

# Anais



## VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Ocidental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Anais da VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**

*Regina Caetano Quisen  
Ronaldo Ribeiro de Moraes  
Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue  
Gilvan Ferreira da Silva  
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental  
Manaus, AM  
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Ocidental**

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

**Comitê Local de Publicações**

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*

*José Ricardo Pupo Gonçalves*

*Lucinda Carneiro Garcia*

*Luis Antonio Kioshi Inoue*

*Maria Augusta Abtibol Brito*

*Maria Perpétua Beleza Pereira*

*Paulo César Teixeira*

*Raimundo Nonato Vieira da Cunha*

*Ricardo Lopes*

*Ronaldo Ribeiro de Moraes*

**Revisão de texto:** *Maria Perpétua Beleza Pereira*

**Normalização bibliográfica:** *Maria Augusta Abtibol Brito*

**Diagramação e arte:** *Gleise Maria Teles de Oliveira*

**1ª edição**

**1ª gravação em CD-ROM (2010): 200**

**Todos os direitos reservados.**

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

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Amazônia Ocidental.**

---

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (6. : 2010 : Manaus).

Anais... / editores Regina Caetano Quisen, Ronaldo Ribeiro de Moraes, Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue e Gilvan Ferreira da Silva. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

1 CD-ROM; 4 ¼ pol.

ISBN 978-85-89111-10-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Quisen, Regina Caetano. II. Moraes, Ronaldo Ribeiro de. III. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. IV. Silva, Gilvan Ferreira da. V. Título.

CDD 501

# Isolamento e Conservação de *Moniliophthora perniciosa* Oriunda de Tecidos Infectados de Cupuaçuzeiro

Gilvana Figueira Gualberto  
Maria Geralda de Souza  
Átila de Souza

## Resumo

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, é a principal doença do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), constituindo-se num dos maiores entraves para a expansão da cultura no Estado do Amazonas. A doença é endêmica na região, e a utilização de materiais genéticos resistentes a ela é considerada a solução mais econômica, estável e ambientalmente desejável. A variabilidade genética do patógeno, bem como a ausência de métodos consistentes para a avaliação precoce da resistência das plantas, tem limitado a identificação de novas fontes de resistência e, conseqüentemente, a incorporação de novos genótipos de interesse ao programa de melhoramento. Assim o objetivo deste trabalho foi coletar e armazenar isolados de *M. perniciosa* de tecido infectado de *Theobroma* sp. Obteve-se um total de 17 isolados, sendo 16 do Amazonas e 1 do Acre, dos seguintes hospedeiros: 13 de *Theobroma grandiflorum*; 1 de *Theobroma caçãõ*; 1 de *Theobroma obovatum*; 1 de *Theobroma mariae*; e 1 de *Theobroma subincanum*.

**Termos para indexação:** vassoura-de-bruxa, *Theobroma* sp., biologia molecular.

## Introdução

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, agora denominado *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) (AIME e PHILLIPS-MORA, 2005), é a principal doença do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Wilt ex. Spreng), constituindo-se em um dos maiores entraves para a expansão da cultura no Estado do Amazonas. Trata-se de uma doença endêmica na região amazônica, e as estratégias de controle para a redução do inóculo incluem aplicação de métodos químicos, manejo e poda fitossanitária, que consiste na remoção dos ramos e frutos doentes, entretanto possuem custo elevado em mão de obra (OLIVEIRA et al., 2005; LIMA e SOUZA, 1997).

As informações sobre o controle químico da vassoura-de-bruxa são resultantes de testes realizados em cacaueteiro (BASTOS e EVANS, 1979; BASTOS, 1980), e a utilização de materiais genéticos, resistentes à doença, é considerada a solução mais econômica, estável e ambientalmente desejável (OLIVEIRA et al., 2005). Nesse sentido, o programa de melhoramento do cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Ocidental tem sido direcionado para o aproveitamento imediato da variabilidade genética contida nos ensaios, por meio de seleção de clones que combine alta produtividade e resistência à vassoura-de-bruxa.

