

**UTILIZAÇÃO DA SEIVA PARA  
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA  
DE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO  
À VASSOURA-DE-BRUXA**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Dante Daniel Giacomelli Scolari  
Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha  
José Roberto Rodrigues Peres

Chefia da Embrapa Amazônia Oriental

Emanuel Adilson Souza Serrão - Chefe Geral  
Jorge Alberto Gazel Yared - Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Antonio Carlos Paula Neves da Rocha - Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio  
Antonio Ronaldo Teixeira Jatene - Chefe Adjunto de Administração

**UTILIZAÇÃO DA SEIVA PARA  
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA  
DE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO  
À VASSOURA-DE-BRUXA**

Cleber N. Bastos  
Ruth Linda Benchimol  
Rafael Moyses Alves



Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (91) 276-6653, 276-6333

Fax: (91) 276-9845

e-mail: cpatuacpatu.embrapa.br

Caixa Postal, 48

66095-100 - Belém, PA

Tiragem: 200 exemplares

#### Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira - Presidente

Antonio de Brito Silva

Antonio Pedro da S. Souza Filho

Expedito Ubirajara Peixoto Galvão

Joaquim Ivanir Gomes

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Maria de N. M. dos Santos - Secretária Executiva

#### Revisores Técnicos

Fernando Carneiro de Albuquerque - Embrapa Amazônia Oriental

Hércules Martins e Silva - Embrapa Amazônia Oriental

Luiz Sebastião Poltronieri - Embrapa Amazônia Oriental

Maria de Lourdes Reis Duarte - Embrapa Amazônia Oriental

#### Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira

Normalização: Célia Maria Lopes Pereira

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Moacyr Bernardino Dias Filho (texto em Inglês)

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

**BASTOS, C.N.; BENCHIMOL, R.L.; ALVES, R.M. Utilização da seiva para avaliação da resistência de clones de cupuaçuzeiro à vassoura-de-bruxa.**

Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 14p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa, 4).

ISSN 1517-2228

1. Cupuaçu - Resistência à doenças - Avaliação. 2. Método da seiva.  
3. Vassoura-de-bruxa. 4. Etapa de desenvolvimento do fungo.  
I. Benchimol, R.L., colab. II. Alves, R.M., colab. III. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). IV. Título.  
V. Série.

CDD: 634.65

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
MATERIAL E MÉTODOS .....	7
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	9
CONCLUSÃO.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

# UTILIZAÇÃO DA SEIVA PARA AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CLONES DE CUPUAÇUZEIRO À VASSOURA-DE-BRUXA

Cleber N. Bastos<sup>1</sup>  
Ruth Linda Benchimol<sup>2</sup>  
Rafael Moysés Alves<sup>3</sup>

**RESUMO:** O método da seiva, utilizado para avaliar a resistência do cacaueteiro (*Theobroma cacao*) à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciososa*), foi adaptado para avaliar a resistência a essa doença em clones de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) componentes do Banco Ativo de Germoplasma de Cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, através de bioensaios *in vitro*. Comparações foram feitas com a incidência de vassoura-de-bruxa nos clones em condições de campo. Não houve germinação de basidiósporos na presença da seiva de clones que não manifestaram sintomas de vassoura-de-bruxa no campo. A germinação de basidiósporos e o crescimento micelial do patógeno na presença da seiva de clones susceptíveis foram semelhantes aos tratamentos testemunha. Essa metodologia permite a identificação de plantas resistentes/tolerantes e susceptíveis à *C. perniciososa*, em um período de tempo muito mais curto do que o dispendido em avaliações mediante inoculações artificiais em casa-de-vegetação e no campo.

**Termos para indexação:** *Theobroma grandiflorum*, metodologia, *Crinipellis perniciososa*, seiva, clones resistentes.

<sup>1</sup>Eng.-Agr., Ph.D., CEPLAC-SUPOR, Caixa Postal, 1801, CEP 66635-110, Belém, PA.

