáveis estão envolvidas no processo de adoção e manutenção desses sistemas. A manutenção do fluxo de material orgânico dentro de um contexto evolutivo, considerando a mudança de combinação de plantas (relações de complementaridade, suplementariedade ou competitividade), é fundamental para o sucesso destes sistemas, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico. Alguns trabalhos de compatibilidade de

espécies, estudos de efeito na fertilidade do solo, manejo do sistema e seleção de variedades de cupuaçuzeiro mais adaptadas a esses sistemas estão sendo conduzidos (Clough et al., 2009; Wade et al., 2010; Almeida et al., 2014; Alves et al., 2017, 2020, 2022; Rocha et al., 2019; Wemheuer et al., 2020). No entanto, há ainda muito a ser feito para alavancar tecnológica e economicamente o uso desses sistemas na produção do cupuaçuzeiro.

Bancos de germoplasma

As populações nativas são fundamentais para a sustentabilidade biológica do cupuaçuzeiro, pois são as únicas reservas de genes e genótipos disponíveis. No entanto, o desmatamento para instalação de grandes projetos agropecuários, no Sudeste do Pará, causou a redução das populações nativas de cupuaçuzeiro resultando em forte erosão genética. A floresta do Polígono dos Castanhais, área de ocorrência de grandes populações nativas dessa frutífera, próximo a Marabá, também foi afetada, restando apenas alguns mosqueados da mata original, localizadas em reservas legais e áreas indígenas (Alves et al., 2014).

Segundo os dados disponíveis no portal da plataforma Alelo Recursos Genéticos da Embrapa, quatro bancos ativos de germoplasma (BAG) de cupuaçuzeiro³, coleções *ex situ*, são mantidos no Brasil:

- 1- BAG de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental, implementado em 1984, contém 251 acessos coletados nos estados do Amazonas e Pará.
- 2- BAG de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, implementado em 1986, contém 192 acessos provenientes do Pará, Amazonas e Amapá.

³ Disponível em: <https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/buscaNcBancos.do?idn=5295>.

3- BAG de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amapá, implementado em 1998, contém 68 acessos provenientes do Amapá.

4- BAG de Cupuaçuzeiro do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), implementado em 1973, contém 66 acessos provenientes do Pará e Maranhão.

Os acessos foram coletados em áreas de ocorrência natural, plantios comerciais e pomares caseiros. Contudo, há grande possibilidade da variabilidade genética conservada nessas coleções ainda estar muito longe de contemplar uma amostragem significativa da população natural da espécie (Souza et al., 2017).

Programa de melhoramento

O programa de melhoramento genético de cupuaçuzeiro busca nos bancos de germoplasma a variabilidade para desenvolvimento de cultivares mais produtivas e, ao mesmo tempo, resistentes à principal doença da cultura, a vassoura de bruxa (VB), mantendo ou aumentando a qualidade dos frutos (Alves et al., 2013). Uma outra praga, a broca do cupuaçuzeiro, vem ganhando importância na cultura e precisa ser considerada pelo melhoramento genético. Além disso, o desenvolvimento tecnológico direcionado para usos de metabólitos presentes nos frutos de cupuaçu pode abrir novas frentes de melhoramento.

Em 2002, foram lançadas as primeiras cultivares selecionadas para maior produtividade e resistência à vassoura de bruxa (BRS Coari, BRS Codajás, BRS Manacapuru e BRS Belém). Em 2012, foi lançada a cultivar BRS Carimbó.

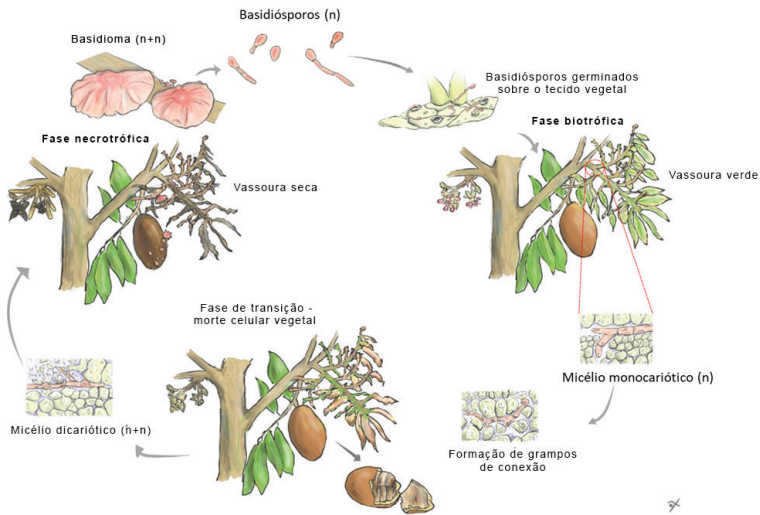
Em 2022, a Embrapa lançou um pacote de cinco cultivares: BRS Curinga, BRS Golias, BRS Careca, BRS Fartura e BRS

Duquesa – Cupuaçu 5.0⁴, que além de maior produtividade e resistência à VB, embute uma tecnologia de arranjos de plantio para superar o problema da autoincompatibilidade e visa inserir diversidade genética nos pomares (Alves; Chaves, 2019).

Patossistema *Theobroma-Moniliophthora perniciosa*

O principal problema fitossanitário da cultura de cupuaçuzeiro é a doença VB, assim como da cultura de cacaueteiro na América tropical. A VB é causada pelo basidiomiceto *M. perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora 2006, anteriormente denominado *Crinipellis perniciosa* (Aime; Phillips-Mora 2005). A doença tem início com a invasão dos tecidos meristemáticos. O fungo compromete especialmente o meristema das gemas apicais, causando alterações no desenvolvimento e crescimento dos ramos, resultando no enfraquecimento geral da planta. Além disso, pode ocorrer a contaminação da almofada floral, o que prejudica tanto a formação das flores, quanto dos frutos. O fungo pode também colonizar internamente os frutos, ocasionando a deterioração da polpa e das amêndoas. De uma maneira geral, o ciclo está representado na Figura 1. Estudos conduzidos em cacaueteiro (Teixeira et al., 2014) mostram que a planta é induzida a drenar grande quantidade de fotossintatos para as regiões infectadas, prejudicando outras partes da planta. Os ramos infectados se tornam hipertrofiados, ocorre a quebra da dormência apical e superbrotamento, gerando uma estrutura chamada de vassoura verde. O fungo infecta a planta e vive de forma biotrófica no espaço intercelular/apoplasto de

⁴ Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnicas/-/produto-servico/6075/cupuacu-50---kit-decultivares-de-cupuacuzeiro-de-alta-produtividade-e-boa-resistencia-a-vassoura-de-bruxa>.



