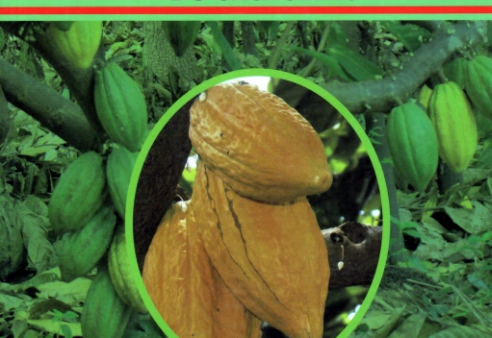
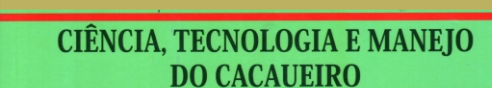
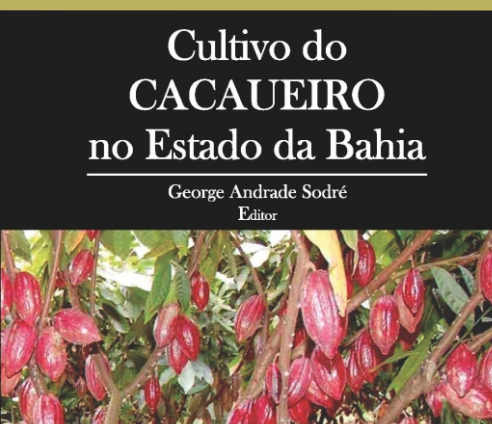
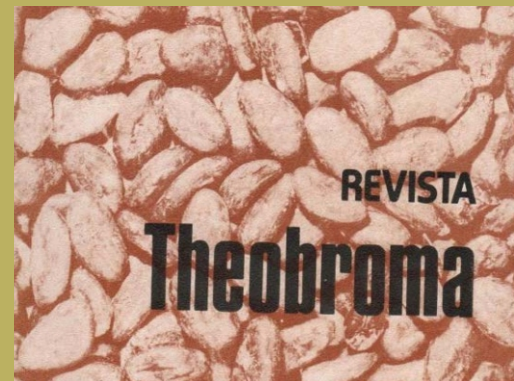
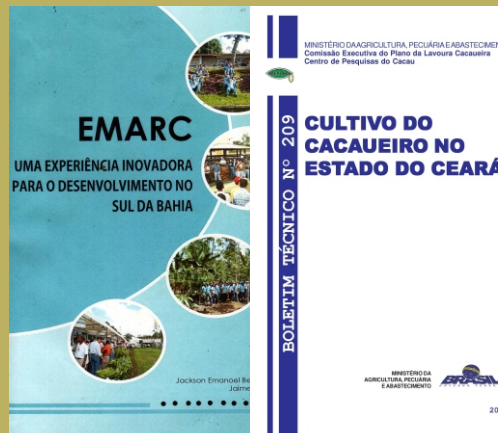
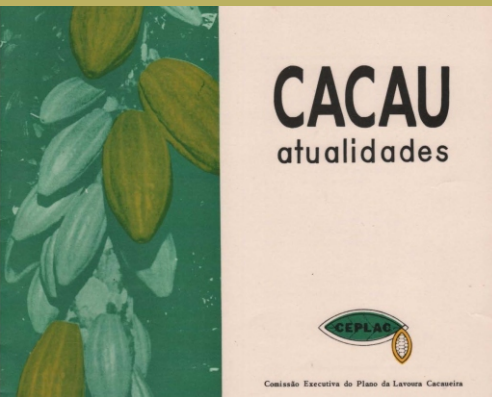


# Agrotropica

Volume 34, número 2, maio a agosto de 2022



---

© 2022 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

Ano 2022.

Tiragem: 1000 exemplares

**Elaboração, distribuição, informações:**

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

Superintendência Regional no Estado da Bahia

Centro de Pesquisas do Cacau

---

Editor: Ronaldo Costa Argôlo.

Coeditores: Quintino Reis de Araujo e George Andrade Sodré

Editores eletrônicos: Jacqueline C. C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

Capa: Ronaldo Costa Argôlo Filho

Agrotropica, v. 1, nº1 (1989)  
Ilhéus, BA, Brasil, CEPLAC/CEPEC, 1989

v.

Quadrimestral

Substitui "Revista Theobroma"

1. Agropecuária - Periódico.

CDD 630.5

**INFORMAÇÕES SOBRE A CAPA:** Comemoração dos 65 anos de criação da CEPLAC. A CEPLAC foi criada em 20 de fevereiro de 1957, vinculada ao Ministério da Fazenda, através do Decreto Federal nº 40.987, com recursos do Fundo dos Ágios. O Governo Federal instituiu o Plano Recuperação Econômico-Rural da Lavoura Cacaueira, que possibilitou criar as condições favoráveis e efetivas para o processo de desenvolvimento das regiões produtoras de cacau do Brasil.

**INFORMATION ON THE COVER:** : Commemoration of the 65th anniversary of the creation of CEPLAC. On February 20th, 1957, the Ministry of Finance, through the Federal Decree nº 40.987, created CEPLAC with resources from the Goodwill Fund. The Federal Government institutes the Plan of Economic-Rural Recovery for the Cacao Crop, which made it possible to create favorable and effective conditions for the development process of the cocoa producing regions in Brazil.

**AGROTRÓPICA é indexada em:**

AGRINDEX; THE BRITISH LIBRARY; CAB (i.e. Horticultural Abstracts, Review of Plant Pathology, Forestry Abstracts); AGROBASE; Agricultural and Environment for Developing regions (TROPAG); ULRICH'S INTERNATIONAL PERIODICALS DIRECTORY (Abstract on Tropical Agriculture, Agricultural Engineering Abstracts, Agroforestry Abstracts, Bibliography of Agriculture, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Exerp Medical, Food Science & Technology Abstracts, Indice Agricola de America Latina y el Caribe, Nutrition Abstracts, Protozool. Abstracts, Review of Applied Entomology, Seed Abstracts, Tropical Oil Seeds Abstracts).





**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

**CEPLAC - Comissão Executiva do  
Plano da Lavoura Cacaueira**

**AGROTRÓPICA**. Publicação quadrimestral do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC)/CEPLAC.

**Comitê Editorial:**

Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Jacques Hubert Charles Delabie; José Luís Bezerra; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Lucimara Chiari; Manfred Willy Muller; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo e George Andrade Sodré.

**Editoração eletrônica:** Jacqueline C. C. do Amaral e Selenê Cristina Badaró.

**Capa:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Endereço para correspondência:**

**AGROTRÓPICA**, Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), 45600-970, Itabuna, Bahia, Brasil.

**Telefone:** (73) 3214 -3211

**E-mail:**

r-agrotropica.ceplac@agro.gov.br

**Tiragem:** 1000 exemplares

# AGROTRÓPICA

V. 34

Maio - agosto

2022

N.2

## CONTEÚDO

### ARTIGOS

- 95 Número de grãos de pólen, óvulos e proporção pólen-óvulo em vários clones de cacauero (em inglês). **U. V. Lopes, I. N. Viana, D. M. A. Magalhães, R. P. dos Santos, R. F. dos Santos.**
- 107 Elementos potencialmente tóxicos em solos e amêndoas de cacau em sistemas agroflorestais da Bahia, Brasil (em inglês). **Q. R. de Araujo, J. N. Gattward, J. C. de O. Freitas, S. S. de Almeida, V. C. Baligar.**
- 121 Ocorrência do tripses da pimenta (*Scirtothrips dorsalis* Hood, [Thysanoptera: Thripidae]) em cacauero (*Theobroma cacao* L.). **K. Nakayama, M. F. Lindner.**
- 131 Potencial de fungos endofíticos de *Aechmea multiflora* como promotores de crescimento da planta hospedeira (em inglês). **E. S. Rodrigues, A. J. A. de Carvalho, E. D. M. N. Luz, A. C. F. Soares, J. L. Bezerra.**
- 139 Levantamento de fungos poliporoides da Caatinga e Mata Atlântica da Bahia. **C. D. dos Santos, E. L. Candeias, J. S. Santos, A. C. F. Soares, A. N. Caiafa, J. L. Bezerra.**
- 147 Reação de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Nematoda). **R. S. Santos, P. R. P. Martinelli, M. F. Calderoni.**
- 153 Infestação de *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) em oito clones de seringueira em Itiquira, MT. **R. S. Santos, R. de C. Andrade Neto.**

### NOTA CIENTÍFICA

- 159 Doenças em cacauero e cupuaçuzeiro no Acre. **A. Siviero, P. E. F. de Macedo, G. T. S. Moreira.**



**MINISTRY OF AGRICULTURE  
LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY**

**CEPLAC - Executive Commission of  
the Cacao Agriculture Plan**

**AGROTRÓPICA**. Published every four months by the Cocoa Research Center (CEPEC)/CEPLAC.

**Editorial Committee:**

Edna Dora Martins Newman Luz; George Andrade Sodré; Jacques Hubert Charles Delabie; José Luís Bezerra; José Marques Pereira; José Raimundo Bonadie Marques; Karina Peres Gramacho; Lucimara Chiari; Manfred Willy Muller; Raúl René Melendez Valle; Uilson Vanderlei Lopes.

**Editor:** Ronaldo Costa Argôlo.

**Coeditor:** Quintino Reis de Araujo and George Andrade Sodré.

**Desktop publish:** Jacqueline C.C. do Amaral and Selenê Cristina Badaró.

**Cover:** Ronaldo Costa Argôlo Filho

**Address for correspondence:**

**AGROTRÓPICA**, Cocoa Research Center (CEPEC), 45600-970, Itabuna, Bahia, Brazil.

**Telephone:** 55 (73) 3214 - 3211

**E-mail:**

r-agrotropica.ceplac@agro.gov.br

**Circulation:** 1000 copies.

# AGROTRÓPICA

V.34

May - August

2022

N.2

## CONTENTS

### ARTICLES

- 95 Number of pollen grains, ovules and pollen-ovule ratio in cacao clones. **U. V. Lopes, I. N. Viana, D. M. A. Magalhães, R. P. dos Santos, R. F. dos Santos.**
- 107 Potentially toxic elements in soils and cacao beans in agroforestry systems of Bahia, Brazil. **Q. R. de Araujo, J. N. Gattward, J. C. de O. Freitas, S. S. de Almeida, V. C. Baligar.**
- 121 Occurrence of pepper thrips (*Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae)) on cacao (*Theobroma cacao* L.) (in Portuguese). **K. Nakayama, M. F. Lindner.**
- 131 Potential of endophytic fungi of *Aechmea multiflora* as growth promoters of the host plant. **E. S. Rodrigues, A. J. A. de Carvalho, E. D. M. N. Luz, A. C. F. Soares, J. L. Bezerra.**
- 139 Survey of polyporoid fungi from the Caatinga and Atlantic Forest of Bahia (in Portuguese). **C. D. dos Santos, E. L. Candeias, J. S. Santos, A. C. F. Soares, A. N. Caiafa, J. L. Bezerra.**
- 147 Reaction of medicinal plants to *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Nematoda) (in Portuguese). **R. S. Santos, P. R. P. Martinelli, M. F. Calderoni.**
- 153 Infestation of *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) in eight rubber tree clones in Itiquira, Mato Grosso state, Brazil (in Portuguese). **R. S. Santos, R. de C. Andrade Neto.**

### SCIENTIFIC NOTE

- 159 Cocoa and Cupuassu diseases in State of Acre, Brazil. **A. Siviero, P. E. F. de Macedo, G. T. S. Moreira.**

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. O original para publicação em português, inglês ou espanhol, deve ter no máximo 18 páginas numeradas, em formato A4 (21,0 x 29,7 cm), fonte Times New Roman, corpo 12, espaço 1,5 (exceto Resumo e Abstract, em espaço simples), digitado em Word/Windows. O artigo deverá ser encaminhado à Comissão Editorial da revista por meio eletrônico. No rodapé da primeira página deverão constar o endereço postal completo e o endereço eletrônico do(s) autores(s). As figuras e tabelas devem vir à parte.

2. Os artigos devem conter: título, resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos e literatura citada.

3. Os artigos científicos e notas científicas devem conter introdução que destaque os antecedentes, a importância do tópico e revisão de literatura. Nos materiais e métodos devem-se descrever os materiais e métodos usados, incluindo informações sobre localização, época, clima, solo etc., bem como nomes científicos se possível completo de plantas, animais, patógenos etc., o desenho experimental e recursos de análise estatística empregada. Os resultados e discussão poderão vir juntos ou separados e devem incluir tabelas e figuras com suas respectivas análises estatísticas. As conclusões devem ser frases curtas, com o verbo no presente do indicativo, sem comentários adicionais e derivados dos objetivos do artigo.

4. **Título** - Deve ser conciso e expressar com exatidão o conteúdo do trabalho, com no máximo 15 palavras.

5. **Resumo e Abstract** - Devem conter no máximo 200 palavras. Abstract deve ser tradução fiel do resumo em inglês.

6. **Palavras chave** - Devem ser no máximo de seis, sem estar contidas no título.