<sup>2</sup>Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal, 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

<sup>3</sup>Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

# UTILIZATION OF SAP TO EVALUATE CUPUASSU TREE CLONES RESISTANCE TO WITCHES' BROOM DISEASE

**ABSTRACT:** The sap method, used to evaluate the resistance of cacao tree (*Theobroma cacao*) to witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*), was adapted to detect resistance to that disease in clones of cupuassu tree (*T. grandiflorum*) belonging to Embrapa Eastern Amazonia's Cupuassu Germplasm Collection, in Belém, PA. Comparisons between *in vitro* results and disease incidence in the field were made. No basidiospore germination was detected in the presence of the sap of those clones that have not been developing witches' broom in the field. Basidiospore germination and mycelial growth of the pathogen in the presence of sap from susceptible clones were the same of the observed in the control treatment. This method allows the identification of *C. perniciosa* tolerant/resistant plants in a shorter period than conventional methods which use artificial inoculations in the greenhouse and in the field.

**Index terms:** *Theobroma grandiflorum*, method, *Crinipellis perniciosa*, sap, resistant clones.

## INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) é uma das fruteiras mais populares da Amazônia. De comprovado potencial econômico, vem conquistando mercado em outras regiões do país e no exterior, devido ao exótico sabor da polpa de seus frutos, largamente utilizada na fabricação de sorvetes, sucos, compotas, geléia, licor, iogurte e doces (Calzavara et al. 1984).

A Embrapa, através de suas unidades localizadas na região amazônica, vem desenvolvendo trabalhos de conservação e utilização de recursos genéticos de cupuaçuzeiro, visando dispor, a médio prazo, de cultivares com alta produção, boa qualidade de frutos e resistência às principais pragas

e doenças (Alves et al., 1998). Bancos ativos de germoplasma (BAGs) constituídos de material coletado em várias localidades da região amazônica estão sendo mantidos e avaliados na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, para esse fim (Moraes et al., 1994).

Em relação aos problemas fitossanitários, tem sido observado que a doença conhecida como vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, acarreta os principais danos econômicos aos plantios da região (Alves et al., 1998). Tentativas de controle da doença vêm sendo feitas através da poda fitossanitária, que consiste na remoção dos ramos afetados pela doença. Essa prática, contudo, além de ser onerosa, não reflete em redução aparente no índice de doença no plantio, devido ao alto porte atingido pelas plantas, o que dificulta sua execução (Yoneyama et al., 1997).

A longo prazo, a utilização de clones resistentes é uma alternativa a ser considerada no controle da vassoura-de-bruxa (Alves et al., 1997). Todavia, a utilização efetiva dessa estratégia depende do desenvolvimento de métodos adequados de avaliação para o *screening* de coleções de germoplasma.

O objetivo deste trabalho foi testar o método da seiva na detecção da resistência de clones de cupuaçuzeiro a *C. pernicioso*, com base no efeito da seiva desses clones na germinação *in vitro* de basidiósporos e no crescimento micelial do patógeno.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em clones componentes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental (01°28' S; 48°27' W), e no Laboratório de Fitopatologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/SUPOR, em Belém, PA.



Para a avaliação da incidência de vassoura-de-bruxa no campo, foram utilizados dez clones de cupuaçuzeiro, sendo cada um representado por cinco plantas com idade média de dez anos, dispostas no espaçamento de 6,0m x 5,0m. Foi registrado o número de vassouras vegetativas por planta, no período de 1995 a 1996.

A extração da seiva foi feita na primeira quinzena de junho de 1998, com base na metodologia descrita por Bastos et al. (1996), em cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). Orifícios com 0,8 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade foram feitos no tronco das plantas com o auxílio de um vazador de rolhas. Em cada orifício, foi introduzida uma mangueira de látex de mesmo diâmetro, com 10 cm de comprimento, acoplada a um frasco de 10 ml através de um orifício na tampa enroscada e hermeticamente vedada com massa de modelar. O conjunto foi fixado ao tronco da planta com o auxílio de massa de modelar fortemente pressionada à casca do cupuaçuzeiro, para evitar a entrada de água da chuva. Após 48 horas, os frascos foram coletados e seu conteúdo passado em papel de filtro Whatman nº 1 e em filtro milipore (0,45µ). A seguir, foram armazenadas em refrigerador (5 °C) até a realização dos bioensaios.