Ilustrações: Júlia Lüdke Falcão

Figura 1. Ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma grandiflorum*.

1 a 3 meses, até a formação da vassoura verde (Evans 1980; Bastos and Evans 1985; Meinhardt et al., 2008). Na vassoura verde, as folhas ficam cloróticas, sendo que as mais distantes do ápice começam a secar e, progressivamente, o ramo seca até a região da infecção inicial, formando a vassoura seca, estrutura que inspirou o nome da doença, vassoura de bruxa. O fungo, então, passa a produzir grande quantidade de hifas saprofíticas, que se desenvolvem nos tecidos mortos e produzem estruturas reprodutivas (Evans, 1980).

O processo de frutificação e liberação de basidiósporos é sensível às condições climáticas e ao tempo. A produção de basidiomas é estimulada por períodos secos e úmidos alternados. A formação de basidiomas e esporulação pode ocorrer por vários anos sobre o mesmo material vegetal morto (Meinhardt et al., 2008). Por isso, a prática da poda fitossanitária e destruição dos tecidos vegetais contaminados é essencial para redução de inóculo nos pomares. Mesmo as cultivares

de cupuaçu lançadas recentemente não são 100% resistentes à doença vassoura de bruxa (Alves et al., 2021).

O conhecimento sobre a doença é principalmente gerado a partir de estudos em cacauero. Não há registros de diferenças significativas entre as duas espécies quanto ao desenvolvimento da doença. Considerando que as duas espécies são do mesmo gênero e que a espécie do fungo que causa a doença é a mesma, o conhecimento gerado para uma cultura tem sido aproveitado para ambas. Contudo, mais esforços para estudar as particularidades da espécie *T. grandiflorum* podem revelar especificidades importantes.

Acredita-se que *M. pernicioso* tenha se originado e coevoluído com plantas hospedeiras na bacia do alto Rio Amazonas, no lado leste dos Andes (Purdy; Schmidt, 1996). Esse fungo é capaz de colonizar várias espécies de plantas do gênero *Theobroma* e plantas de famílias não relacionadas, como *Solanaceae*. *M. pernicioso* é classificado em três biótipos de acordo com a especificidade do hospedeiro: o biótipo C infecta plantas da família *Malvaceae* (cupuaçu, cacau e outros), o biótipo S infecta membros da família *Solanaceae* (por exemplo, tomate) e o biótipo L é encontrado em associação com membros da família *Bignoniaceae* (por exemplo, lianas) (Teixeira et al., 2015; Meinhardt et al., 2008).

Ciclo da doença

Produção de esporos

Pequenos basidiomas cor de rosa (cogumelos) se formam sobre restos culturais, como vassouras secas e frutos que ficam presos às plantas ou que tenham sido retirados, como por ocasião da poda fitossanitária. A alternância de dias úmidos e dias secos é necessária para indução da formação dos basidiomas. A dispersão aérea dos basidiósporos ocorre principalmente durante os períodos noturnos e é feita pelas correntes de ar (Meinhardt et al., 2008).

Início da infecção

A infecção da planta inicia-se com a germinação dos basidiósporos, penetração do tubo germinativo e estabelecimento das hifas primárias no espaço intercelular. As hifas primárias apresentam pontas em forma de clavas que podem causar desintegração na cutícula para penetrar. As hifas penetram diretamente pela cutícula, pelas aberturas naturais na cutícula da epiderme e entre junções da parede celular, pela base dos tricomas e pelos estômatos (Sena et al., 2014). Estudos realizados nas décadas de 1980 e 1990 destacaram a penetração pela abertura dos estômatos e ferimentos na base de tricomas (Evans, 1980; Kilaru Hasenstein, 2005).

Sena et al. (2014) demonstraram que basidiósporos de *M. perniciosa* começam a germinar 2 horas após a inoculação (hai) em gemas apicais de genótipo suscetível (GS) de cacau variedade Catongo. Na superfície de genótipo resistente (GR) variedade CCN51, os basidiósporos demoraram mais tempo para germinar, de 4 a 6 hai, e o tubo germinativo era menor. A penetração de hifas aconteceu da mesma maneira no GS e GR, todavia a quantidade de hifas que penetraram no GR foi menor.

Nas superfícies dos tecidos vegetais, o fungo encontra moléculas secretadas pela planta e uma microbiota de organismos epifíticos que, junto com as células epidérmicas, são a primeira barreira de proteção para a planta. Mares et al. (2020) demonstraram que componentes hidrossolúveis da superfície das folhas de cacau (filoplano) diminuíram a germinação e modularam o metabolismo de esporos de *M. perniciosa*. Os componentes retirados do filoplano do GR causaram diminuição do tubo germinativo e aumento de uma policetídeo ciclase relacionada à virulência e glicosídeo hidrolases, como celulasas, xilanases, e poligalacturases, que degradam polissacarídeos de parede celular vegetal, que podem ser reconhecidos por proteínas vegetais do tipo PRR (*pattern recognition receptors*), as quais ativam o sistema imune inato da planta. Adicionalmente, houve o aumento de uma proteína de transporte de múltiplas drogas. Essas proteínas transportadoras, geralmente, estão envolvidas no efluxo de

substâncias tóxicas à planta. Já os componentes hidrossolúveis do filoplano do GS induziram menor expressão de proteínas Bip nos basidiósporos, que podem estar relacionadas a uma menor taxa de síntese de proteínas, o que sugere um baixo nível de estresse, refletido pela menor atividade do retículo endoplasmático, onde essas proteínas atuam e são mais expressas em situação de estresse (Hendershot, 2004; Mares et al., 2020, 2016). Estudos deste tipo, específicos para *T. grandiflorum*, ainda não estão disponíveis.

Fase biotrófica – estabelecimento da doença

Nesta fase, as hifas de *M. perniciosa* são hialinas e inchadas, monocarióticas, assexuadas, crescem exclusivamente no espaço extracelular e não apresentam grampos, sendo que a densidade do micélio é baixa (Evans, 1980; Sena et al., 2014).