7. **Introdução** - Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

8. **Material e Métodos** - Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

9. **Resultados, Discussão e Conclusões** - De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

10. **Agradecimentos** - As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

11. **Unidades de medida** - Usar exclusivamente o Sistema Internacional (S.I.).

12. **Figuras (gráficos, desenhos, mapas)** - devem ser apresentadas com qualidade que permita boa reprodução gráfica; devem ter 8,2 cm ou 17 cm de largura; as fotografias devem ser escaneadas com 300 dpi e gravadas em arquivo TIF, separadas do texto.

13. **As tabelas** - devem ser apresentadas em Word ou Excel, e os dados digitados em Times New Roman.

14. **Literatura Citada** - No texto as referências devem ser citadas da seguinte forma: Silva (1990) ou (Silva, 1990).

A normalização das referências deve seguir os exemplos abaixo:

### PERIÓDICO

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotropica* (Brasil) 8(2):39-44.

### LIVRO

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. *Southern forrages*. Atlanta, PPI. 256p.

### PARTE DE LIVRO

ENTWISTLE, P. F. 1987. *Insects and cocoa*. In: Wood, G.A.R.; Lass, R. A. *Cocoa*. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

### DISSERTAÇÃO

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). *Dissertação Mestrado*. Salvador, UFBA. 31p.

### TESE

ROHDE, G. M. 2003. *Economia ecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária*. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

### MONOGRAFIA SERIADA

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. *Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia*. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. *Boletim Técnico* n° 180. 19p.

### PARTE DE EVENTO

PIRES, J. L. et al. 1994. *Cacao germplasm characterisation based on fat content*. In: *International Workshop on Cocoa Breeding Strategies*, Kuala Lumpur, 1994. *Proceedings*. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

A literatura citada deverá referir-se, de preferência, a trabalhos completos publicados nos últimos 5 anos.

15. **Correspondência de encaminhamento** do artigo deverá ser assinada pelo autor e coautores.

Os autores receberão cópias do seu trabalho publicado.

## GUIDELINES TO AUTHORS

**1** - The manuscript for publication in Portuguese, English or Spanish, not exceed 18 numbered pages, format A4, in Times New Roman, 12, 1.5 spaced (except Resumo and Abstract, simple spaced) typed in Word. The article must be addressed to the Editorial Commission in 4 printed copies and also in CD copy. Complete mailing address and e-mail of the author(s) must appear at the bottom of first page. Three out of the four copies should not state the author's name or acknowledgements, since these copies will go to reviewers. Figures (drawings, maps, pictures and graphs) and tables should be sent separately and ready for publication;

**2** - Articles must contain: title, abstract, introduction, materials and methods, results and discussion, conclusions, acknowledgements and literature cited (references);

**3** - Scientific articles and notes must include an introduction highlighting the background and importance of the subject and literature review. Under materials and methods one must mention information about locations, time, climate, soil, etc. and furnish Latin names of plants, animals, pathogens, etc., as well as experimental designs and statistical analysis used. Conclusions must be objective and derived from relevant results of the research.

**4 - Title** - It must be concise (not exceed 15 words) and express the real scope of the work.

**5 - Abstract** - No more than 200 words.

**6 - Key words** - Six at most, and should not be present in the title.

**7 - Introduction** – should be concise containing a strictly necessary review to the introduction of the topic and support for the methodology and discussion.

**8 - Materials and Methods** – may be presented in a continuous descriptive form or with subheadings, in a manner that allows the reader to understand and reproduce the described methodology. Bibliographic citations can be used.

**9 - Results, Discussion and Conclusions** – In accordance with the format chosen, these parts should be presented clearly, with the aid of tables, graphs and figures so as to leave no doubt as to the authenticity of the results, viewpoints discussed and conclusions emitted.

**10 - Acknowledgements** – Persons, institutions and companies that contributed to the accomplishment of the work should be mentioned at the end of the text before the Bibliographic References

**11 - Measurement units** - Use only the International System.

**12 - Figures** (drawings, maps, pictures and graphs) - They must possess good quality for graphic reproduction;

size 8.2 cm or 17 cm wide; photos should be scanned at 300 dpi and recorded, out of the text, in TIF file.

**13 - Tables** - It should be present in Word or Excel and data typed in Times New Roman, 12.

**14 - References** - literature cited in the text must be written as follows: Silva (1990) or (Silva, 1990).

Citation should be given as follows.

### PERIODICALS

REIS, E. L. 1996. Métodos de aplicação e fracionamentos de fertilizantes no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Sul da Bahia. *Agrotropica* (Brasil) 8(2): 39 - 44.

### BOOKS

BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. 1991. Southern forages. Atlanta, PPI. 256p.

### BOOK CHAPTERS

ENTWISTLE, P. F. 1987. Insects and cocoa. In: Wood, G.A.R.; Lass, R. A. Cocoa. 4 ed. London, Longman. pp.366-443.

### DISSERTATION

ROCHA, C. M. F. 1994. Efeito do nitrogênio na longevidade da folha de cacau (*Theobroma cacao* L.). Dissertação Mestrado. Salvador, UFBA. 31p.

### THESIS

ROHDE, G. M. 2003. Economia ecológica da emissão antropogênica de CO<sub>2</sub> - Uma abordagem filosófica-científica sobre a efetuação humana alopoiética da terra em escala planetária. Tese Doutorado. Porto Alegre, UFRGS/IB. 235p.

### SERIAL MONOGRAPHS

TREVIZAN, S. D. P.; ELOY, A. L. S. 1995. Nível alimentar da população rural na Região Cacaueira da Bahia. Ilhéus, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico n° 180. 19p.

### PART OF MEETINGS

PIRES, J. L. et al. 1994. Cacao germplasm characterisation based on fat content. In: International Workshop on Cocoa Breeding Strategies, Kuala Lumpur, 1994. Proceedings. Kuala Lumpur, INGENIC. pp.148-154.

Literature cited should include published papers rather than in the last 5 years.

**15 - Correspondence** of guiding will have to be signed by the author and coauthors.

Authors will receive the reprints of their published paper.

## NUMBER OF POLLEN GRAINS, OVULES AND POLLEN-OVULE RATIO IN CACAO CLONES

*Uilson Vanderlei Lopes<sup>1,\*</sup>, Ivanete Nascimento Viana<sup>1,2</sup>, Dilze Maria Argolo Magalhães<sup>1</sup>,  
Raimundo Pereira dos Santos<sup>1</sup> and Reinaldo Figueiredo dos Santos<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Cacao Research Center (CEPEC/CEPLAC), km 22, BR 415, 45600-919, Ilhéus, BA, Brazil; <sup>2</sup>Fapesb Beginner on Science Scholarship.

\*Correspondence Author: uvlopesbr@gmail.com

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a tree species, whose beans are used mainly in the chocolate manufacture. Pollination deficits have been frequently reported in cacao, impacting bean yield. In the present study, 30 cacao clones were evaluated in respect to the number of ovules and pollen grains produced. It was observed statistically significant variation among the 30 clones, for the number of pollen grains produced, ranging from 1750 to 10575 pollen grains/flower (average = 4698 pollen grains/flower). The number of ovules per flower ranged from 41.4 to 66.5 (average = 52.9 ovules/flower) and the pollen-ovule ratios from 30.7 to 186.2 (average = 88.0). There were no statistical significant differences between self-compatible and incompatible clones in respect to the pollen-ovule ratios. Considering the pollen-ovule ratios observed in this study, cacao should be classified as a facultative/obligate autogamous, according to Cruden's (1977) scale, despite the many evidences showing a high frequency of outcrossing in cacao. It can be concluded that there is genetic variance for the number of pollen grains and ovules in cacao, allowing breeding for those traits and contributing to the reduction of the yield gap associated to pollination deficit.

**Key words:** *Theobroma cacao*, pollination, mating system.

**Número de grãos de pólen, óvulos e proporção pólen-óvulo em vários clones de cacauero.** O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie arbórea, cujas amêndoas são usadas principalmente na manufatura do chocolate. Deficit de polinização tem sido frequentemente reportado em cacau, impactando a produção de amêndoas. No presente estudo, 30 clones de cacauero foram avaliados em relação ao número de óvulos e grãos de pólen produzidos. Foi observada variação estatisticamente significativa entre os clones, para o número de grãos de pólen produzidos, variando de 1750 a 10575 grãos de pólen/flor (média = 4698 grãos de pólen/flor). O número de óvulos por flor variou de 41,4 a 66,5 (média = 52,9 óvulos/flor) e a proporção pólen-óvulo de 30,7 a 186,2 (média = 88,0). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre clones autocompatíveis e incompatíveis em relação às proporções pólen-óvulo. Considerando as proporções pólen-óvulo observadas neste estudo, o cacauero deveria ser classificado como autógamo facultativo/obrigatório, de acordo com a escala de Cruden (1970), apesar das muitas evidências mostrando uma elevada frequência de polinização cruzada. Conclui-se que há variância genética quanto ao número de grãos de pólen e óvulos no cacauero, permitindo melhoramento para aquelas características e contribuindo para a redução da lacuna de produção associada ao deficit de polinização.

**Palavras-chave:** *Theobroma cacao*, polinização, sistema de acasalamento.



## Introduction

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a fruit tree species originally from the Amazon region and planted mainly in the tropics (West Africa, Latin America, and Asia). Cocoa beans – the commercial product of the cacao tree - are mainly used for chocolate manufacture but are also used for cosmetics, pharmaceuticals, and many other products. A high bean production initiates with and requires a successful pollination; however, some authors have reported a strong pollination deficit in cacao (Soria, 1974; Parvais, Reffye and Lucas, 1977; Reffye et al., 1978; Tovar and Ortis, 1991; Lachenaud, 1994) and complementary pollination has been proposed (Soria, 1974; Nakayama, 2018) as a form of increasing yield. Cilas (1988) has shown that a high number of pollen grains per flower, reduces the number of flowers receiving no pollen in the pistil ( $r=-0.41^{**}$ ). On the other hand, cacao breeders have not considered the number of pollen grains as a trait for selection, and a few cacao germplasms have been assessed for this trait (Cilas, 1988; Godoy et al., 2009), compared with those evaluated for ovule number, for example (e.g., Lachenaud, 1991; Cilas, Machado and Motamayor, 2010). Also, in cacao, the pollen-ovule ratio has been estimated only for two clones (Godoy et al., 2009) and then a better assessment of the mating system based on this aspect, as suggested by Cruden (1977), is not possible. This paper will focus on these two aspects, the assessment of cacao germplasms for the pollen number and the estimation of the pollen-ovule ratio to infer the mating system.

Cacao flowers are hermaphrodite and present several barriers to natural pollination. Firstly, cacao has sexual incompatibility, which is quite frequent in the species and prevents incompatible plants being self-fertilized or fertilized by individuals with the same alleles of incompatibility (Knight and Rogers, 1955; Cope, 1962). Secondly, the stamens of the cacao flowers are enclosed within petal hoods, making difficult the access of the pollinator insect to the anthers (Knoke, Soria and Chapman, 1980). Thirdly, anther and stigma are in different heights in the flower (heterostyly), due to different sizes of the stamens and pistils. Fourthly, the stigma of the cacao flower often matures later than the anthers (Claus et al., 2018) and the stigma is surrounded by a barrier of

(infertile) staminodes. Fifthly, the cacao pollen grains are sticky, therefore, not easily transported by the wind, requiring a specialized pollinator insect, mainly midges of the *Forcipomyia* genus (Soria and Wirth, 1974). All these factors tend to limit the level of pollination in cacao.

On the other hand, cacao flowers are produced throughout the year, and a single tree can produce up to 125 thousand flowers per year (Lachenaud and Mossu, 1985). Nevertheless, only 1% to 5% of those flowers receive enough pollen to produce a pod (Alvim, 1984) and 50% to 79% of them receive no pollen at all in the pistil, falling off the trees without bearing pods (Parvais, Reffye and Lucas, 1977; Reffye et al., 1978; Tovar and Ortis, 1991; Lachenaud, 1994).

Pollination in cacao has been studied and modeled by different authors, including Parvais, Reffye and Lucas (1977), Reffye et al. (1978) and Tovar and Ortiz (1991). They observed that increasing the number of stigmas with sufficient pollen by natural (insect) pollination, has a significant impact on cacao yield. Also, studies with artificial pollination in cacao have shown a high increase in yield (Soria, 1974; Knoke, Soria and Chapman, 1980; Nakayama, 2018). Moreover, Falque, Lesdalons and Eskes (1996) observed that the correlation between pollination intensity and fruit setting in two clones (Sca-6 and IFC-5) was higher than  $0.92^{**}$ . Therefore, selection for high amount of pollen in the anthers could improve the pollination efficiency in cacao, improving yield, as suggested by Cilas (1988).