A variabilidade do patógeno, bem como a ausência de métodos consistentes para a avaliação precoce da resistência à *M. perniciosa*, tem limitado a identificação de novas fontes de resistência e, conseqüentemente, a incorporação de novos genótipos de interesse ao programa de melhoramento (ANDEBRAHAN et al., 1998). Assim a

determinação da diversidade genética do patógeno é um importante componente na seleção de genótipos resistentes ou tolerantes, os quais poderão ser usados no programa de melhoramento da cultura do cupuaçu. Estudo dessa diversidade genética de isolados pode auxiliar na escolha de regiões com maior diversidade de isolados para serem usados na seleção de plantas resistentes. Portanto é de fundamental importância o conhecimento da diversidade das populações de patógenos. A variação genética entre isolados de *M. perniciosa* de cacaueteiro de várias regiões da Amazônia Brasileira foi estudada por diversos autores (ALMEIDA e ANDEBRAHAN, 1984; BASTOS, 1990; NIELLA et al., 2001), entretanto pouco se sabe a respeito de *M. perniciosa* de cupuaçuzeiro.

Assim, o objetivo deste projeto foi dar continuidade aos trabalhos que visam obter maior número de isolados de *M. perniciosa*, oriundos de algumas regiões da Amazônia.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada no Km 29 da Rodovia AM-010, em Manaus, AM.

### Obtenção e cultivo de isolados de *M. perniciosa*

O fungo foi isolado por métodos de isolamento indireto e direto. No isolamento indireto, os isolados foram obtidos a partir de partes de tecido vegetal infectado (vassoura verde). Após assepsia superficial, fragmentos do material foram colocados em meio BDA + benlate. No isolamento direto, os isolados foram obtidos por meio de esporos liberados de basidiocarpos de *M. perniciosa*. Após

coleta nos vassoueiros e no campo, foi feita a assepsia; os basidiocarpos foram imersos em solução de cloranfenicol a 1% por 1 minuto e lavados, por 3 vezes, em água destilada, posteriormente foram fixados com vaselina na tampa de uma placa de petri, contendo meio ágar-água (AA), onde, após overnight, os esporos foram liberados. Após o desenvolvimento da colônia, o fungo foi repicado para meio BDA, enriquecido com MLGA (1,7 g de extrato de malte, 5 g de extrato de levedura, 50 g de glicerol, 20 g de ágar). Aos 14 dias de crescimento, os isolados foram transferidos para frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido (1,7 g de extrato de malte, 5 g de extrato de levedura, 50 g de glicerol), e submetidos à agitação de 120 rpm por um período de 10 a 14 dias, para obtenção da massa micelial. O micélio foi coletado por filtração, lavado em água destilada, seco com papel toalha e armazenado em freezer para posterior extração do DNA.

### **Obtenção de suspensão e conservação de esporos de *M. pernicioso***

Após coleta dos basidiocarpos nos vassoueiros e no campo, foi feita a assepsia e o procedimento de liberação de esporos como descritos anteriormente, porém substituiu-se a placa de meio AA por becker de 100 mL contendo 2 mL de solução de glicerol a 16%. Em seguida, o material foi deixado em temperatura ambiente em *overnight*. Posteriormente determinou-se a concentração de esporos utilizando-se câmara de Neubauer. As concentrações acima de 10<sup>6</sup> esporos/mL foram armazenadas em ultrafreezer (freezer a -80° C) para preservação dos esporos.

Após a coleta, retirou-se o excesso de água dos basídios com o auxílio de papel toalha. Os basídios foram fixados com vaselina em tampa de placa de petri e colocados sobre a boca de um becker de 100 mL contendo 2 mL de glicerol 16%; o becker foi posto sobre o fundo de uma placa de petri contendo papel toalha úmido, a fim de se criar um ambiente com saturação de umidade, para que os basidiocarpos não sofressem ressecamento e para obter melhor aproveitamento da liberação de esporos.