M. perniciosa é um fungo hemibiotrófico atípico, que apresenta uma longa fase biotrófica, de um a três meses (Teixeira et al., 2015). Nesta fase, aparecem os sintomas característicos da doença e ocorrem pequenas variações nos sintomas entre as espécies *T. cacao* e *T. grandiflorum*. Podem ocorrer pequenas variações entre cultivares, entre galhos de plantas adultas e mudas. Contudo, há um padrão de comportamento partilhado, como indução de hiperplasia de tecidos, que formam um inchaço na região da infecção, desenvolvimento de galhos com internódios curtos e, posteriormente, desenvolvimento de várias ramificações laterais, devido à quebra de dormência apical. Esses sintomas aparecem de 15 a 30 dias após a infecção (dai) (Silva et al., 2002). Quando a infecção acontece na almofada floral, pode ocorrer abortamento de flores, formação de brotações no caule ou a formação de frutos partenocárpicos que ficam pequenos e atrofiados. Porém, quando a infecção ocorre nos frutos jovens, esses crescem aparentemente de forma normal, no entanto, a doença se desenvolve no interior do fruto, e quando os frutos amadurecem, manchas escuras aparecem na casca, e a polpa e as sementes ficam danificadas (Silva et al., 2002).

No estudo via microscopia, conduzido por Sena et al. (2014), foram observadas diferenças importantes entre GS e GR de cacau, descritas a seguir. Genótipo suscetível: os primeiros sinais da doença apareceram 30 dai. Aos 60 dai, as vassouras típicas estavam completamente formadas, células do córtex, floema, xilema e medula estavam hipertrofiadas, distorcidos, desorganizados e significativamente maiores do que em mudas saudáveis não inoculadas. A colonização pelo fungo era intensa e as hifas intercelulares variaram de 6,44 a 15,6 μm de largura. Genótipo resistente: entre 35 e 42 dai, os sinais de doença começaram a aparecer. Aos 60 dai, havia formação de vassouras pequenas, com 4 cm de comprimento e raramente aparecia inchaço no caule. O córtex e o floema apresentavam hipertrofia leve e com menos inclusões que no GS. Além do número de infecções ser menor, a quantidade de micélio encontrado era menor e com segmentos de hifas intercelulares mais curtos e mais finos (largura média: GS - 10,9 μm , GR - 6,72 μm). A restrição da proliferação do patógeno apareceu associada às reações de defesa do hospedeiro, caracterizadas pelo aparecimento de periderme e presença de células necróticas no córtex. Não foram identificadas hifas colonizando tecidos numa distância maior que 5 a 10 cm a partir do ponto de colonização na fase biotrófica (Sena et al., 2014).

A avaliação da presença de amido em GS e GR, por microscopia, identificou a presença de grãos principalmente na medula, raios do xilema e tecidos corticais. A quantidade de grãos de amido variou entre os genótipos, mas sempre foi maior nas plantas não inoculadas (Sena et al., 2014).

Teixeira et al. (2014) avaliaram a presença de amido em mudas de GS de cacau aos 30 dai com *M. perniciosa*, fase em que as vassouras estão formadas e as folhas da vassoura estão cloróticas. Eles encontraram diminuição drástica da quantidade de amido nos tecidos infectados. O RNAseq dessas mudas e a análise do diferencial de expressão dos genes contrastando plantas saudáveis (não inoculadas) e plantas doentes, mostraram que genes associados com a degradação de carboidratos e lipídios (amido e triacilglicerol, respectivamente) foram regulados positivamente, incluindo genes que

codificam amilases e lipases. Em paralelo, genes necessários para a degradação de sacarose (invertase da parede celular) e transporte de hexose (transportadores de hexose) foram regulados positivamente nas plantas doentes, enquanto outros genes relacionados a fotossíntese foram regulados negativamente, indicando que a doença interfere na fisiologia normal dos tecidos meristemáticos, de maneira que suas células mantêm a capacidade de dreno primário. Fotossintatos produzidos pela planta são continuamente translocados para os tecidos com células dreno.

Além disso, *M. pernicioso* produz a proteína metanol oxidase (MOX), que é secretada no espaço extracelular e possui todos os genes classicamente relacionados ao metabolismo do metanol. Em função disso, foi proposta a existência de uma via de metabolismo de metanol independente de peroxissomos para *M. pernicioso*. A expressão relativa de *Mp-mox*, em diferentes fases de desenvolvimento da doença, está correlacionada com os níveis de expressão de *Mp-pme* (*pectin methylesterase*) e com a redução no nível de esterificação de metila, o que indica que esse fungo metaboliza o metanol gerado pela degradação da pectina (de Oliveira et al., 2012). Análises do transcrito de *M. pernicioso*, colonizando vassouras verdes, identificou altos níveis de expressão de genes que codificam para enzimas pectinolíticas, entre elas, pectina metilesterases, poligalacturonases e pectato liases. Também foram identificados transcritos de genes envolvidos no metabolismo de subprodutos da degradação da pectina (genes que codificam para metanol oxidase, formaldeído desidrogenase e formato desidrogenase) (Teixeira et al., 2014).

Muitos genes putativos que codificam celulases, xilanases, arabinofuranosidases, manosidases e acetilesterases foram identificados diferentemente expressos em hifas colonizando vassoura verde, indicando que o fungo degrada celulose e hemicelulose. Paralelamente, genes associados ao metabolismo secundário e à modificação da parede celular também estão com expressão muito aumentada (Teixeira et al., 2014).

Uma característica do transcrito de vassoura verde é a prevalência de transcritos relacionados a respostas de defesa. Genes que

codificam putativos receptores imunológicos como RLPs e RLK (entre eles 30 receptores da família NB-LRR) foram induzidos pela infecção por *M. perniciosa*. Esses genes codificam proteínas intracelulares que reconhecem direta ou indiretamente efetores de patógenos, levando a fortes respostas de resistência. De fato, foram identificados 67 genes que codificavam para proteínas responsivas a patogênese (PR-1, PR-2/ β -1-3-glucanase, PR-3, PR-4, PR-8, PR-11/quitinase, PR-5/taumatina, PR-6/inibidor de protease, PR-9/peroxidase e PR-10/ribonuclease), além desses, 16 fatores de transcrição WRKY, três inibidores de protease Kunitz e três NADPH oxidases responsáveis pela produção de radicais livres como íons superóxido (Teixeira et al. 2014). Apesar de altamente ativadas, essas respostas de defesa não são efetivas para controlar a vassoura de bruxa. O transcrito do fungo, colonizando esses mesmos tecidos, revela que *M. perniciosa* expressa um arsenal de genes que codificam enzimas envolvidas na desintoxicação e tolerância ao estresse. Entre eles, estão genes que codificam as enzimas: i) antioxidante superóxido dismutase e catalase, as quais conferem ao fungo capacidade de lidar com a toxicidade de ROS, ii) glutatona sintase, que catalisa a etapa final da via de biossíntese da glutatona, iii) 12 genes que codificam enzimas do citocromo P450 (Teixeira et al., 2014). Esses dados estão de acordo com a análise das rotas identificadas a partir do genoma de *M. perniciosa* (Mondego et al., 2008).