The first step to breed for higher number of pollen grains per flower is to assess the variability of that trait in the germplasm available for breeding. However, there are very few studies quantifying the number of pollen grains in cacao, particularly for germplasms of interest to breeding. Massaux et al. (1976), in Cameroon, observed up to 14 thousand pollen grains per flower, but did not mention the germplasm used. Cilas (1988), evaluating some hybrid trees, observed an average of 878 pollen grains per flower, ranging from 540 to 1310 pollen grains. Godoy et al. (2009) counted the number of pollen grains in two cacao clones, one self-compatible (CCN-51) and another self-incompatible (TSH-1188), and founded 2288 and 2424 pollen grains per flower, respectively.



The objective of the present study was to estimate the number of pollen grains, the number of ovules and the pollen-ovule ratio, in 30 clones of CEPEC's (Cacao Research Center) cacao breeding program, in Bahia, Brazil.

## Materials and Methods

### Germplasms

Thirty clones of the germplasm collection of CEPEC, in Ilhéus, Bahia, Brazil, were used in the present study (Table 1). Those clones are from different origins and were collected either in wild populations or selected in breeding programs; some are self-compatible, others self-incompatible.

### Pollen and Ovule Counting

For the pollen counting, floral buds were collected at random from trees randomly chosen from the 30 clones, after 15:00 h, when the buds started opening (sepal separation). After collection, buds were then immediately put in plastic cups labelled with the clone's name, covered with a young cacao leaf to keep a humid environment, and thereafter transported to the lab. The flower buds were maintained at room temperature until next day morning, to have them completely opened, with anthers dehisced and releasing pollen. Flowers were collected in two periods, Nov-Dec/2018 and Apr-Jun/2019. From each clone and period, two flowers were collected.

From the two flowers, five anthers randomly chosen among the 10 anthers of the two flowers were used for each clone and period. The method used followed the procedure suggested by Dafni (1992). An aqueous solution of approximately 500  $\mu\text{L}$  was prepared by adding three drops of methylene blue stain and four drops of neutral detergent. Then alcohol 70% was added until completing 1000  $\mu\text{L}$ . This solution was manually shaken to mix the components. After that, 100  $\mu\text{L}$  of the solution was put on a single concave microscope slide, together with the five anthers of the clone. Thereafter, five anthers were properly macerated in the solution with a glass stirring rod. After maceration, 1.0  $\mu\text{L}$  of this suspension of pollen grains was distributed in five microscope slides. Observations were then made by counting the number of pollen grains for each slide under magnification (10X) of an

optical microscope. The number of pollen grains per flower (NPGPF) was estimated by:  $\text{NPGPF} = (\text{NPGPS} \times 100 \mu\text{L}) / (1 \mu\text{L} \times 5 \text{ anthers})$ ; where, NPGPS is the average number of pollen grains per slide.

For the ovule counting, another group of flowers were used. In this case, 10 flowers were collected in Oct/2019 from the same clones used for pollen counting, and stored in small plastic tubes containing tap water, until the counting day (usually 1 day after the flower harvest). The ovaries of each of the 10 flowers were dissected and the number of ovules counted under a stereoscopic microscope Taimin TE 1L, 10X.

### Data Analysis

For all analysis, the SAS software was used (SAS Institute, 2004). For the analysis of variance of number of pollen grains (NPGPF), the effects of period and genotypes were considered, assuming as a completely randomized design, with five replicates or slides with pollen of a given clone, in each of the two periods. For the analysis of the number of ovules per flower, only the effect of clone was considered (because it was evaluated only once) and 10 replicates or flowers were used. For comparing the means, 95% confidence intervals were established for the averages of the number of pollen grains and number of ovules per flower of the clones.

The pollen-ovule ratio was computed by dividing the average number of pollen grains per flower of each clone by the average number of ovules per flower of those same clones. Since the number of pollen grains and the number of ovules were measured in different flowers of the clone (even with different number of flowers as pointed before), it was not possible to estimate the pollen-ovule ratio for each flower; therefore, no statistical analysis (ANOVA, confidence intervals) was possible to apply for this variable, as performed for the number of pollen grains and ovules. However a cluster analysis was done, using proc cluster from SAS (SAS Institute, 2004).

The averages of number of ovules, number of pollen and pollen-ovule ratios of self-compatible (23 clones, see Table 1) vs. self-incompatible clones (7 clones) were statistically compared, by the F test, from the analysis of variance, using each clone average as a replication. And a simple linear regression of number

Table 1. Origin, type and sexual incompatibility status of the 30 clones used in this study

Clone	Origin	Type	Incompatibility <sup>a</sup>
BJ-11	Brazil	Breeding Selection	SC
BN-34	Brazil	Breeding Selection	SC
CCN-10	Ecuador	Breeding Selection	SC
CCN-51	Ecuador	Breeding Selection	SC
CEPEC-2002	Brazil	Breeding Selection	SC
CEPEC-2176	Brazil	Breeding Selection	SC
CEPEC-2204	Brazil	Breeding Selection	SC
CP-49	Brazil	Breeding Selection	SC
CP-77	Brazil	Breeding Selection	SC
ICS-1	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SC
ICS-6	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SC
ICS-95	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SC
IMC-67	Peru	Wild	SI
Ipiran-1	Brazil	Breeding Selection	SC
LP-6	Brazil	Breeding Selection	SC
PH-9	Brazil	Breeding Selection	SC
PH-15	Brazil	Breeding Selection	SC
PH-16	Brazil	Breeding Selection	SC
PS-13.19	Brazil	Breeding Selection	SC
Salob-3	Brazil	Breeding Selection	SC
Sca-6	Peru	Wild	SI
Sca-12	Peru	Wild	SI
SIAL-169	Brazil	Breeding Selection	SC
SIC-23	Brazil	Breeding Selection	SC
SJ-2	Brazil	Breeding Selection	SC
TSH-516	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SI
TSH-565	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SI
TSH-1188	Trinidad & Tobago	Breeding Selection	SI
UF-613	Costa Rica	Breeding Selection	SI
VB-681	Brazil	Breeding Selection	SC

<sup>a</sup> SC = Self-Compatible, SI=Self-Incompatible

of pollen grains per flower was fitted on number of ovules, as another way of looking the pollen-ovule ratio but also to assess the association of these two traits.

## Results

The effect of clones was highly significant for both the number of pollen grains and the number of ovules per flower (Table 2). However, for the number of pollen grains, measured in two seasons, there was no effect

of season, but it was a significant season-by-clone interaction (F test, p-values =0.0429). In Nov-Dec/2018, the overall average of the 30 clones was 4595 pollen grains/flower (Figure 1a); while in Apr-Jun/2019 that average was 4795 pollen grains/flower (Figure 1b). While most clones had a higher number of pollen grains in Apr-Jun/2019; ICS-1, ICS-95, UF-613, Ipiran-1, among others had more pollen grains in Nov-Dec/2018 (Figure 1a,b). There was a high variability in number of pollen grains in each season and overall (Figure 1). Some clones as Sca-6, PH-18 and PH-15 had the least number of pollen grains in both seasons. On the other hand, IMC-67, ICS-1, CCN-10 had high number of pollen grains on both seasons. The overall average for all 30 clones in the two seasons was 4,698 pollen grains per flower and ranged from 1760 in Sca-6 to 10575 pollen grains per flower in IMC-67 (Figure 1c). The clones Sca-6, PH-16, PH-15 presented the smallest average; while IMC-67, ICS-1, and CCN-10 showed the highest average.

The number of ovules per ovary or flower ranged from 44.5 in ICS-95 to 66.5 in IMC-67, with an overall average of 52.9 in the 30 clones evaluated (Figure 2a). Among the clones with the smallest values were the ICS-95, UF-613, SIAL-169, and CP-49; while among those with the highest values were the IMC-67, CP-77, CCN-51 and Sca-6.

The pollen-ovule ratios were quite variable among the clones evaluated. The

Table 2. Analysis of variance for the number of pollen grains and ovules per flower measured in 30 cacao clones, in two seasons Nov-Dec/2018 and Apr-Jun/2019 (pollen grains) and one season (Nov/2019), at the Cacao Research Center (CEPEC), Bahia, Brazil

Traits	Source	DF	Mean Square	F	p-value
Pollen Grains	Season	1	19255	0.00	0.9497
	Clone	29	27676322	5.74	<.0001
	Season x Clone	28	7690637	1.60	0.0429
	Residual	127	4818066		
Ovules	Clone	29	202	33.21	<.0001
	Residual	270	6		

CV = 46.7% (Pollen Grains), 4.7% (Ovules)

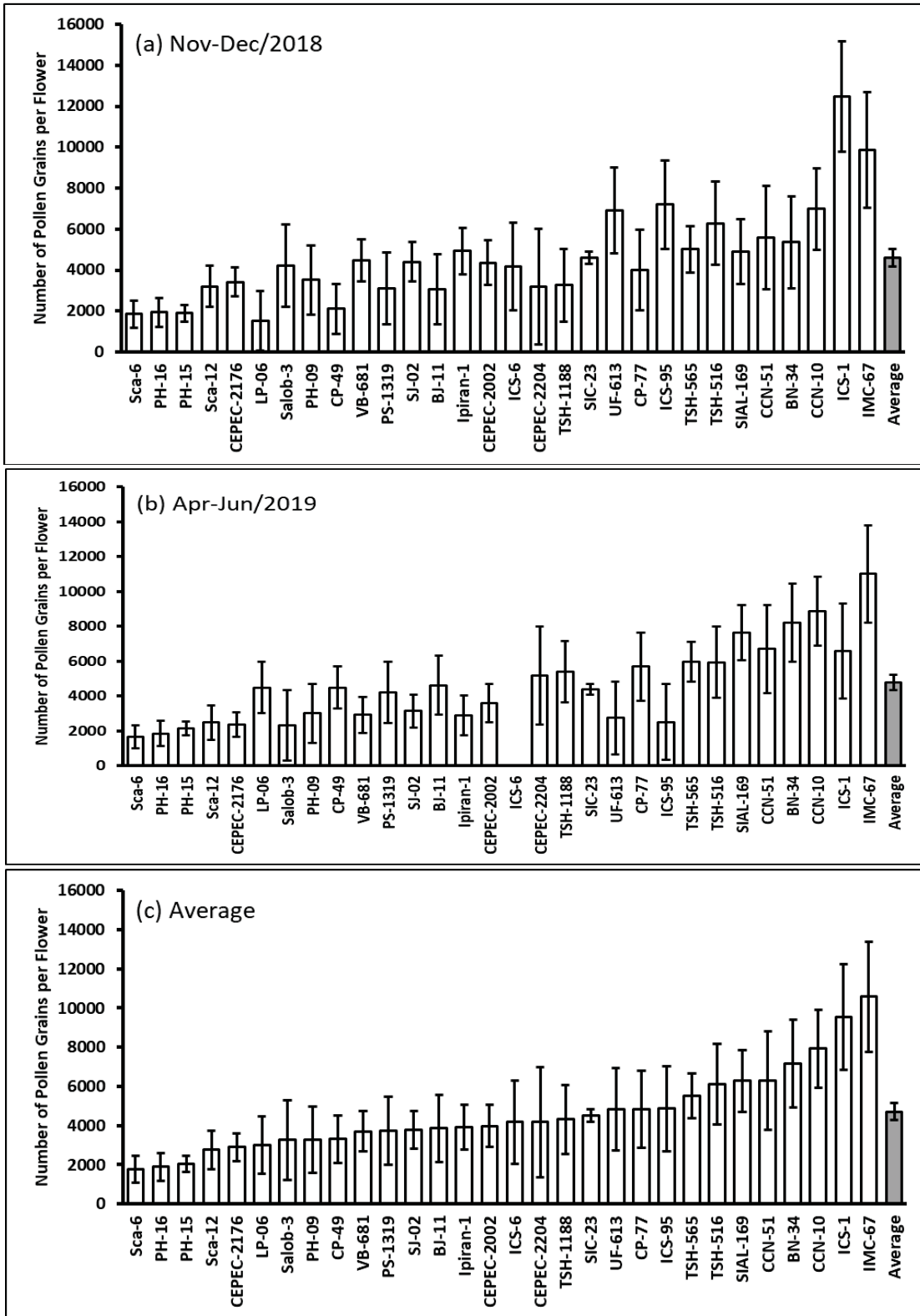


Figure 1. Average estimates and 95% confidence intervals of number of pollen grains per flower (N=6 flowers/clone/season) evaluated in 30 cacao clones in (a) Nov-Dec/2018, (b) Apr-Jun/2019, and (c) average of the two seasons.