### **Teste de conservação de isolados de *M. pernicioso* no método Castellani**

Foram utilizados sete isolados de *M. pernicioso* para teste de conservação no referido método. Seis discos de micélio foram retirados das extremidades das colônias de cada isolado e transferidos para tubos com tampa rosqueável, contendo água destilada e esterilizada até o volume de aproximadamente metade da capacidade do recipiente. Após três meses, um disco de cada isolado foi repicado para placa de petri com meio enriquecido (MLGA, 1,7 g de extrato de malte, 5 g de extrato de levedura, 50 g de glicerol, 20 g de ágar). A avaliação foi feita após uma semana da repicagem, anotando-se o crescimento do fungo.

Coletaram-se 100 basidiocarpos e fez-se o processo de desinfecção com solução de estreptomomicina a 1%. Posteriormente os basidiocarpos foram armazenados em tubos com tampa rosqueável. Utilizaram-se cinco tubos com água e cinco tubos secos; em cada tubo foram colocados dez basidiocarpos. Após distribuição e identificação dos tubos, estes foram armazenados em

ultrafreezer (-80 °C). A avaliação foi realizada a cada sete dias, a partir do armazenamento, retirando-se do ultrafreezer um tubo com água e um tubo seco, seguindo os procedimentos de liberação de esporos descritos anteriormente.

### Quantificação de basidiocarpos de *M. pernicioso*

Avaliaram-se dez vassouras secas por tratamento: 1) vassouras secas no campo não destacadas; 2) vassouras secas no campo destacadas; 3) vassouras secas destacadas e penduradas sob telado, submetidas a oito horas de molhamento; 4) vassouras secas destacadas e penduradas no laboratório, em caixas de vidro, submetidas a oito horas de molhamento. A avaliação foi feita diariamente, de março a maio de 2009.

### Condições de cultivo

Após 15 dias de desenvolvimento, o fungo foi repicado para meio enriquecido. Aos 14 dias de crescimento, os isolados foram transferidos para frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido (1,7 g de extrato de malte, 5 g de extrato de levedura, 50 g de glicerol), e submetidos à agitação de 120 rpm por um período de 10 a 14 dias, para obtenção da massa micelial. O micélio foi filtrado, lavado em água destilada e seco em papel toalha.

### Resultados e Discussão

#### Obtenção e cultivo de isolados de *M. pernicioso*

Neste trabalho obteve-se um total de 17 isolados, destes a maioria é do Amazonas, sendo um do Acre. Os isolados foram obtidos dos seguintes hospedeiros: 13 de *T. grandiflorum*; 1 de *T. caçãõ*; 1 de *T. obovatum*; 1 de *T. mariae*; e 1 de *T. subincanum* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação de isolados de *M. pernicioso* obtidos de *Theobroma* sp. de algumas regiões da Amazônia.

Hospedeiros	Local da coleta	Código
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Careiro Castanho, AM	Mp* 24
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Manacapuru, AM	Mp 25
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Rio Preto da Eva, AM	Mp 26
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Embrapa Acre, AC	Mp 27
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Campo Experimental do CPAA/Shift	Mp 28
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Autazes, AM	Mp 29
<i>Theobroma mariae</i>	Campo Experimental do CPAA/ Coleção de <i>Theobroma</i>	Mp 30
<i>Theobroma subincanum</i>	Campo Experimental do CPAA/ 60 ha	Mp 31
<i>Theobroma obovatum</i>	Campo Experimental do CPAA/ Coleção de <i>Theobroma</i>	Mp 32
<i>Theobroma cacao</i>	Campo Experimental do CPAA/Nagibão	Mp 33
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Campo Experimental do DAS, AM	Mp 34
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Balbina, AM	Mp 35
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Campo Experimental do DAS, AM	Mp 36
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Estrada de Presidente Figueiredo, Km 120, AM	Mp 37
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Manacapuru, AM	Mp 38
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Balbina, AM	Mp 39
<i>Theobroma grandiflorum</i>	Balbina, AM	Mp 40

\* Mp = *Moniliophthora pernicioso*

## Obtenção de suspensão e conservação de esporos de *M. pernicioso*

Obtiveram-se 34 suspensões de esporos, que foram armazenados em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação de suspensão de esporos em estoque no ultrafreezer do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental.