Outro ponto importante na fase biotrófica da doença é a ativação e regulação de vias de fitohormônios. A análise transcritômica de tecidos de vassoura verde revelou a regulação positiva de genes de cacau relacionados à resposta de auxina (IAA), a biossíntese e resposta de giberelinas e degradação de etileno (ET) e citocinina (CKs) (Teixeira et al., 2014). A habilidade de *M. perniciosa* de produzir e crescer na presença de altas quantidades de IAA, ácido salicílico (SA) (Kilaru et al., 2007) e CKs (Costa et al., 2021) indica que esses hormônios estão envolvidos na patogenicidade do fungo e no desenvolvimento dos sintomas na planta. Ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA) endógenos, também foram identificados em micélio de *M. perniciosa*. Por outro lado, Litholdo et al. (2015) identificaram a indução,

exclusivamente no GR (CAB214), de genes relacionados à ativação da rota de sinalização JA/ET (*Allene Oxide Synthase-TcAOS*) e *S-Adenosylmethionine Synthetase-TcSAM*).

Transição da fase biotrófica para necrotrófica

A partir da análise do genoma de *M. pernicioso* (Mondego et al., 2008), foi identificado um gene que codifica uma oxidase mitocondrial alternativa (AOX). Este gene (*Mp-aox*) atua em uma via respiratória alternativa à cadeia respiratória dependente de citocromo (CRC) 'convencional' e universalmente conservada, que envolve os complexos respiratórios III e IV. A caracterização de *Mp-aox* mostra uma clara correlação entre o estilo de vida hemibiotrófico desse fungo e a funcionalidade das vias respiratórias mitocondriais e sugere que AOX permite que a respiração continue durante os estágios iniciais da infecção, quando o patógeno precisa sobreviver em um ambiente hostil estabelecido pelo sistema de defesa do hospedeiro. Também foi demonstrado que a inibição do CRC manteve o fungo em seu estágio monocariótico, enquanto era sustentado pela respiração dependente de AOX (Thomazella et al., 2012).

Thomazella et al. (2012) propõem que a geração de óxido nítrico (NO) durante a infecção pode ser o fator responsável para o controle do desenvolvimento biotrófico de *M. pernicioso* na planta. Com a morte dos tecidos vegetais, a inibição dependente de NO da cadeia respiratória convencional (CRC) cessaria, e um aumento na relação citocromo/AOX forneceria a energia necessária (ATP) para o crescimento intenso de patógenos durante a fase necrotrófica. Neste contexto, AOX pode ser um interruptor que regula o desenvolvimento dessas duas estratégias de vida em *M. pernicioso* (fases biotrófica e necrotrófica).

Barau et al. (2015) propuseram outro modelo para explicar a transição de fase biotrófica para necrotrófica, porém, essa proposta pode ser complementar à de Thomazella et al. 2012. O modelo considera que a privação de carbono é um componente de sinalização que controla a duração da fase biotrófica da VB. O início da fase necrotrófica

é marcado pela regulação positiva do gene *MpNEP2*, que codifica para um efector semelhante ao *NEP*, o qual necrosa tecidos de planta (Garcia et al., 2007; Zaparoli et al., 2009). Barau et al. (2015) demonstraram que a falta de carbono solúvel no apoplasto ativa a expressão de genes que codificam para proteínas necrotróficas (*MpNEP2*). Quando o fungo é cultivado em meio pobre de carboidratos, o processo de autofagia é desencadeado, induzindo expressão de *MpNEP2*. Ocorre, também, o aparecimento de um fenótipo peculiar no micélio, crescimento lento, seguido pelo desenvolvimento de setores de crescimento mais rápido, formados por micélios muito finos com acentuada ramificação hifálica, típica do crescimento invasivo.

Alvin et al. (2009) propuseram que a troca de fase biotrófica para necrotrófica em *M. perniciosa* estava relacionada com o nível de ROS nos tecidos e processo de autofagia. Isso mostra que a proposta de Thomazella et al. (2012) e Barau et al. (2015) são complementares. Além disso, Ceita et al. (2007) propõem que o acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nos tecidos infectados por *M. perniciosa* pode estar envolvido na morte celular na fase de transição. Plantas suscetíveis apresentam maior acúmulo desses cristais.

Barau et al. (2015) enfatizam que a expressão de *MpNEP2* no início da senescência, ativada pela falta de carbono no fluido apoplástico, é muito vantajosa para as hifas extracelulares de *M. perniciosa*, pois isso dá acesso rapidamente aos tecidos ricos em carbono e nitrogênio. Além disso, a aceleração da necrose do tecido infectado pela atividade de *MpNEP2* pode prevenir duas importantes características da senescência tardia: remobilização de carboidratos pela planta e abscisão dos tecidos mortos. O fato dos galhos e frutos mortos permanecerem fixos à planta é vantajoso para o patógeno, pois evita a competição com outros microrganismos que habitam a serrapilheira da floresta, adicionalmente, a altura dos basidiomas pode aumentar a dispersão de esporos.

Na fase necrotrófica, que ocorre após a morte dos tecidos infectados nas chamadas vassouras secas ou frutos secos, o crescimento do micélio é intracelular e abundante e as hifas são sexuadas, dicarióticas e apresentam grampos de conexões (Purdy; Schmidt, 1996).

Estudos moleculares relacionados à doença VB em cupuaçuzeiro

Existe pouca informação disponível para cupuaçu nos bancos de dados de sequências gênicas. No NCBI [Centro Nacional de Informação Biotecnológica⁵], até janeiro de 2023, foram depositadas sequências dos genes WRKY, inibidor de tripsina, vicilina e um ribossomal (Kuhn et al., 2010), sequência parcial do genoma do cloroplasto (Niu et al., 2019) e o genoma mitocondrial (Abreu et al., 2023).