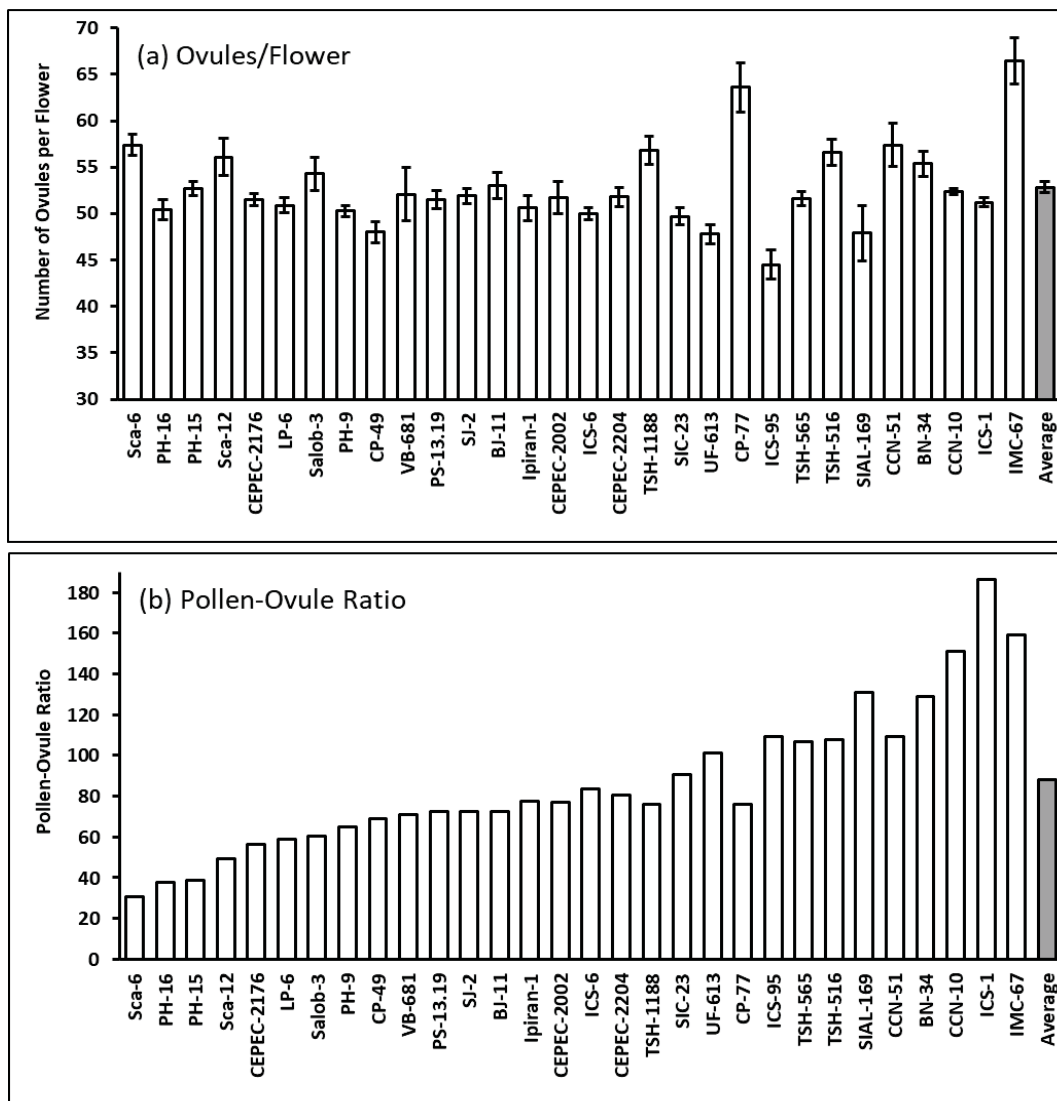


Figure 2. Average estimates of (a) number of ovules per flower (N=10 flowers/clone), and (b) pollen-ovule ratios estimated in 30 cacao clones, and the confidence intervals associated to those estimates.

ratios ranged from 30.7 in Sca-6 to 186.2 in ICS-1 (Figure 2b). Clones with low pollen-ovule ratios were Sca-6, PH-16, and PH-15; while those with high values were ICS-1, IMC-67 and CCN-10 (Figure 2b and 3). The overall pollen-ovule ratio average was 88.0 for the 30 clones.

The fit of the number of pollen grains on the number of ovules in the 30 clones evaluated for both traits was poor ( $R^2 = 0.11$ , Figure 4), indicating that the pollen-ovule ratio is not constant within the species as also shown in Figure 2b. Some clones with very similar number of ovules (e.g., 51.5 ovules/flower for CEPEC-2176 and 51.6 in TSH-565, Figure 2a) have different

number of pollen grains (2890 in CEPEC-2176 and 5500 in TSH-565), resulting in different pollen-ovule ratios (56.1 and 106.6, respectively, Figure 1c).

The averages of the seven self-incompatible clones were higher than those of 23 self-incompatible ones, for the three traits evaluated (Table 3); however, they were statistically different only for the number of ovules per flower (Table 4).

## Discussion

A good pollination is an essential step for a high production of cocoa beans. Pollination deficit has been



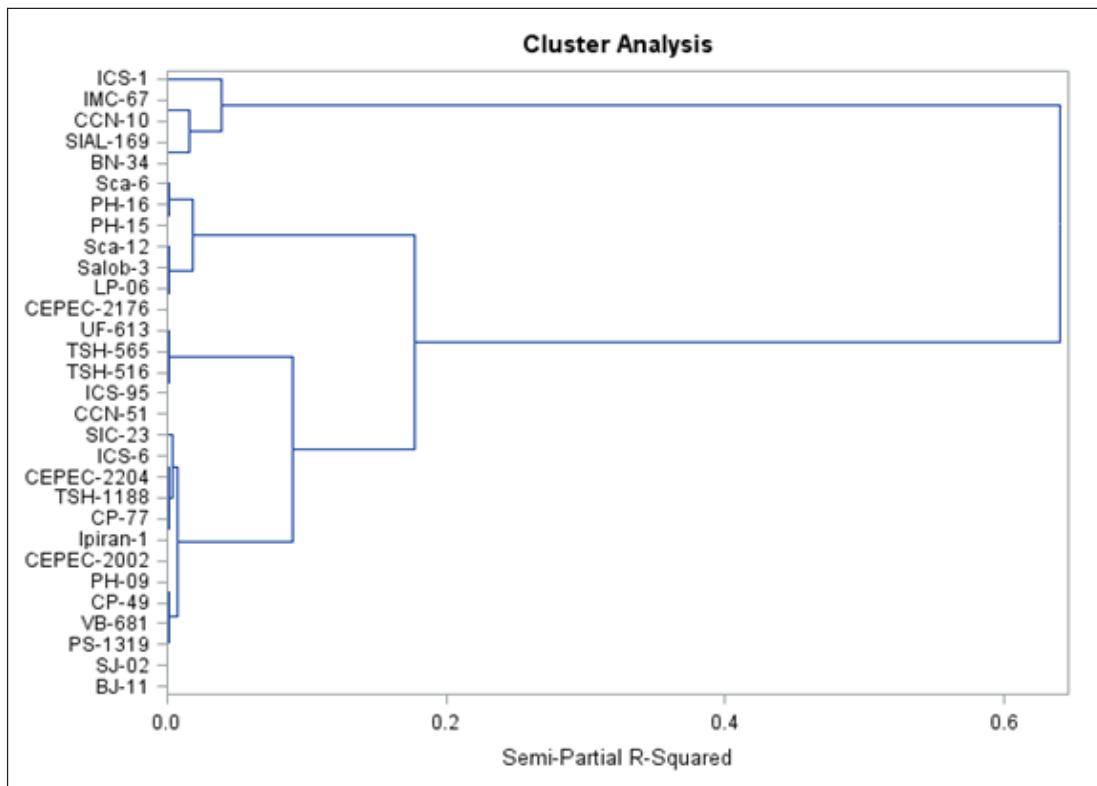


Figure 3. Clone groups based on a cluster analysis on the variable pollen-ovule ratio.

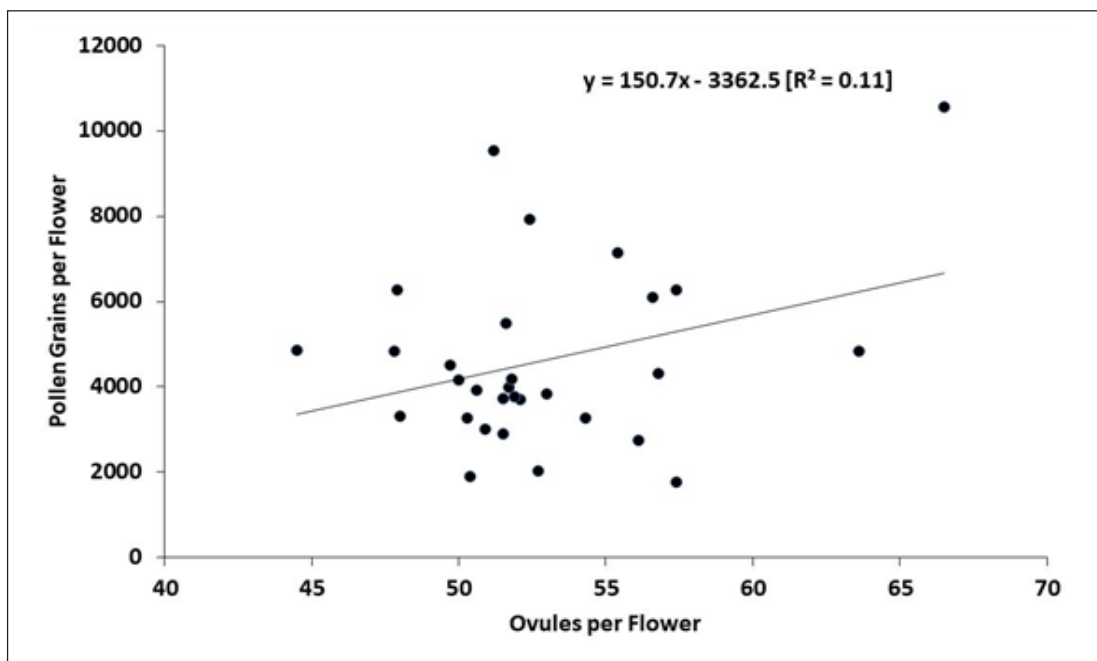


Figure 4. Average number of pollen grains per flower in 30 cacao clones as a function of number of ovules per flower in the same clones.

Table 3. Averages of number of pollen grains per flower, number of ovules per flower and pollen-ovule ratio, for 23 self-compatible and seven self-incompatible cacao clones, at the Cacao Research Center (CEPEC), Bahia, Brazil

Incompatibility	N	Pollen Grains	Ovules	Pollen-Ovule Ratio
Self-Compatible	23	4449.6	51.9	85.9
Self-Incompatible	7	5121.1	56.1	90.1

Table 4. Analysis of variance for number of pollen grains per flower, number of ovules per flower and pollen-ovule ratio, considering the two incompatibility status (Self-Compatible, Self-Incompatible) in 30 cacao clones, at the Cacao Research Center (CEPEC), Bahia, Brazil

Traits	Source	DF	Mean Square	F	p-value
Pollen Grains	Incompatibility	1	2419658	0.54	0.467
	Residual	28	4440902		
Ovules	Incompatibility	1	97	5.55	0.026
	Residual	28	17		
Pollen-Ovule Ratio	Incompatibility	1	93	0.07	0.798
	Residual	28	1388		

CV = 46.8% (Pollen Grains), 8.6% (Ovules), 40.2% (Pollen-Ovule Ratio)

claimed as one of the major gaps in cacao yield production, with yield increasing nonlinearly with the number of flowers pollinated up to 200% (Groeneveld et al., 2010). However, pollination deficit does not occur only with cacao. Burd (1994), reviewing published data from 258 plant species, from 77 families, found a pollination deficit in at least 62% of them, with a strongest impact on the frequency of fruit set, as compared with the frequency of seed set. Usually only 1% to 5% of the flowers produced by cacao trees receive enough pollen to produce pods (Alvim, 1984) and 50% to 79% of the flowers in a tree receive no pollen at all (Parvais, Reffye and Lucas, 1977; Reffye et al., 1978; Tovar and Ortis, 1991; Lachenaud, 1994). On average, seven cacao clones assessed in Ecuador for six months, received only around 16 pollen grains in the stigmas (Mena-Montoya et al., 2020), which is only around one-third of the ovules typically produced in a cacao flower.

To overcome the pollination deficit in cacao, supplementary pollination has been suggested as a way of increasing productivity based on some successful results. Falque, Lesdalons and Eskes (1996), for example, showed a high correlation between pollination intensity and fruit setting in cacao ( $r > 0.92^{**}$ ). Soria (1974) and Knoke, Soria and Chapman (1980) showed increments in yield of up to five times in plants blown

with a backpack mistblower, compared with the yield of unblown control plants. Nakayama (2018), using a tractor hauled mechanical pollination blower for 20 days, observed an increase of up to 46.3 times in fruit setting in trees of the clone CCN-51, compared with trees of the same clone naturally pollinated. Groeneveld et al. (2010) showed that in cacao yield is maximized by pollinating only 40% of the flowers available, instead 100% of them. Despite these successful results, other studies have reported unsuccessful outcomes. For example, Leite et al. (1990) have shown that the increase in yield potentially attained by supplementary pollination, can be offset by the physiological discard of small fruits (physiological cherrille wilt).