Para os testes de germinação, foram obtidos, segundo Evans (1978), basidiósporos de *C. pernicioso* de vassouras coletadas no BAG da Embrapa Amazônia Oriental e na Estação de Recursos Genéticos do Cacau, em área da Ceplac, em Benevides, PA. Alíquotas de 20µl de seiva diluídas em 100µl de água destilada esterilizada foram pipetadas em lâminas escavadas, em três repetições, as quais foram colocadas no interior de placas de petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada. Em cada uma das lâminas foi colocado um pequeno bloco de ágar-água contendo basidiósporos recém-liberados, após o que estas foram incubadas a 25 °C, por 24 horas. No tratamento testemunha, utilizou-se água destilada esterilizada.

Após o período de incubação, procedeu-se a contagem dos basidiósporos germinados, com auxílio de microscópio binocular (40x) e calculou-se a percentagem de germinação, em relação à testemunha. Foram contados 100 basidiósporos por lâmina, sendo considerados germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo, independente do seu comprimento.

No teste de inibição do crescimento micelial do patógeno, foram adicionadas, após a autoclavagem, amostras de seiva a 1% (v/v) ao meio de Extrato de malte-Ágar (EMA) fundente (45 a 50°C), o qual foi vertido em placas de petri com 5cm de diâmetro, em quatro repetições por amostra. Placas contendo apenas EMA foram utilizadas como testemunha. Em seguida, no centro de cada placa, foi depositado um disco de micélio de *C. pernicioso* com 0,5 cm de diâmetro, retirado das bordas de colônias com dez dias de idade, cultivadas em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA). As placas inoculadas foram incubadas por seis dias em incubadora BOD, a 25 °C, no escuro, após o que foi medido o diâmetro das colônias desenvolvidas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à incidência de vassouras no campo, a comparação de médias de vassouras vegetativas formadas nos ramos revelou existir diferença entre clones para o carácter resistência à vassoura-de-bruxa (Tabela 1). Os clones 618, 622 e 624 apresentaram níveis muito baixos de incidência de vassoura, variando entre 0,4 e 1,8 vassouras, em média, por planta, quando comparados com os clones 12 e 184, que apresentaram valores superiores a 35,4 vassouras por planta. Entre os clones avaliados, os clones 174, 186, 215, 220 e 286 ainda mantêm-se livres de vassouras (Tabela 1). Avaliações feitas por Alves et al. (1997) no BAG da Embrapa Amazônia Oriental revelaram que, em função do acúmulo de fonte de inóculo no decorrer dos anos, houve clones com 69,8 vassouras, em média, por planta, tendo sido detectadas 349 vassouras em uma única planta.

TABELA 1. Emissão de vassouras vegetativas em clones de cupuaçuzeiro plantados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA.

Clone	Nº de vassouras*
12	123,6 a**
184	114,0 a
622	3,8 b
624	3,4 b
618	1,2 b
220	0,0 b
286	0,0 b
215	0,0 b
186	0,0 b
174	0,0 b

\*Média de cinco repetições.

\*\*Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Nos bioensaios *in vitro*, verificou-se que a seiva extraída do floema de troncos dos clones de cupuaçuzeiro exibiu inibição diferencial na germinação de basidiósporos e no crescimento micelial de *C. pernicioso*. A germinação de basidiósporos foi 100% inibida no meio contendo seiva dos clones 174, 186, 215, 220 e 286 (Tabela 2). Não foi observada diferença entre a testemunha e os tratamentos com seiva dos clones 184, 12 e 624, para os mesmos parâmetros (Tabelas 2 e 3). Na presença de seivas dos clones 622 e 618, foi observada a germinação de poucos basidiósporos, com os mesmos formando tubos germinativos curtos, enquanto que na seiva do clone 624, a germinação foi mais alta e os tubos germinativos finos e compridos.

TABELA 2. Percentagem de germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* na presença de seiva de clones de cupuaçuzeiro, após 24h de incubação.

Clone	Germinação (%)*
Testemunha	85,0 a
12	81,1 a
184	72,9 b
624	39,2 c
622	23,3 d
618	14,2 e
186	0 f
215	0 f
174	0 f
220	0 f
286	0 f

\*Média de quatro repetições.

\*\*Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Dados originais transformados para arco seno  $x/100$ ).

TABELA 3. Efeito da seiva de clones de cupuaçuzeiro sobre o crescimento micelial de *Crinipellis pernicioso*.