Devido ao potencial de uso de *T. grandiflorum* em estudos de genômica comparativa com cacau e a possibilidade de geração de híbridos interespecies (cacau-cupuaçu), Kuhn et al. (2010) avaliaram o uso de marcadores microssatélites, SSCP (Single-strand conformational polymorphism) e SNPs (single nucleotide polymorphism) desenvolvidos para cacau nas análises de genótipos de *T. grandiflorum* e híbridos interespecies. As avaliações em *T. grandiflorum* desses marcadores genéticos, baseados em PCR, mostraram que a similaridade de sequência entre *T. grandiflorum* e *T. cacao* é alta, o que se refletiu no sucesso da amplificação de quase todos os marcadores de cacau em cupuaçu. Vinte e seis de 30 microssatélites (87%) foram amplificados. Foi demonstrado que os marcadores SSCP desenvolvidos para cacau e usados para analisar *T. grandiflorum* são mais sensíveis que os microssatélites de cacau na identificação de diferenças espécie-específicas, embora não sejam amplamente utilizados devido a restrições técnicas. Observaram que marcadores SNPs projetados para *T. cacao* não foram úteis para estimar a diversidade em *T. grandiflorum*. Identificaram SNPs intra-específicos que podem ser usados para avaliar a heterozigosidade em *T. grandiflorum* e SNPs específicos da espécie que ajudarão na caracterização de híbridos interespecies (Kuhn et al. 2010).

Estudos moleculares mostraram que, assim como as outras espécies do gênero *Theobroma*, *T. grandiflorum* apresenta $2n = 20$

⁵ Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

cromossomos. Neste mesmo estudo, EST-SSRs (*Expressed Sequence Tags - Simple Sequence Repeats*) desenvolvidos para cacau se mostraram úteis para cupuaçu (Silva et al., 2017).

A partir do uso combinado de genotipagem de alto rendimento por sequenciamento (*Genotyping by Sequencing - GBS*) e do genoma de referência de uma espécie relacionada, *T. cacao*, foi desenvolvido um grande conjunto de marcadores SNPs para *T. grandiflorum* de uma população biparental (clones 174 × 1074, resistente e suscetível a *M. perniciosa*, respectivamente). A partir disso, foi possível construir o primeiro mapa genético de alta densidade, compreendendo 1.438 marcadores SNPs e 10 SSRs (Mournet et al., 2020). A análise da sintenia entre *T. cacao* e *T. grandiflorum* mostrou que a homologia média entre os grupos de ligação das duas espécies foi de 97,2%. O mapa genético permitiu a detecção e caracterização de um QTL (*Quantitative Trait Loci*) de resistência a VB, a partir de observações no cruzamento 174 × 1074, que foi identificado no cromossomo 6 do pai resistente 174 no marcador 6M1252980. Os dados fenotípicos associados a esse QTL corresponderam a observações após infecção natural e artificial com *M. perniciosa* nas duas espécies. O gene *TgPR3*, potencialmente envolvido na resposta a VB em cupuaçu (Santana Silva et al., 2020) foi colocalizado nesse QTL (Mournet et al., 2020).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de um banco de sequências de transcritos de *T. grandiflorum* gerado a partir do sequenciamento do transcrito de: i) frutos de cupuaçuzeiro; ii) tecidos meristemáticos retirados de mudas e iii) gemas apicais de pontas de ramos (0,5 cm) de árvores de 3 anos (clones 174 e 1074). Os dados desse banco de sequências estão sendo utilizados para diversos estudos moleculares realizados pela equipe composta por membros da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília), Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - Bahia e Pará), UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz - Bahia) e Cirad (Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agrônômica para o Desenvolvimento - França).

A partir das sequências de RNAs de frutos, foram desenvolvidos os primeiros marcadores moleculares EST-SSR (microsatélites de

ESTs) de *T. grandiflorum* (Santos et al., 2016a). Em outro trabalho, foram identificados e selecionados genes que podem ser utilizados como normalizadores em estudos de expressão de genes em polpa e sementes de cupuaçu (Santos et al., 2016b). Santana Silva e colaboradores (2020) estudaram a função dos genes que codificam para proteínas responsivas a patogêneses, TgPR3, TgPR5 e TgPR8, que estavam altamente expressas no genótipo resistente nos estágios iniciais da infecção. Os dados desse trabalho sugerem que essas TgPRs estão envolvidas no reconhecimento de mecanismos do sistema imunológico inato da planta por meio de receptores de quitina. Além disso, sugerem um possível papel de quitinase/quitosanase para o TgPR5/osmotina (Santana Silva et al., 2020).

Santos et al. (2022) fizeram análises de expressão e interatoma de genes que estão envolvidos na qualidade e/ou resistência de frutos, as quais permitiram identificar vários mecanismos moleculares e fisiológicos associados a esses processos vegetais. Adicionalmente, identificaram genes (*TgSTP1*, *TgWRKY33*, *TgCZF1* e *TgUBA1* em cupuaçu e os ortólogos de *DIN10*, *CNI1* e *TET8*) que podem ser bons candidatos para seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento com foco tanto na qualidade dos frutos, quanto na resistência/tolerância a estresses bióticos e abióticos.

Nessa linha de pesquisa, Falcão et al. (2022) realizaram um estudo em larga escala dos perfis transcritômicos de meristemas apicais de cupuaçuzeiro GR (clone 174) e GS (clone 1074), na fase inicial da infecção com *M. perniciosa* (24 e 48 hai). Usando a tecnologia RNA-seq, 21.441 unigenes foram identificados, sendo 440 genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as diferentes condições. Foram encontrados 301 DEGs entre os genótipos. A alteração da expressão gênica foi mais precoce no GS (24 HAI), enquanto que no GR, a alteração foi mais proeminente às 48 hai. Alguns genes potencialmente envolvidos nos mecanismos de defesa foram identificados: receptores de reconhecimento de padrões (PRRs); fatores de transcrição; proteínas relacionadas à patogênese (PRs); proteínas relacionadas ao remodelamento da parede celular; genes relacionados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e vias de terpenos. Além

disso, observou-se uma influência hormonal significativa nas respostas dos genótipos, os quais diferiram principalmente em relação às respostas de auxina, citocinina, ácido salicílico e brassinosteróides (Falcão et al. 2022). Iniciou-se, então, uma avaliação da função de alguns genes em plantas transgênicas (Tomate Micro-Tom), entre eles: *TgERF9* (fator de transcrição); *TgTPL1* e *TgPR10.1* (genes do tipo *PR*). Esse último foi avaliado por hibridização *in situ* para localização de transcritos nos tecidos da gema apical de cupuaçuzeiro. Identificou-se a expressão do *TgPR10.1* nos tricomas, no procâmbio, no meristema e nas células da epiderme dos primórdios foliares (Falcão, 2023).