It has been suggested that increasing the number of pollen grains produced in the anthers of the flower can improve the pollination quality. For example, Cilas (1988), in Togo, monitoring the number of pollen grains produced in the anthers and the number of flowers pollinated, observed that when the number of pollen grains increased, there was a reduction of the number of flowers receiving no pollen ( $r = -0.41^*$ ). The author also studying two populations, one historically high and other low yielding, observed that the high yielding population had flowers receiving a higher number of pollen grains in their stigma (Pollen Rarity Index=0.75 vs 1.02, in high vs low yielding plants). Based on those results, the author suggested breeding for high pollen production. Also, Knoke, Soria and Chapman (1980), inducing pollination in cacao, observed that pods pollinated by the mistblower had less seeds compared with those naturally pollinated, i.e., 12.9 vs. 15.5 seeds/pod, respectively (Knoke, Soria and Chapman, 1980), suggesting a suboptimal number of pollen grains reaching the stigma. Therefore, increasing the number of pollen grains per flower increases the chances of higher pollination efficiency, allowing that in periods of low number of flowers or of pollinator insects, more pollen grains are transported to stigmas in each insect visit.

Here we quantified the number of pollen grains of 30 clones from different origins, used in CEPEC's cacao breeding program; some of them used as clones

or parents of hybrids in many other cacao producing countries (e.g., CCN-10, CCN-51, ICS-1, ICS-6, ICS-95, IMC-67, Sca-6, Sca-12, SIAL-169, SIC-23, TSH-516, TSH-565, TSH-1188, and UF-613). We observed a high variability for the number of pollen grains per flower, with some clones, like IMC-67 producing up to 10575 pollen grains per flower on average; while other clones, such as the Sca-6, producing only 1760 pollen grains per flower. Also, at least during the two seasons evaluated (Nov-Dec/2018 and Apr-Jun/2019), we did not observe a statistically significant effect of season, but we did find a barely significant season-by-clone interaction ( $p=0.0429$ ). Here we observed that high yielding clones such as CCN-10, CCN-51, BN-34, TSH-565, and BN-34 produce high number of pollen grains; by contrast other equally high yielding clones (in number of pods), such as Sca-6, PH-16, PH-15 and ICS-95 produce low number of pollen grains. Therefore, despite the association of pollen availability in the area and yield shown by some authors (Cilas, 1988), these results reinforce the fact that yield in cacao is not controlled only by the number of pollen grains produced. In other words, pollen production is only one of the many factors affecting yield. However, the high variability shown here among clones, for pollen number, suggests that breeding for high pollen number, facilitating both natural and artificial pollinations, is feasible.

Some studies show that, for each ovule fertilized, more than one pollen grain is needed in the stigma to maximize seed set. For example, Cruden (1977) observing several species verified that at least two to six pollen grains per ovule are needed for a maximum seed set. In apples, a minimum of five pollen grains are needed per ovule (Sedgley and Griffin, 1989). Falque, Lesdalons and Eskes (1996) observed that for maximum fruit set in cacao, at least 150 pollen grains are needed for each pod formed. Considering that cacao ovary has around 50 ovules, this results in a proportion of three pollen grains per ovule. This number (150 pollen grains), however, as pointed out by Falque, Lesdalons and Eskes (1996), citing some field studies in Africa and in Latin America, is lower than commonly observed in the field, under natural (insect) pollination. This was shown, for example, in the work by Mena-Montoya et al. (2020), in Ecuador, who found an average of 16 pollen grains in the stigma of seven evaluated clones. Few studies have estimated the

number of pollen grains in cacao, particularly for well identified germplasms. Massaux et al. (1976), in a preliminary work of pollen transport conducted in Cameroon, estimated 14100 pollen grains per flower. Cilas (1988), in Togo, and using a mixture of hybrid trees, observed an average of 878 pollen grains per flower, ranging over time from 540 to 1310 pollen grains. Godoy et al. (2009), in Brazil, using two cacao genotypes, one self-compatible (CCN-51) and one self-incompatible (TSH-1188), observed 2288 and 2424 pollen grains/flower, respectively. In our study, the average number of pollen grains (4698) was higher than those found in previous studies, except the 14100 pollen grains per flower found by Massaux et al. (1976). Some of the clones used in our study (e.g., IMC-67) had values not much far from the value estimated by Massaux et al. (1976). However, in the present study CCN-51 and TSH-1188 had more pollen (4320 and 6283 pollen grains, respectively) than those observed by Godoy et al. (2009). Mena-Montoya et al. (2020), instead counting the number of pollen grains in the anthers, counted those deposited in the stigma and observed they ranged from 10 to 29 in the seven clones. This of course, can be associated to a variation for insect attraction to the flower of those clones, but also to the number of pollen grains available in the anthers. In Mena-Montoya et al. (2020), unfortunately the number of pollen grains in the anthers was not counted, but CCN-51 showed the second highest number of pollen grains in the stigma (around 19) in their study. In this study it is among those with a high number of pollen grains in the anthers.

In Brazil, many farmers are using supplementary pollination, either by hand or mechanically, with successful increase in yield. Also, some studies on supplementary pollination have shown increments in fruit setting of the order of up to five times that of naturally pollinated plants (Soria, 1974; Knoke, Soria and Chapman, 1980). The use of a pollinizer clones, having high number of pollen grains per anther, can increase the efficiency of the pollination process, either by allowing to dispense more pollen grains in the stigma or by reducing the number of pollen donor flowers used to provide the proper number of pollen grains. Data from the present study showed that the clones IMC-67, ICS-1, CCN-10, ICS-9 and BN-34 produce more than 7000 pollen grains per flower and, therefore, are potential pollinizers to be utilized in manual pollination

programs in cacao. Clone CCN-10, for instance, is one of the most currently used in Brazil by farmers with that purpose. That clone, besides the high number of pollen grains produced, it also is claimed to increase the bean size by the effect of pseudo-xenia (phenotypic expression in the  $F_0$  generation, in the cotyledons, instead in the endosperm as in xenia).

Considering the results found here for the number of pollen grains, some clones can be more benefited by mechanic pollination. For example, Knoke, Soria and Chapman (1980), using a mistblower to induce pollination in cacao observed that the pods pollinated by the blower had less seeds than those naturally pollinated, despite the higher number of pods in the first, suggesting a suboptimal number of pollen grains reaching the stigmas. Using clones with a high number of pollen grains in their anthers can reduce this effect, by releasing more pollens in the blowing process. Also, it is well known in cacao (e.g., Reffye et al., 1978) that some clones do not tolerate a small number of seeds (fertilized ovules). Therefore, in principle the effect of the mechanical pollination on both the number of seeds per pod and the number of pods can be further improved by using clones with high number of pollen grains in their anthers. If that is the case, among the high yielding and widely planted cacao clones in Brazil, BN-34, CCN-10 and CCN-51 (having more 6283 pollen grains/flower), can be benefited more from blower pollinations than clones such as PH-15 and PH-16 which have a smaller number of pollen grains in their anthers (less than 2027 pollen grains/flower).

In this study it was additionally observed that the average number of pollen grains per flower in the 30 clones investigated was not correlated with the number of ovules per ovary or flower of those same clones ( $R^2=0.11$ ). Therefore, the number of pollen grains in cacao can be increased by breeding, without reducing the number of ovules. The number of ovules observed here (44.5 to 66.5, average for all clones = 53.1) was quite similar to those observed by other authors. Maharaj et al. (2011) found average values ranging from 46.0 to 66.5 ovules per ovary; Lachenaud (1991) found values ranging from 40 to 65 ovules and Cilas, Machado and Motamayor (2010), evaluating 110 clones, found values ranging from 38 to 65 ovules per ovary.

Regarding to mating system in cacao, studies have focused on quantifying the frequency of selfing/

outcrossing as reported by Harland and Flechville (1927), Voelcker (1940), Posnette (1950) and Yamada and Guries (1998), but another approach have also been suggested by Cruden (1977) and it was tested in this study. Cruden (1977), after evaluating around 100 plant species, proposed that the proportion of pollen grains to ovules (pollen-ovule ratio) was a good indicator of the mating system of that species, reflecting the pollination efficiency. In cacao, despite of the many studies on the frequency of outcrossing using phenotypic and molecular markers (Harland and Flechville, 1927; Voelcker, 1940; Posnette, 1950; Yamada and Guries, 1998), there is only one study estimating the pollen-ovule ratio and using only two germplasms (Godoy et al., 2009). The average pollen-ovule ratio observed in the present study was 88.0, ranging from 30.7 in Sca-6 to 186.2 in ICS-1. Therefore, based on Cruden's (1977) scale, cacao should be classified between a facultative and an obligate autogamous species. Godoy et al. (2009), estimating the pollen-ovule ratio in two cacao clones, one self-compatible (CCN-51) and one self-incompatible (TSH-1188), observed values of 7.2 and 7.5 for these clones, respectively, suggesting incorrectly that cacao should be classified as obligate autogamous by Cruden's scale. With these pollen-ovule values, cacao should be better classified as cleistogamous, instead obligate autogamous. In addition, Godoy et al. (2009) also did not find any statistical differences between the two clones, even though one of them was self-compatible and another self-incompatible. Similarly, we also compared the pollen-ovule ratio averages of 23 self-compatible clones with that of seven self-incompatible ones, and we did not find statistical differences between those two groups of clones, neither for the pollen-ovule ratio (87.4 vs. 90.1, respectively), nor for the number of pollen grains (4467 vs. 5121, respectively).

The results of mating system observed in the present study, as well as those found by Godoy et al. (2009), based on the pollen-ovule rate, suggesting a cleistogamic or facultative autogamous system for cacao, respectively, disagree of results based on selfing/outcrossing rates. For example, Harland and Flechville (1927), in Trinidad, using the phenotypic marker axil spot, found an outcrossing rate of 30%. Posnette (1950), in Ghana, using axil spot and albino leaves traits, found an outcrossing rate of 18% to 43%. Moreover, as pointed out before, cacao flowers have



several physiological and morphological barriers to self-pollination, including self-incompatibility (Knight and Rogers, 1955; Cope, 1962), stamens enclosed in petal hoods (Knoke, Soria and Chapman, 1980), protandry (Claus et al., 2018) and heterostyly.

In summary, many studies have pointed a pollination deficit in cacao, with many flowers receiving little or no pollen grains in the pistil (Parvais, Reffye and Lucas, 1977; Reffye et al., 1978; Tovar and Ortis, 1991; Lachenaud, 1994; Mena-Montoya et al., 2020). Complementary pollination has been successful in reducing the yield gaps from poor pollination (Soria, 1974; Groeneveld et al., 2010; Toledo-Hernández, Wanger and Tschardt, 2017; Nakayama, 2018). In addition, some authors (Cilas, 1988) have observed that increasing the number of pollen grains in the anthers, increases the number flowers receiving enough pollen for fruit setting. Therefore, breeding for high number of pollen grains should be pursued; particularly considering that, as observed in the present study, there is a large variability for the number of pollen grains per flower among germplasm available to cacao breeders. Also, comparing the results of pollen-ovule ratios found in this study with the mating system classes proposed by Cruden (1977), cacao should be facultative or obligate autogamous. However, with high rates of crossing observed in cacao (Harland and Flechville, 1927; Voelcker, 1940; Posnette, 1950; Yamada and Guries, 1998), this apparently is not the case.

### Conclusions

There is genetic variability among clones for the number of pollen grains produced per flower, allowing breeding for this trait and eventually reducing yield gaps due to poor pollination. Despite the interaction clone x season, on average clones IMC-67, ICS-1, CCN-10, ICS-9 and BN-34 produced more than 7000 pollen grains per flower, being good candidates for breeding aiming high pollen production and also as pollenizers in supplementary pollination programs. We also observed variability for the number of ovules and for the pollen-ovule ratio. This ratio was not different in self-compatible and incompatible clones. Overall, this study contributes information to breeders interested in developing varieties with more efficient pollination mechanisms and higher number of beans, contributing to increased yield production.

### Acknowledgements

The authors are thankful to *Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia* (Fapesb) for providing the Beginner on Science scholarship to the second author, and also to Drs. Augusto Roberto Sena Gomes and Raúl René Valle for reviewing this paper.

### Literature Cited

- ALVIM, P. T. 1984. Flowering of cocoa. *Cocoa Growers' Bulletin* 25:23-31.
- BURD, M. 1994. Bateman's principle and plant reproduction: The role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review* 60:83-139.
- CILAS, C. 1988. Etude de la pollinisation naturelle du cacaoyer au Togo et ses implications sur la production. In: International Cocoa Research Conference, 10. Proceedings. Santo Domingo, Dominican Republic, 1987. pp.283-288.
- CILAS, C.; MACHADO, R.; MOTAMAYOR, J. C. 2010. Relations between several traits linked to sexual plant reproduction in *Theobroma cacao* L.: number of ovules per ovary, number of seeds per pod, and seed weight. *Tree Genetics & Genomes* 6:219-226.
- CLAUS, G. et al. 2018. Challenges in cocoa pollination: the case of Côte d'Ivoire. In: Mokwala, P.W. *Pollination in plants*. London, IntechOpen. pp.39-58.
- COPE, F. W. 1962. The mechanisms of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 17:157-182.
- CRUDEN, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- DAFNI, A. 1992. *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford, Oxford University Press. 250p.
- FALQUE, M.; LESDALONS, C.; ESKES, A. B. 1996. Comparison of two cacao (*Theobroma cacao* L.) clones for the effect of pollination intensity on fruit set and seed content. *Sexual Plant Reproduction* 9:221-227.
- GODOY, P. R. E. et al. 2009. Performance polínica em cacaueiros (*Theobroma cacao* L.)