Clone	Crescimento micelial (mm)*
Testemunha	36 a
184	31,7 b
12	30,0 b
624	26,7 c
286	22,0 d
215	22,0 d
618	22,0 d
220	22,0 d
186	19,7 e
174	17,0 f
622	14,0 g

\*Média de quatro repetições.

\*\*Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Efeitos inibitórios de extratos de folhas e lançamentos jovens de cacauero têm sido associados à presença de compostos antifúngicos (Evans & Bastos, 1980; Bownlee et al., 1990). Compostos antifúngicos também têm sido constatados em fluídos do xilema de plantas de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) resistentes à murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeides* (Mepsted et al., 1995).

Bastos (1996) verificou que seivas extraídas de troncos de cacaueros resistentes à vassoura-de-bruxa causaram inibição na germinação de basidiósporos de *C. pernicioso*, detectando correlação positiva entre as observações de campo e os bioensaios *in vitro*. Comparações entre os dados de campo e os testes de germinação *in vitro* detectaram alta correlação entre as plantas de cupuaçuzeiro sem ou com baixa incidência de vassoura-de-bruxa e a reação de suas respectivas seivas.

## CONCLUSÃO

Em vista dos resultados obtidos, concluiu-se que é viável o emprego do método da seiva para identificar ou distinguir, de modo mais rápido, os clones resistentes/tolerantes daqueles altamente susceptíveis à *C. pernicioso*. Apesar de não oferecer uma solução completa para investigar a resistência do cupuaçuzeiro à vassoura-de-bruxa, a metodologia em foco se constitui em um auxiliar para caracterizar um de seus aspectos, e, juntamente com outros fatores, poderá ser de grande valia na pesquisa que visa o melhoramento genético de materiais a serem fornecidos aos agricultores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.M.; CORREA, J.R.V.; GOMES, M.R.; FERNANDES, G.L.C. Melhoramento genético do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) no estado do Pará. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇÚ, 1., 1996. Belém, PA. **Anais**. Belém: Embrapa-CPATU/JICA, 1997. p.127-146 (Embrapa-CPATU. Documentos, 89).
- ALVES, R.M.; STEIN, R.L.B.; ARAÚJO, D.G.; PIMENTEL, L. Avaliação de clones de cupuaçuzeiro quanto a resistência à vassoura-de-bruxa. **Revista Brasileira Fruticultura**, Cruz das Almas, v.20, n.3, p.297-306. dez. 1998.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FONSECA, S.A. Utilização da seiva de *Theobroma cacao* para avaliação e indução de resistência a *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.389, 1996. Suplemento.
- BROWNLIE, H.E.; McEUEEN, A.R.; HEDGER, J.; SCOTT, I.M. Anti-fungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, p.39-48, 1990.
- CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAWAGE, O.N.C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro. cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém: Embrapa-CPATU, 1984. (Embrapa-CPATU. Documentos, 32).
- EVANS, H.; BASTOS, C.N. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis perniciosa* (witches' broom disease) in cocoa cultivars. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.525-536, 1980.
- EVANS, H. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. **Annals of Applied Biology**, v.89, p.185-192, 1978.

- MEPSTED, R.; FLOOD, J.; PAUL, T.; AIREDE, C.; COOPER, R.M.A. A model system for rapid selection for resistance and investigation of resistance mechanisms in *Fusarium* wilt of oil palm. **Plant Pathology**, v.44, p.749-755. 1995.
- MORAES, V.H.F.; MÜLLER, C.H.; SOUZA, A.G.; ANTONIO, I.G. Native fruit species of economic potential from Brazilian Amazon. **Angewandte Botanik**, v.68, p.47-52, 1994.
- YONEYAMA, S.; NUNES, A.M.L.; DUARTE, M.L.R.; SHIMIZU, O.; ENDO, T.; ALBUQUERQUE, F.C. Controle químico da vassoura-de-bruxa em cupuaçuzeiro. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇÚ, 1., 1996. Belém, PA. **Anais**. Belém: Embrapa-CPATU/JICA, 1997. p.111-117. 1997 (Embrapa-CPATU. Documentos, 89).



---

*Amazônia Oriental*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48,  
Fax (91) 276-9845, Fone (91) 276-6333, CEP 66095-100  
e-mail: [cpatu@cpatu.embrapa.br](mailto:cpatu@cpatu.embrapa.br)*