Apesar de esforços recentes de um conjunto de instituições (Embrapa, Ceplac, UESC, Cirad, USP), o cupuaçuzeiro ainda carece de informações que possibilitem o desenvolvimento de ferramentas moleculares que acelerem os procedimentos de seleção e dinamizem o programa de melhoramento da espécie, aliando economia de tempo com redução dos custos de pesquisa. A falta de informação ocorre tanto do ponto de vista de genética molecular (envolvendo marcadores) quanto de dados ômicos, fazendo-se necessário: i) ampliar o conhecimento a respeito das associações entre características genômicas e fenotípicas; ii) gerar dados ômicos em grande quantidade, por RNAseq e sequenciamento de pequenos RNAs (microRNAs e siRNAs); iii) avaliar funcionalmente os genes identificados e; iv) identificar moléculas bioativas que possam ser utilizadas no controle de *M. perniciosa*.

Referências

ABREU, V. A. C. de; MOYSÉS ALVES, R.; SILVA, S. R.; FERRO, J. A.; DOMINGUES, D. S.; MIRANDA, V. F. O.; VARANI, A. M. Comparative analyses of *Theobroma cacao* and *T. grandiflorum* mitogenomes reveal

conserved gene content embedded within complex and plastic structures. **Gene**, v. 849, 146904, 2023.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v. 97, p. 1012–1022, 2005.

ALMEIDA, O. F.; ALVES, R. M.; OLIVEIRA, H. O.; FERNANDES, J. R. Q. Concorrência promovida pelo taperebazeiro sobre o cupuaçuzeiro, em sistema agroflorestal. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2., 2014, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

ALVES, J. L. F.; SILVA, J. C. G. da; MUMBACH, G. D.; DOMENICO, M. di; BOLZAN, A.; MACHADO, R. A. F.; MARANGONI, C. Evaluating the bioenergy potential of cupuassu shell through pyrolysis kinetics, thermodynamic parameters of activation, and evolved gas analysis with TG/FTIR technique. **Thermochemica Acta**, v. 711, 179187, 2022.

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S. **Cultivares clonais de cupuaçuzeiro recomendadas para o estado do Pará**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 313).

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S.; ALVES, R. S.; SANTOS, T. G. dos; ARAÚJO, D. G. de; RESENDE, M. D. V. de. Cupuassu tree genotype selection for an agroforestry system environment in the Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 56, p. 1-10, 2021.

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S.; BASTOS, A. J. R. Viability of the use of African mahogany with cupuassu tree in agroforestry system (Afs). **Revista Árvore**, v. 44, e4407, 2020.

ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S.; NEGRÃO, L. M. V. Viabilidade técnica do uso de *Swietenia macrophylla* e *Theobroma grandiflorum* em sistema agroflorestal. **Ciência Florestal**, v. 32, n. 2, p. 617-636, 2022.

ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos sócioeconômicos do cupuaçuzeiro na amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. de (org.). **Mercado cadeia produtiva e**

desenvolvimento rural na Amazônia. Belém, PA: UFRA, 2014. Cap. 8, p. 197-223.

ALVES, R. M.; SEBBENN, A. M.; ARTERO, A. S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 3, n. 4, p. 289-298, 2007.

ALVES, R. M.; SILVA, C. R. de S.; ALBUQUERQUE, P. S. B. de; SANTOS, V. S. dos. Phenotypic and genotypic characterization and compatibility among genotypes to select elite clones of cupuassu. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 3, p. 175-184, 2017.

ALVES, R. M.; SILVA, C. R. de S.; SILVA, M. S. da C.; SILVA, D. C. de S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 818-828, 2013.

ALVIM, F. C.; MATTOS, E. M.; PIROVANI, C. P.; GRAMACHO, K.; PUNGARTNIK, C.; BRENDEL, M.; CASCARDO, J. C. M.; VINCENTZ, M. Carbon source-induced changes in the physiology of the cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes) affect mycelial morphology and secretion of necrosis-inducing proteins. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1035-1050, 2009.

ANDRADE, J. K. S.; BARROS, R. G. C.; PEREIRA, U. C.; GUALBERTO, N. C.; OLIVEIRA, C. S. de; SHANMUGAM, S.; NARAIN, N. α -Amylase inhibition, cytotoxicity and influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds in the peel and seed of *Theobroma grandiflorum*. **Food Chemistry**, v. 373, 131494, 2022.

ASSMANN, C. E.; WEIS, G. C. C.; ROSA, J. R. da; BONADIMAN, B. da S. R.; ALVES, A. de O.; SCHETINGER, M. R. C.; RIBEIRO, E. E.; MORSCH, V. M. M.; CRUZ, I. B. M. da. Amazon-derived nutraceuticals: promises to mitigate chronic inflammatory states and neuroinflammation. **Neurochemistry International**, v. 148, 105085, 2021.

BARAU, J.; GRANDIS, A.; CARVALHO, V. M. D. A.; TEIXEIRA, G. S.; ZAPAROLI, G. H. A.; RIO, M. C. S. do; RINCONES, J.; BUCKERIDGE, M. S.; PEREIRA, G. A. G. Apoplastic and intracellular plant sugars regulate

developmental transitions in witches' broom disease of cacao. **Journal of Experimental Botany**, n. 66, p. 1325-1337, 2015.

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. **Plant Pathology**, v. 34, p. 306-312, 1985.

CALZAVARA, B.; MULLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. da C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1984. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 32).

CEITA, G. de O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A. da S.; MICHELI, F.; MARIANO, A. C.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. da C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. de M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Monilophthora perniciosa*. **Plant Science**, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.