- autocompatíveis e autoincompatíveis. *Brazilian Journal of Botany* 32:617-620.
- GROENEVELD, J. H. et al. 2010. Experimental evidence for stronger cacao yield limitation by pollination than by plant resources. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12:183-191.
- HARLAND, S. C.; FRECHVILLE, G. E. 1927. Natural crossing and the genetics of axil spot in cacao. *Genetica* 9:279-288.
- KNIGHT, R.; ROGERS, H. H. 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity* 9:69-77.
- KNOKE, J. K.; SORIA, S. J.; CHAPMAN, R. K. 1980. Cacao pollination with spray equipment, in Costa Rica. *Revista Theobroma* 10:213-224.
- LACHENAUD, P. 1991. Facteurs de la fructification chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). Influence sur le nombre de graines par fruit. Doctoral dissertation, Paris, Institut National Agronomique Paris-Grignon. 186p.
- LACHENAUD, P. 1994. Variations in the number of beans per pod in *Theobroma cacao* L. in the Ivory Coast. I. The role of pollen. *Journal of Horticultural Science* 69:1123-1129.
- LACHENAUD, P.; MOSSU, G. 1985. Etude comparative de l'influence de deux modes de conduite sur les facteurs du rendement d'une cacaoyère. *Café Cacao Thé* 29:21-30.
- LEITE, R. M. O.; VALLE, R. R.; SILVA, C. P.; DIAS, B. R. 1990. Relações entre a floração e a frutificação do cacaueiro. *Agrotropica* 2:11-16.
- MAHARAJ, K. et al. 2011. Trinidad selected hybrids: an investigation of the phenotypic and agro-economic traits of 20 selected cacao cultivars. *Tropical Agriculture* 88:175-85.
- MASSAUX, F. et al. 1976. Etude du transport du pollen de cacaoyer par marquage au <sup>32</sup>P. *Café Cacao Thé* 20:163-170.
- MENA-MONTOYA, M. et al. 2020. Pollen flow of *Theobroma cacao* and its relationship with climatic factors in the central zone of the Ecuadorian litoral. *Bioagro* 32:39-48.
- NAKAYAMA, K. 2018. Efeitos da ventilação na polinização do cacaueiro. *Agrotropica* 30:195-204.
- PARVAIS, J. P.; REFFYE, P.; LUCAS, P. 1977. Observations sur la pollinisation libre chez *Theobroma cacao* analyse mathématique des données et modélisation. *Café Cacao Thé* 21:253-262.
- POSNETTE, A. F. 1950. The pollination of cacao in the Gold Coast. *Journal of Horticultural Science* 25:155-163.
- REFFYE, P.; PARVAIS, J. P.; MOSSU, G.; LUCAS, P. 1978. Influence des aléas de la polinisation sur les rendements du cacaoyer - modele mathématique et simulation. *Café Cacao Thé* 22:254-274.
- SORIA, S. J. 1974. Indução da produção em cacaueiro com uso de atomizador motorizado portátil na Bahia, Brasil. *Revista Theobroma* 4:3-13.
- SORIA, S. J.; WIRTH, W. W. 1974. Identidade e caracterização taxonômica preliminar das mosquinhas *Forcipomyia* (Diptera, Ceratopogonidae) associadas com a polinização do cacaueiro na Bahia. *Revista Theobroma* 4:3-12.
- SAS INSTITUTE INC. 2004. SAS/STAT 9.1 User's guide. Cary, NC, SAS Institute Inc. 5121 p.
- SEDGLEY, M.; GRIFFIN, A. R. 1989. Sexual reproduction of tree crops. Academic Press, New York. 378p.
- TOLEDO-HERNÁNDEZ, M.; WANGER, T. C.; TSCHARNTKE, T. 2017. Neglected pollinators: can enhanced pollination services improve cocoa yields? A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247:137-148.
- TOVAR, G.; ORTIZ, M. 1991. Evaluación de algunos componentes del rendimiento en una plantación de híbridos de cacao de 5 años de edad en la región de Granada (Meta). *Agronomía Colombiana* 8:105-115.
- VOELCKER, O. J. 1940. The degree of cross pollination in cacao in Nigeria. *Tropical Agriculture* 17:184-186.
- YAMADA, M. M.; GURIES, R. P. 1998. Mating system analysis in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agrotropica* 10:165-176.

## POTENTIALLY TOXIC ELEMENTS IN SOILS AND CACAO BEANS IN AGROFORESTRY SYSTEMS OF BAHIA, BRAZIL

*Quintino Reis de Araujo*<sup>1,2</sup>, *James Nascimento Gattward*<sup>2</sup>, *Jôsie Cloviane de Oliveira Freitas*<sup>3</sup>,  
*Stéphane Sacramento de Almeida*<sup>2</sup>, *Virupax Chanabasappa Baligar*<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Cacao Research Center (CEPEC) at the Executive Commission for the Cacao Farming Plan (CEPLAC), 45600-970 Ilhéus, Bahia, Brazil; <sup>2</sup>Department of Agricultural and Environmental Sciences (DCAA) at the State University of Santa Cruz (UESC), 45662-000 Ilhéus, Bahia, Brazil; <sup>3</sup>Agrarian Sciences and Sustainability Institute at the State University of Goiás, 73900-000 Posse, Goiás, Brazil; <sup>4</sup>USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD 20705 Maryland, USA.

Cacao farming has made many advances in technology and production systems with the goal of increasing final productivity. However, in some cases, the indiscriminate and/or non-technical use of certain agricultural inputs may compromise the quality of the cacao products, like the presence of heavy metals, or potentially toxic elements, such as cadmium (Cd), barium (Ba), copper (Cu) and lead (Pb), compounds of high toxicity and mostly mutagenic and carcinogenic to humans. This work intends to analyze the influence of local lithology and components of agricultural management on the levels of heavy metals in the soil and cacao beans, looking ahead for future evaluations on the consequences of cacao consumption and on the quality demands of the market. The evaluations were made in 15 cacao cropping systems in Southeast Bahia, Brazil. In these cropping systems, cacao was grown under an agroforestry system locally called 'cabruca' or under the shade of rubber or erythrina trees. The results suggest that agricultural practices tend to increase the presence of the heavy metals Cu and Ba in the surface soil layers, reflecting the influence of agricultural inputs, and that the higher content of Cd and Pb in subsurface soil layers reflects the influence of lithology processes. Young soils tend to have higher contents of Cu, Cd and Pb than older soil types. Cacao clone PH-16 accumulated higher Ba than beans of Comum 'forastero' cacao; soil Ba had direct correlation with Ba in cacao beans and inverse correlation with copper. Soil cadmium tended to have a direct correlation with barium in cacao beans.

**Key words:** Heavy metals, tropical soils, *Theobroma cacao*, cacao bean quality, toxic elements.

**Elementos potencialmente tóxicos em solos e amêndoas de cacau em sistemas agroflorestais da Bahia, Brasil.** O cultivo do cacau tem passado por muitos avanços em tecnologia e sistemas de produção com objetivo de aumentar a produtividade final. Contudo, em alguns casos, o uso indiscriminado de certos produtos agrícolas pode comprometer a qualidade dos produtos de cacau, como a presença de metais pesados, ou elementos potencialmente tóxicos, como o cádmio (Cd), bário (Ba), cobre (Cu) e chumbo (Pb), compostos de alta toxicidade e em sua maioria mutagênicos e carcinogênicos em seres humanos. Este trabalho pretende analisar a influência da litologia local e de componentes do manejo agrícola nos níveis de metais pesados em solos e amêndoas de cacau, fazendo estimativas para futuras avaliações das consequências do consumo de cacau e das demandas do mercado por qualidade. As avaliações foram realizadas em 15 cultivos de cacau no Sudeste da Bahia, Brasil. Nestes cultivos, cacau foi cultivado em um sistema agroflorestal localmente chamado 'cabruca' ou sob a sombra de seringueira ou eritrina. Os resultados sugerem que as práticas agrícolas tendem a aumentar a presença dos metais pesados Cu e Ba nas camadas superficiais do solo, refletindo a influência dos produtos agrícolas, e dos metais Cd e Pb em subsuperfície, refletindo a influência dos processos litológicos. Solos mais jovens tendem a ter maiores teores de Cu, Cd e Pb do que solos mais velhos. O clone de cacau PH-16 acumulou mais Ba em amêndoas do que o cacau comum; teores de Ba no solo tiveram relação direta com o teor de Ba nas amêndoas e relação inversa com cobre. O teor de cádmium no solo apresentou relação direta com o teor de bário em amêndoas.

**Palavras-chave:** Metais pesados, solos tropicais, *Theobroma cacao*, qualidade de amêndoas de cacau, elementos tóxicos.

## Introduction

The definitions of “heavy metals” have been modified by several authors (Duffus, 2002). Denominations such as “toxic metals” are also used, although this is still not a precise terminology, since it is the excess that generates toxicity, and some of them, like Cu, Fe, and Zn, are highly dense, can cause toxicity, but are nutrients for humans and plants. Thus, heavy metals can be better described as metal and metalloids associated with environmental pollution, toxicity and adverse effects on biota (Ali and Khan, 2018). However, as this term is considered as part of the language of science (Hubner, Astin and Herbert, 2010), it will be still used in this article.

The metals present in the soil can be classified according to their origin: i) lithogenic: metals originating from a source material; ii) pedogenic: lithogenic metals that have undergone pedogenetic processes; iii) anthropogenic: metals introduced in the soil composition by means of anthropic actions (Kabata-Pendias and Mukherjee, 2007).

The type of rock on which the soil was developed and, mainly, the mineral constituents of its source material have a direct influence on the background levels of metals in the soil, this explains the metal contents found in deeper soil layers. Industrial emissions, effluents, sewage sludge and soil conditioners also contribute to the increase of potentially toxic elements in the soil (Nicholson et al., 2003), this justifies the values found in the top layer of the soil.

Heavy metals can be absorbed by plant roots through specific and/or non-specific transport proteins and transported in the transpiration stream in the xylem from the roots to transpiring shoot parts (Page et al., 2006). After ascension if there is no further redistribution, the heavy metals accumulate primarily in photosynthetically active (transpiring) leaves and can induce oxidative stress, reduce chlorophyll content, and slow down photosynthesis rate (Mourato et al., 2015). The symplastic transport via phloem allows redistribution of absorbed essential and non-essential heavy metals within the plants, depends on the actual source/sink network and on the mobility of each heavy metal.

Cacao bean is the raw material of chocolate, one of the most desired foods in the world. The manufacturing of chocolate involves established strict quality standards, resulting in a strong pressure on the cacao production chain. In the cacao cultivated areas, therefore, an antagonism arises: while there is a challenge of increasing the productivity to fulfil the beans demand, there is a challenge of adding values to cacao production. As the quality of agricultural products is influenced by the naturally occurring contaminants (Edelstein and Ben-Hur, 2018), as well as by contaminants from agricultural inputs (Barański et al., 2014), the pressure on the quality of the cultivated land with cacao trees can be one way of controlling the quality of cocoa beans (Araujo et al., 2014).

Because of global problems in human health through food contamination, the issue of heavy metals in cacao beans is taken very seriously. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) labels the chemical elements barium (Ba), cadmium (Cd), copper (Cu) and lead (Pb) as elements that pose a risk to human health, since they are potentially toxic, and humans are frequently exposed to them (ATSDR, 2019). Understanding factors that affect the presence of heavy metals in cacao production systems can support the development of strategies to mitigate the occurrence of these elements in cacao-based foods.

The objective of this study was to evaluate the presence of potentially toxic elements in soils of 15 cacao agroforestry plantations in the Southeast of Bahia state, Brazil, and further assess the interrelationships between heavy metals in soil and their accumulation in cacao beans.

## Materials and Methods

### Evaluated cacao cropping systems (sites)

From Southeast Bahia major cacao growing region, 15 diversified agroforestry-based cacao farming systems were selected for this study (Table 1 and 2). These field sites cover most representative environments suitable for non-irrigated cacao cropping and include some of the most productive land areas of Brazil.