Nº de Registro	Concentração	Volume	Local
48	$1,4 \times 10^6$	1,86 mL	Rio Preto da Eva, AM
49	$0,8 \times 10^6$	2,0 mL	Acre, AC
50	$0,2 \times 10^6$	1,7 mL	Manacapuru, AM
51	$1,1 \times 10^6$	2,0 mL	Ceplac/ AM
52	$15,65 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
53	$17,15 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
54	$1,25 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
55	$0,2 \times 10^6$	1,2 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
56	$0,36 \times 10^6$	4,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
57	$4 \times 10^6$	2,6 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
58	$13 \times 10^6$	1,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
59	$7 \times 10^6$	2,8 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
60	$3 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
61	$0,12 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
62	$4 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
63	$0,093 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
64	$0,35 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
65	$17 \times 10^6$	2,8 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
66	$5 \times 10^6$	2,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
67	$14,5 \times 10^6$	2,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
68	$12 \times 10^6$	3,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
69	$7 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
70	$5 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
71	$2,01 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
72	$0,3 \times 10^6$	3,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
73	$2,95 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
74	$2,45 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
75	$1,35 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
76	$0,8 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
77	$0,2 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
78	$0,15 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
79	$4,8 \times 10^6$	1,7 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
80	$1,6 \times 10^6$	1,6 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
81	$1,25 \times 10^6$	1,5 mL	Embrapa Amazônia Ocidental
82	$0,78 \times 10^6$	4,0 mL	Embrapa Amazônia Ocidental



Todos os isolados do *M. pernicioso*, após três meses conservados pelo método Castellani, quando cultivados em meio enriquecidos, apresentaram crescimento micelial (Tabela 3).

**Tabela 3.** Crescimento micelial de isolados *M. pernicioso* após três meses de conservação em água.

Isolados	Crescimento micelial (3 meses)
Mp 21	+ (*)
Mp 22	+
Mp 24	+
Mp 25	+
Mp 28	+
Mp 29	+
Mp 35	+
Mp 07	+

(\*)Os isolados marcados com + apresentaram crescimento.

## Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Ocidental, pela logística cedida; à pesquisadora Maria Geralda de Souza, pela confiança em meu trabalho; ao pesquisador Gilvan Ferreira da Silva, pela coorientação; às equipes do Laboratório de Fitopatologia e de Biologia Molecular da Embrapa, pelo treinamento e apoio no desenvolvimento do trabalho; e ao CNPq, pela concessão da bolsa.

## Referências

AIME, M. C.; PHILLIPS-MOURA, 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, L. C.; ANDEBRHAN, T. **Reação de clones de cacau à *Crinipellis pernicioso***. Belém, PA: CEPLAC/DEPEA, 1984. p. 73-146. (Informe de Pesquisa).

ANDEBRAHAN, T.; ALMEIDA, L. C.; NAKAYMA, L. H. I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (Sthael) Singer: a experiência da Amazônia Brasileira. *Agrotropica*, Itabuna, v. 10, p. 49-60, 1998.

BASTOS, C. N. **Influência da temperatura na liberação de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* (Sthael) Singer**. Belém, PA: CEPLAC/CEPEC, 1980. p. 46-49. (Informe Técnico).

BASTOS, C. N.; EVANS, H. C. **Hospedeiros da vassoura-de-bruxa (*C. pernicioso*)**. Belém, PA: CEPLAC, 1979. 91 p. (Informe Técnico).

LIMA, M. I. M.; SOUZA, A. das G. C. **Diagnose das principais doenças do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) (Wild ex. Spreng.) e seu controle**. Manaus: Embrapa-CPAA, 1997. 18 p. (Embrapa-CPAA. Documentos, 9).

NIELLA, G. R. Diferenças na agressividade de isolados de *Crinipellis pernicioso* da região cacaueteira baiana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 346, 2001

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