CLOUGH, Y.; FAUST, H.; TSCHARNTKE, T. Cacao boom and bust: sustainability of agroforests and opportunities for biodiversity conservation. **Conservation Letters**, v. 2, p. 197-205, 2009.

COHEN, K. D. O.; MATTIETTO, R.; JACKIX, M. D. N. H. **Processo de torração das amêndoas e Nibs de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 35).

COSTA, C. M. da; SILVA, K. A. da; SANTOS, I. L.; YAMAGUCHI, K. K. de L. Aproveitamento integral do cupuaçu na área de panificação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, e34711528176, 2022.

COSTA, J. L.; PASCHOAL, D.; SILVA, E. M. da; SILVA, J. S.; CARMO, R. M. do; CARRERA, E.; LÓPEZ-DÍAS, I.; ROSSI, M. L.; FRESCHI, L.; MIECZKOWSKI, P.; PERES, L. R. P.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; FIGUEIRA, A. *Monilophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao, interferes with cytokinin metabolism during infection of Micro-Tom tomato and promotes symptom development. **New Phytologist**, v. 231, n. 1, p. 365-381, 2021.

COSTA, M. P.; ROSARIO, A. I. L. S.; SILVA, V. L. M.; VIEIRA, C. P.; CONTE, C. A. Rheological, physical and sensory evaluation of low-fat Cupuassu goat milk yogurts supplemented with fat replacer. **Food Science of Animal Resources**, v. 42, p. 210-224, 2022.

CRUZ JUNIOR, O. F.; CAMPELLO, I.; MIRIAN, G.; JAROSŁAW, E. C.; JOAQUÍN, S.; ALBERO, S. Enhanced CO₂ capture by cupuassu shell-derived activated carbon with high microporous volume. **Carbon Letters**, v. 33, p. 727-735, 2023.

CUATRECASAS, J. A. Cocoa and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **United States National Herbarium**, v. 35, n. 6, p. 32-46, 1964.

DE OLIVEIRA, B. V.; TEIXEIRA, G. S.; REIS, O.; BARAU, J. G.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; DO RIO, M. C. S.; DOMINGUES, R.; R.; MEINHARDT, L. W.; PAES LEME, A. F.; RINCONES, J.; PEREIRA, G. A. G. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 11, p. 922-932, 2012.

DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. **Boletim Técnico**, IAN, Belém, n. 28, p. 3-20, 1953.

DUCKE, A. Plantas de cultura precolombiana na Amazônia brasileira. Notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. **Boletim Técnico**, IAN, Belém, n. 8, 1946.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, p. 515-523, 1980.

FALCÃO L.L. **Genômica funcional da interação cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura de bruxa**. 2023. 127 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) — Universidade de Brasília, Brasília.

FALCÃO, L. L.; SILVA-WERNECK, J. O.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ALVES, R. M.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; BRIGIDO, M. M.; MARCELLINO, L. H. Comparative transcriptomics of cupuassu

(*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease.

Journal of Plant Interactions, v. 17, n. 1, p. 991-1005, 2022.

GARCIA, O.; MACEDO, J. A. N.; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M. C.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A.; MARIANO, A. C.; SCHIAVINATO, M. A.; MEDRANO, F. J.; MEINHARDT, L. W.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C. M. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*.

Mycology Research, v. 111, n. 4, p. 443-455, 2007.

HENDERSHOT, L. M. The ER function BiP is a master regulator of ER function. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 71, p. 289-297, 2004.

JEAN-MARIE, E.; JIANG, W.; BEREAU, D.; ROBINSON, J. C. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. **Foods**, v. 11, n. 24, 3966, 2022.

KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 238-244, 2007.

KILARU, A.; HASENSTEIN, K. H. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosa* on interaction with cacao leaves.

Phytopathology, v. 95, p. 101-107, 2005.

KUHN, D. N.; FIGUEIRA, A.; LOPES, U.; MOTAMAYOR, J. C.; MEEROW, A. W.; CARIAGA, K.; FREEMAN, B.; LIVINGSTONE, D. S.; SCHNELL, R. J. Evaluating *Theobroma grandiflorum* for comparative genomic studies with *Theobroma cacao*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 783-792, 2010.

LITHOLDO, C. G.; LEAL, G. A.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; FIGUEIRA, A. Differential expression of jasmonate biosynthesis genes in cacao genotypes contrasting for resistance against *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 1747-1759, 2015.

MARES, J. H.; GRAMACHO, K. P.; SANTANA, J. O.; OLIVEIRA DE SOUZA, A.; ALVIM, F. C.; PIROVANI, C. P. Hydrosoluble phylloplane components of *Theobroma cacao* modulate the metabolism of *Moniliophthora perniciosa* spores during germination. **Fungal Biology**, v. 124, p. 73-81, 2020.

MARES, J. H.; GRAMACHO, K. P.; SANTOS, E. C. dos; SANTIAGO, A. da S.; SILVA, E. M. de A.; ALVIM, F. C.; PIROVANI, C. P. Protein profile and protein interaction network of *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. **BMC Microbiology**, v. 16, 120, 2016.

MEINHARDT, L. W.; RINCONES, J.; BAILEY, B. A.; AIME, M. C.; GRIFFITH, G. W.; ZHANG, D.; PEREIRA, G. A. G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: What's new from this old foe? **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 577-588, 2008.

MONDEGO, J. M. C.; CARAZZOLLE, M. F.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; PARIZZI, L. P.; RINCONES, J.; COTOMACCI, C.; CARRARO, D. M.; CUNHA, A. F.; CARRER, H.; VIDAL, R. O.; ESTRELA, R. C.; GARCIA, O.; THOMAZELLA, D. P. T.; OLIVEIRA, B. V.de; PIRES, A. B. L.; RIO, M. C. S.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, M. H. de; CASTRO, L. A. B.; GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, M. S.; MOURA NETO, J. P.; GÓES NETO, A.; BARBOSA, L. V.; GUILTINAN, M. J.; BAILEY, B. A.; MEINHARDT, L. W.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' broom disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, 548, 2008.

MOURNET, P.; DE ALBUQUERQUE, P. S. B.; ALVES, R. M.; SILVA-WERNECK, J. O.; RIVALLAN, R.; MARCELLINO, L. H.; CLÉMENT, D. A reference high-density genetic map of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) and QTL detection for resistance to witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 16, n. 6, 89, 2020.