Table 1. Cacao cropping systems: location, tree composition and soil type of the studied sites (based on Araujo et al., 2013)

Site	Coordinates	Soil Taxonomy	Cropping system	Shade tree/hectare (¹)
1	13° 51' 08" S39° 17' 54" W	Typic Hapludox	Cacao x Rubber tree	400 (rb)
2	13° 46' 07.0" S39° 17' 52.0" W	Typic Hapludox	Cacao x Rubber tree	350 (rb)
3	13° 40' 30" S39° 14' 27" W	Hapludox	Cacao x Rubber tree	150 (rb)
4	13° 45' 21" S39° 20' 25" W	Hapludult	Cabruca	60
5	13° 44' 38" S39° 30' 10" W	Hapludult	Cacao x Erythrina	60 (er)
6	16° 29' 02" S39° 23' 56" W	Hapludult	Cacao x Rubber tree	400 (rb)
7	15° 23' 15.1" S39° 25' 48.6" W	Hapludult	Cabruca	35
8	15° 23' 08" S39° 26' 04" W	Hapludult	Cabruca	35
9	15° 17' 04" S39° 28' 43" W	Hapludult	Cabruca	35
10	14° 31' 14" S39° 15' 45" W	Hapludalf	Cabruca	50
11	14° 51' 36" S39° 14' 42" W	Dystropept	Cabruca	35
12	14° 42' 40.9" S39° 20' 13.2" W	Hapludult	Cabruca	88
13	14° 51' 47" S39° 06' 47" W	Hapludox	Cabruca	70
14	14° 51' 47" S39° 06' 47" W	Hapludox	Cabruca	70
15	14° 46' 08" S39° 13' 26" W	Hapludalf	Cabruca	60

(¹) (rb) = Rubber tree (*Hevea* sp); (er) = Erythrina (*Erythrina* sp); Others, on cabruca = native tropical trees.

Table 2 - Summary of the cropping systems methods and lithology of the studied sites

Site	Liming (1)	Fertilization (2)	Cropping Aspects			Lithology (*)	Main Minerals (*)
			Disease control	Pest control	Weed Control		
1	Y	M	Copper Oxide®	Malathion®	Glifosate®	Enderbite; Metatrondjemite Metasienite; Metamonzonite; Metamonzodiorite; Metagabronorite.Metasienite; Metamonzonite; Metamonzodiorite; Metagabronorite.	Quartz, Plagioclase, Hipertsenium, Calcium pyroxenium, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende Labradorite, Anorthite, Andesine, microcline, Potassium feldspar, hornblende, biotite, Hipertsenium, Quartz, Augite Labradorite, Anorthite, Andesine, microcline, Potassium feldspar, hornblende, biotite, Hipertsenio, Quartz, Augite
2	Y	M and O	-	Thiodan®, Decis® and Tamaron®	Roundaup®	Enderbite; Metatrondjemite Enderbite; Charnockite	Quartz, Plagioclase, Hipertsenium, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende Quartz, Microcline, Hipertsenium, Oligoclase, Augite, Magnetite, Biotite, Hornblende, Plagioclase, Calcium pyroxene, Potassium feldspar
3	Y	M and O	-	Thiodan®, Decis® and Tamaron®	Roundaup®	Conglomeratic Sandstone; Sandy Claystone; Metagabronorite; Orto granulite.	Aluminosilicates, Quartz, Feldspar Potassium feldspar, Plagioclase, Quartz, Augite, Hipertsenium
4	Y	M and O	-	Thiodan®, Decis® and Tamaron®	Roundaup®	Metagabronorite; Orto granulite. Quartz Syenite; Syenite.	Potassium feldspar, Plagioclase, Quartz, Augite, Hipertsenium Potassium feldspar, Quartz, Albite, Biotite, Oligoclase, Hornblende, Orthoclase, Microcline, Augite
5	-	M	-	Roundaup®	-	Enderbite; Metabasalt; Metadiorite; Metagabbro; Metanorite. Enderbite; Metabasalt; Metadiorite; Metagabbro; Metanorite.	Quartz, Hipertsenio, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende, Augite, Labradorite, Bytownite Quartz, Hipertsenio, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende, Augite, Labradorite, Bytownite

Continuation Table 2.

6	-	M and O	-	Decis®	Roundaup®	Monzodiorite; Monzonite; Syenite; Metadiorite; Granitic Gneiss; Tonalitic Orthogneiss.	Biotite, Hornblende, Augite, Quartz, Hipertsenium, Andean, Microcline, Albite, Oligoclase; Hornblende, Biotite, Augite, Microcline, Albite, Oligoclase, Andean, Quartz
7	Y	M	Dithane®, Carbomax®, Endosulfan®	Thamaron®, Malathion®, Parathion®	Roundaup®	Metadiorite; Granitic Gneiss; Tonalitic Orthogneiss. Monzodiorite; Monzonite; Syenite	Hornblende, Biotite, Augite, Microcline, Albite, Oligoclase, Andean, Quartz Biotite, Hornblende, Augite, Quartz, Hipertsenium, Andean, Microcline, Albite, Oligoclase
8	-	M	Dithane®, Carbomax®, Endosulfan®	Thamaron®, Malathion® and Parathion®	Roundaup®	Enderbite; Metatrandhjemitite; Metasienite; Metamonzonite; Metamonzodiorite; Metagabronorite.	Quartz, Plagioclase, Hipertsenium, Calcium pyroxenium, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende Labradorite, Anorthite, Andesine, microcline, Potassium feldspar, hornblende, biotite, Hipertsenium, Quartz, Augite
9	-	M	-	Thiodan®, Decis®, DiptereX®	Glifosate®	Metasienite; Metamonzonite; Metamonzodiorite; Metagabronorite. Enderbite; Metatrandhjemitite	Labradorite, Anorthite, Andesine, microcline, Potassium feldspar, hornblende, biotite, Hipertsenio, Quartz, Augite Quartz, Plagioclase, Hipertsenium, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende
10	Y	M	-	Decis®	Roundaup®	Enderbite; Charnockite Conglomeratic Sandstone; Sandy Claystone.	Quartz, Microcline, Hipertsenium, Oligoclase, Augite, Magnetite, Biotite, Hornblende, Plagioclase, Calcium pyroxene, Potassium feldspar, Aluminosilicates, Quartz, Feldspar
11	Y	O	Sucrose and Fermented soup	Manipueira (Cassava)	-	Metagabronorite; Ortogranulite. Metagabronorite; Ortogranulite.	Potassium feldspar, Plagioclase, Quartz, Augite, Hipertsenium Potassium feldspar, Plagioclase, Quartz, Augite, Hipertsenium
12	-	M	Chemical	Cevin 500®, Stron®	Roundaup®	Quartz Syenite; Syenite.	Potassium feldspar, Quartz, Albite, Biotite, Oligoclase, Hornblende, Orthoclasiun, Microcline, Augite
13	Y	M	-	Decis®	-	Enderbite; Metabasalt; Metadiorite; Metagabbro; Metanorite. Enderbite; Metabasalt; Metadiorite; Metagabbro; Metanorite.	Quartz, Hipertsenio, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende, Augite, Labradorite, Bytownite, Quartz, Hipertsenio, Potassium feldspar, Biotite, Hornblende, Augite, Labradorite, Bytownite
14	Y	M	-	Decis®	-	Monzodiorite; Monzonite; Syenite; Metadiorite; Granitic Gneiss; Tonalitic Orthogneiss.	Biotite, Hornblende, Augite, Quartz, Hipertsenium, Andean, Microcline, Albite, Oligoclase; Hornblende, Biotite, Augite, Microcline, Albite, Oligoclase, Andean, Quartz
15	-	-	-	-	-	Metadiorite; Granitic Gneiss; Tonalitic Orthogneiss.	Hornblende, Biotite, Augite, Microcline, Albite, Oligoclase, Andean, Quartz

(1) Y = yes; (2) M = mineral; O = organic; (\*) Source: Geological map of Brazil to the millionth, sheet Sd-24 (CPRM, 2004). Multimedia Encyclopedia of Minerals and Atlas of Rocks (Machado et al., 2003).

### Cropping systems and genetic material

Cacao cropping systems selected for this study encompass: 'cabruca' (cacao trees under shade of thinned heterogeneous native trees), agroforestry system (cacao inter cropped with Rubber trees) and conventional (cacao under homogeneous shade, mainly of *Erythrina glauca* trees).

The cacao accession in the majority of selected cacao cropping systems was the genotype PH-16, a hybrid resulting from the crossing between the mother genotype PA-150 which belongs to the Marañón cluster, Parinari IV subcluster, also classified as the Peruvian Upper Amazon Forastero genetic group, and the father genotype ICS 1 which belongs to the Trinitario group, a selection performed by the Imperial College of Tropical Agriculture in Trinidad and Tobago on hybrids resulted from a crossing between the Criollo "native" of Trinidad and Tobago and Forastero genotypes brought from Venezuela (Motamayor et al., 2008; Motilal and Sreenivasan, 2012; Yang et al., 2013; Turnbull and Hadley, 2020). However, two cropping systems (14 and 15) were planted with the Forastero type, Comum cacao, a typical cacao genotype cultivated in Southeast of Bahia state, Brazil for over 200 years, which was used to start plantations in African, South Asian and Oceanian countries (Santos et al., 2015).

### Soil Sampling and Method of Analysis

In each study site approximately 1 to 2 hectares of area was selected and subdivided into three equal collection areas, which were characterized by similar soil types and with designated cropping system. From each collection area, 10 discrete samples were collected at random and thoroughly mixed to obtain one uniform homogeneous composite sample. At each of the cropping systems, 3 composite soil samples were collected from 0-15 cm (D1) and 35-50 cm (D2) depths.

Elemental analysis in the soil samples were done by extracting soils with aqua regia (3:1 HCl/HNO<sub>3</sub>) using the method described by McGrath and Cunliffe (1985), and elements were quantified by inductively coupled plasma spectrometry.

### Pod Sampling, bean fermentation and bean analysis

Pods were collected, during the spring of 2008, within 50 m from the soil identifying points, in the three

collection areas. Thus, the origin of each sample of pods and beans corresponds to a properly identified and classified soil in each study site. Each sample (three for each study site) corresponds to 50 mature cacao pods. Considering all orchards and replicates, 45 composite samples of fruits were obtained for fermentation.

Styrofoam boxes (30 x 20 x 30 cm) with a capacity of approximately 8 kg were used and cacao beans were fermented with mucilage which corresponded to 50 cacao pods. The fermentation process of cacao beans occurred for 168 hours (7 days) with peak temperature of 51°C, occurred on the 3rd day. During the fermentation process, after 48 hours, for oxygenation beans were mixed on daily basis. After being fermented, cacao beans were continuously dried in forced ventilation oven with temperatures ranging between 35 and 45°C for 192 hours (8 days). After drying, the cacao beans contained approximately 7% of moisture. The dry cacao beans were manually peeled with tweezers for a complete separation between the seed coat and endosperm, and only the endosperm (cotyledons and embryo) was milled for chemical analysis. In this study the term dry cacao beans refer to the endosperm of dry cacao beans.

Beans were ground in Wiley mill and passed through 2 mm mesh sieve. Bean samples were digested in nitric-perchloric acid and the elements in extractants were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) based on the method EPA-3050B (USEPA, 1996).

### Statistical analysis

The experiment was designed in a Completely Randomized Block Design (CRBD). The data was submitted to analysis of variance using SAS. The means were compared using the Scheffé test ( $p < 0.05$ ) using R.

## Results and Discussion

In different cropping systems, at both soil depths heavy metal contents varied significantly (Table 3). The soil Cu content was higher at D1 than in D2 in 4 out of 15 cropping systems, in only one cropping system was recorded Cu content higher in D2, and in the remaining 10 sites there were no statistically significant differences between the studied soil layers (Table 3).

Table 3. Average content of the metals Cu, Cd, Ba, and Pb (mg kg<sup>-1</sup>) in soil, at two depths in 15 sites in Southeast Bahia, Brazil

Site	Cu		Cd		Ba		Pb	
	D1*	D2*	D1	D2	D1	D2	D1	D2
1	35.95 BC a	21.35 B b	2.10 AB a	1.35 CD b	26.10 C a	19.40 C a	108.20 A a	103.70 AB b
2	10.45 DE a	11.30 B a	0.95 AB a	1.35 CD a	37.85 BC b	41.90 C a	60.90 BCDE b	93.20 ABCD a
3	32.20 C a	28.05 B b	1.35 AB a	1.40 BCD a	5.15 C a	5.40 C a	93.05 AB a	98.00 ABC a
4	25.40 CD a	18.65 B a	1.1 AB a	0.35 D a	23.65 C a	13.70 C a	48.45 BCDE a	52.00 DE a
5	8.35 DE a	9.30 B a	0.6 B b	1.45 BCD a	99.70 BC a	131.65 BC a	24.05 DE b	69.80 BCDE a
6	3.10 E a	2.80 B a	0.6 B b	1.00 CD a	9.00 C a	9.55 C a	23.00 E b	57.70 CDE a
7	22.65 CD a	19.50 B a	1.55 AB a	1.25 CD a	41.20 BC a	30.40 C b	50.80 BCDE a	51.60 DE a
8	95.60 A a	21.50 B b	1.75 AB a	1.55 BC a	218.55 B a	91.35 BC b	70.85 ABCD a	71.95 BCDE a
9	35.70 BC a	14.50 B b	2.00 AB a	1.55 BC a	28.15 BC a	18.40 C a	81.10 AB a	82.05 ABCDE a
10	20.75 CDE a	20.95 B a	1.75 AB a	1.85 BC a	128.55 BC a	101.70 BC b	58.55 BCDE b	94.05 ABCD a
11	54.35 B b	115.40 A a	2.35 AB b	3.85 A a	58.25 BC a	57.35 C a	70.60 ABCD b	125.50 A a
12	32.85 C a	25.65 B a	2.95 A a	2.55 B a	628.85 A a	358.80 AB b	77.05 ABC a	78.35 BCDE a
13	6.75 DE a	8.60 B a	0.6 B a	0.75 CD a	9.50 C a	6.80 C b	30.10 CDE a	36.45 E a
14	6.75 DE a	8.60 B a	0.6 B a	0.75 CD a	9.50 C a	6.80 C b	30.10 CDE a	36.45 E a
15	20.40 CDE a	15.10 B a	1.40 AB a	1.75 BC a	524.60 A a	569.10 A a	46.30 BCDE b	73.10 BCDE a

\* D1 = 0-15 cm; D2 = 35-50 cm. Means with the same letter are not different by Scheffé Test 5%, capital letters for means among lines; small letters for means between columns for each studied element.