NAZARE, R. F. R. de; BARBOSA, W. C.; VIEGAS, R. M. F. **Processamento das sementes de cupuaçu para a obtenção de cupulate**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1990. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 108).

NIU, Y.-F., NI, S.-B.; LIU, J. The complete chloroplast genome of *Theobroma grandiflorum*, an important tropical crop. **Mitochondrial DNA: Part B Resources**, v. 4, n. 2, p. 4157-4158, 2019.

PEREIRA, A. L. F.; FEITOSA, W. S. C.; ABREU, V. K. G.; LEMOS, T. de O.; GOMES, W. F.; NARAIN, N.; RODRIGUES, S. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, p. 603-611, 2017.

PUGLIESE, A. G.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TRUCHADO, P.; GENOVESE, M. I. Flavonoids, Proanthocyanidins, vitamin C, and antioxidant activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) pulp and seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2720-2728, 2013.

PURDY, L.; SCHMIDT, R. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573-594, 1996.

RAMOS, S. de N. M.; GLEZER, J. W.; GARCIA, A. de O.; BEHRENS, J. H.; EFRAIM, P. Cupuassu from bean to bar: sensory and hedonic characterization of a chocolate-like product. **Food Research International**, v. 155, 111039, 2022.

ROCHA, J.; LAPS, R. R.; MACHADO, C. G.; CAMPIOLO, S. The conservation value of cacao agroforestry for bird functional diversity in tropical agricultural landscapes. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 14, p. 7903-7913, 2019.

SANTANA SILVA, R. J.; ALVES, R. M.; PERES GRAMACHO, K.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Involvement of structurally distinct cupuassu chitinases and osmotin in plant resistance to the fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 142-151, 2020.

SANTOS, E. C. S. dos; SOUZA, R. C. R.; SEYE, O.; LAU, J.; FREITAS, K. T. de. Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia. **Encontro de Energia no Meio Rural**, ano 5, 2004.

SANTOS, L. F. dos; FREGAPANI, R. M.; FALCÃO, L. L.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; LOPES, U. V.; PERES GRAMACHO, K.; ALVES, R. M.; MICHELI, F.; MARCELLINO, L. H.; PANG, X. First microsatellite markers developed from cupuassu ESTs: application in diversity analysis and cross-species transferability to cacao. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0151074, 2016a.

SANTOS, L. F. dos; SANTANA SILVA, R. J.; FALCÃO, L. L.; ALVES, R. M.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum* [Willd. ex Sprengel] Schumann) fruit development: key genes involved in primary metabolism and stress response. **Agronomy**, v. 12, n. 4, 763, 2022.

SANTOS, L. F. dos; SANTANA SILVA, R. J.; AMARAL, D. O. J. do; BARBOSA DE PAULA, M. F.; FALCÃO, L. L.; LEGAVRE, T.; ALVES, R. M.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Selection of reference genes for expression study in pulp and seeds of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. **PLoS One**, v. 11, n. 8, e0160646, 2016b.

SENA, K.; ALEMANNI, L.; GRAMACHO, K. P. The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1272-1281, 2014.

SILVA, G. M. da; MOREIRA, R. J. de A.; CÂNDIDO, J. E.; SILVA, I. R. da; MORAIS, B. A. de; GOUVEIA, M. J.; LEITE, T. C. C.; SENA, A. R. de. Obtenção de farinhas das cascas de cupuaçu e pitomba: análise bromatológica e fitoquímica. In: OLIVEIRA, R. J. de (org.). **Extensão rural: práticas e pesquisas para o fortalecimento da agricultura familiar**. Guarujá, SP: Científica, 2021. v. 1, p. 431-449.

SILVA, R. A. da; SOUZA, G.; LEMOS, L. S. L.; LOPES, U. V.; PATROCÍNIO, N. G. R. B.; ALVES, R. M.; MARCELLINO, L. H.; CLEMENT, D.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. K. P. Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus *Theobroma* L. (Byttnerioideae, Malvaceae). **PLoS One**, v. 12, n. 2, e0170799, 2017.

SILVA, S. D. V. M.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O. C. de; GRAMACHO, K. P.; BEZERRA, J. L. Redescricao da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauero. **Agrotropica**, v. 14, n. 1, p. 1-24, 2002.

SOUZA, A. das G. C. de; ALVES, R. M.; SOUZA, M. G. de. **Theobroma grandiflorum cupuaçuzeiro**. [Buenos Aires]: IICA/PROCISUR, 2017.

TEIXEIRA, J. P. L.; THOMAZELLA, P. de T.; PEREIRA, G. A. G. Time for chocolate: current understanding and new perspectives on cacao witches' broom disease research. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, 2015.

TEIXEIRA, P. J. P. L.; TOLEDO THOMAZELLA, D. P. de; REIS, O.; DO PRADO, P. F. V.; DO RIO, M. C. S.; FIORIN, G. L.; JOSÉ, J.; COSTA, G. G. L.; NEGRI, V. A.; MONDEGO, J. M. C.; MIECZKOWSKI, P.; PEREIRA, G. A. G. High-resolution transcript profiling of the atypical biotrophic interaction between *Theobroma cacao* and the fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Cell**, v. 26, n. 11, p. 4245-4269, 2014.

THOMAZELLA, D. P. T.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; OLIVEIRA, H. C.; SAVIANI, E. E.; RINCONES, J.; TONI, I. M.; REIS, O.; GARCIA, O.; MEINHARDT, L. W.; SALGADO, I.; PEREIRA, G. A. G. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. **New Phytologist**, v. 194, n. 4, p. 1025-1034, 2012.

WADE, A. S. I.; ASASE, A.; HADLEY, P.; MASON, J.; OFORI-FRIMPONG, K.; PREECE, D.; SPRING, N.; NORRIS, K. Management strategies for maximizing carbon storage and tree species diversity in cocoa-growing landscapes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 138, n. 3, p. 324-334, 2010.

WEMHEUER, F.; BERKELMANN, D.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; VIDAL, S.; DAGHELA, H. B. B. Agroforestry management systems drive the composition, diversity, and function of fungal and bacterial endophyte communities in *Theobroma cacao* leaves. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, 405, 2020.

ZAPAROLI, G.; CABRERA, O. G.; MEDRANO, F. J.; TIBURCIO, R.; LACERDA, G.; PEREIRA, G. G. Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. **Mycological Research**, v. 113, p. 61-72, 2009.