Such higher Cu accumulation in D1 layer is possibly related to the adopted cropping method (Table 2). The soil Cu content at Site 8 was nearly four times higher in D1 compared to D2, suggesting high effect of anthropogenic actions in this site (Table 2 and 3). This corroborates with the findings of Reboredo et al. (2018), who stated that the high use of fertilizers, fungicides, herbicides, and insecticides can increase the soil metal contents. In addition, the high affinity of Cu by organic matter (Lockwood et al., 2015), a soil fraction usually more present in the surface layer of the soil, can explain the high accumulation of this element in D1. In organic matter, Cu is adsorbed by humic and fulvic acids forming stable complexes (Medina et al., 2017).

Although the Cu content was higher in D1 in many of the cropping systems, at site 11 the Cu content was more than twice the level in D2 (Table 3 and Figure 1). Site 11 has a young soil (Dystropept), a soil with primary minerals and rocks usually less than two meters from the surface, suggesting the effect of lithology. In addition, site 11 is organically farmed and has no Cu inputs received through conventional agricultural practices, that usually leads to accumulation of Cu at the surface soil layer. However, to state that anthropogenic activities promote higher Cu content in D1 than in D2 in cacao agroforestry

systems, further studies including more organic cropping systems are needed.

Especially in a forest system, it is expected that the soil heavy metal content in D2 will highly correlate with the content in D1, due to the process called biological uplift, where plant available metals are absorbed in deeper soil layers and deposited on the soil surface through litterfall (Blaser et al., 2000; Starr et al., 2003; Bern, Townsend and Farmer, 2005; Kraepiel et al., 2015). However, biological lift is reported as being variable among heavy metals in the forest environment (Kraepiel et al., 2015) and is affected by the differential effect of the biosphere on the heavy metals biogeochemical cycling (Reimann, Fabian and Flem, 2019). A low positive correlation was recorded between soil Cu content in D1 and D2 (Table 4), which suggests the effect of unnatural factors sourcing Cu, that occurred differentially among the sites (Table 2), and differentially affect Cu content in D1 and D2, resulting in reduced correlation. Cu is the only plant nutrient among the evaluated elements in the current study, it is accumulated in cacao beans more than Cd, Ba and Pb (Table 5) and it is highly exported through cacao harvesting which possibly interfere in the edaphic system equilibrium, besides the effect of other anthropogenic activities.



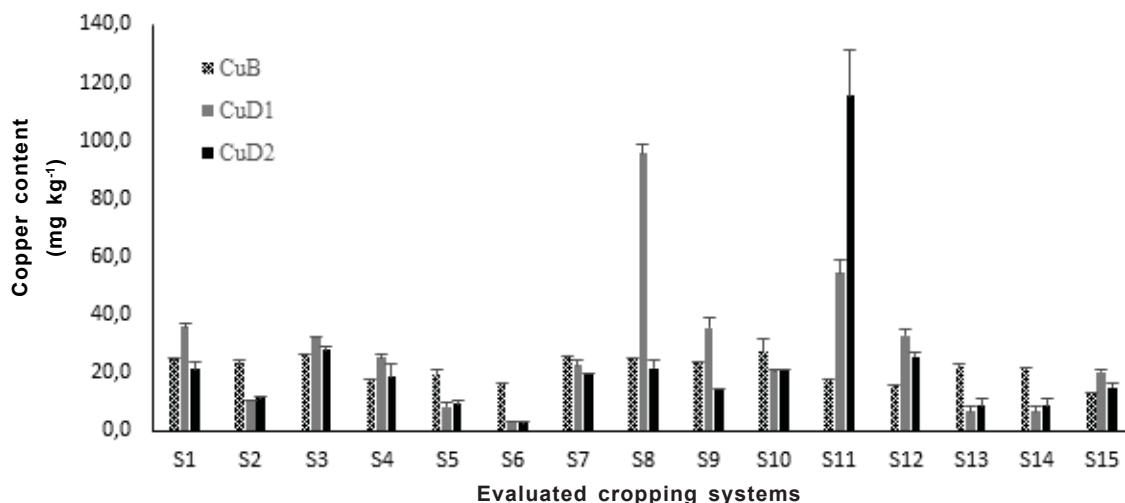


Figure 1. Content of copper (mg kg<sup>-1</sup>) in the cacao beans (CuB) and in two soil depths, CuD1 (0-15 cm), and CuD2 (35-50 cm) in 15 cacao cropping systems in Southeast Bahia, Brazil.

Table 4. Linear correlation between the metal contents in two soil depths, D1 (0-15 cm) and D2 (35-50 cm), from 15 sites in Southeast Bahia, Brazil

	CuD1	CdD1	BaD1	PbD1	CuD2	CdD2	BaD2	PbD2
CuD1	1	0.60*	0.19 <sup>ns</sup>	0.57*	0.45 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>
CdD1		1	0.51*	0.75*	0.52*	0.71*	0.31 <sup>ns</sup>	0.61*
BaD1			1	0.09 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	0.39 <sup>ns</sup>	0.92*	0.07 <sup>ns</sup>
PbD1				1	0.34 <sup>ns</sup>	0.37 <sup>ns</sup>	-0.04 <sup>ns</sup>	0.71*
CuD2					1	0.83*	-0.02 <sup>ns</sup>	0.65*
CdD2						1	0.33 <sup>ns</sup>	0.74*
BaD2							1	0.07 <sup>ns</sup>
PbD2								1

\* significant <sup>ns</sup> not significant. Values equal or above 0.5 are considered significant correlation.

Table 5. Metal content in cacao beans (mg kg<sup>-1</sup>) in 15 sites in Southeast Bahia, Brazil

Site	Cu		Cd		Ba		Pb*
1	24.60	AB	0.45	DEF	4.20	CDE	< 4.3
2	23.10	AB	0.30	EF	3.20	CDE	< 4.3
3	25.90	A	0.25	F	2.30	E	< 4.3
4	17.25	AB	0.70	CDEF	6.45	BCD	< 4.3
5	19.35	AB	0.60	CDEF	5.65	BCDE	< 4.3
6	16.20	AB	0.50	CDEF	2.75	CDE	< 4.3
7	25.25	A	1.35	A	4.65	CDE	< 4.3
8	24.95	AB	0.30	EF	2.65	DE	< 4.3
9	23.50	AB	0.50	DCDEF	3.45	CDE	< 4.3
10	27.10	A	0.30	EF	8.90	AB	< 4.3
11	17.70	AB	0.60	CDEF	11.05	A	< 4.3
12	15.40	AB	0.75	BCDE	11.40	A	< 4.3
13	22.05	AB	0.90	ABCD	6.50	BC	< 4.3
14	21.40	AB	0.95	ABC	4.95	CDE	< 4.3
15	12.97	B	1.20	AB	8.85	AB	< 4.3

Means followed by the same letters in the column are not statistically different by the Scheffé Test 5%. \* below the detection content

The soil Cd content was higher at D2 than in D1 in 3 out of 15 cropping systems, in only one site was Cd content higher in D1, in the remaining 11 sites there were no statistically significant differences between the studied soil layers (Table 3).

Cd is easily absorbed and translocated through plant xylem (She et al., 2018), in the biogeochemical cycling it is transported between soil and plant and *vice-versa*. It can be extracted from the system *e.g.* if allocated in harvested plant parts. In the soil it is highly adsorbed to the organic matter and its retention correlates with soil pH, Cation Exchange Capacity (CEC), and specific surface (Tahervand and Jalali, 2016; Yang et al., 2018).

Higher Cd accumulation in D2 layer could be from natural origin rather than any of the anthropogenic activities adopted in the cropping systems. The topsoil layer of site 12 had the highest Cd content (Table 3 and Figure 2) and among the Cd contents at the

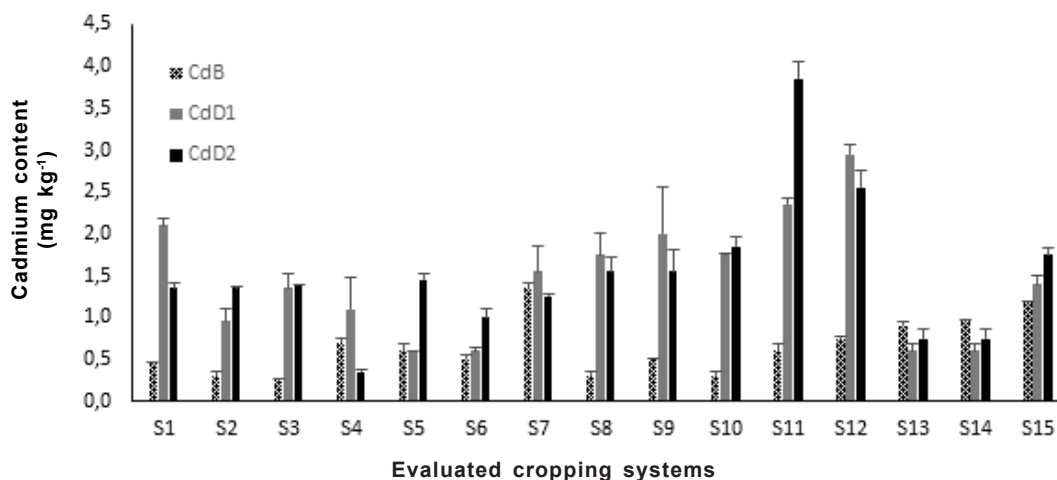


Figure 2. Content of cadmium ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the cacao beans (CdB) and in two soil depths, CdD1 (0-15 cm), and CdD2 (35-50 cm) in 15 cacao cropping systems in Southeast Bahia, Brazil.

deeper layer the site 11 presented the highest content. Site 11 has a partially weathered soil (Dystropept) suggesting the effect of the local lithology on soil Cd content. This site also presented one of the higher Cd contents in the top layer of the soil (Table 3). This could be caused by the fact that this site was the only one that received phosphorus in the form of ground natural rock phosphate (unpublished data), which is recognized for containing naturally high levels of Cd (Roberts, 2014). Also, litterfall in the biogeochemical cycling may influence the Cd content in the surface soil layer, as shown by the high positive correlation between the Cd content in D1 and D2 (Table 4). Mineral phosphate fertilizers are also recognized as source of Cd (Bizarro, Meurer and Tatsch, 2008) and were used in most of the sites (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14) (Table 2).

The element Ba showed statistically higher content in the top layer of the soil (Table 3 and Figure 3), in six sites (7, 8, 10, 12, 13 and 14). Site 12 had the highest content in the topsoil layer, and site 15 had high content in both soil layers. Ba is usually associated with soil K content due to their similar ionic radii, and thus usually is present in soils with high occurrence with minerals like alkali feldspar and biotite (Madejón, 2013). However, in these cropping systems the detailed information on the nature of mineralogy was not done to confirm such hypothesis. Ba content in D1 highly correlates with its content in D2 (Table 4) suggesting that the occurrence of this heavy metal in D1 is highly

dependent on the lithology and the sourcing through litterfall.

Soil contamination with Pb is a cumulative process, usually irreversible, which makes the increase of the content and the persistent availability for plant absorption (Demir, Pamukcu and Shrestha, 2015; Fabian, Reimann and Caritat, 2017). Except for cropping system 1, in all the other cropping systems higher Pb contents was recorded in subsurface soil layer (CdD2) (Table 3 and Figure 4), and statistically higher Pb levels were observed in D2 in the sites 2, 5, 6, 10, 11, 15. Sites 1 and 3 stand out by the high and similar contents in both layers. The sites 1, 2, and 3 deserve a special consideration due to the high soil Pb contents, and to the existing similarities among these cropping systems with regards to nature of shade trees present, lithology and proximity to each other (Table 1, 2 and 3). Pb content in D2 highly correlates with Pb content in D1 (Table 4), suggesting the effect of litterfall sourcing this element to D1 from D2, through biogeochemical cycling. Pb content in D2 also showed high positive correlation with Cd content in D2 and in D1, and Cu content in D2, but does not show high correlation neither positive nor negative with Cu content in D1, and Ba content in D1 and D2 (Table 4). Pb content in D1 does not show high correlation with any of the other potentially toxic elements evaluated in D2 layer, except with itself, however Pb content in D1 showed high positive correlation with Cu content in D1 and Cd content in D1 layer (Table 4).

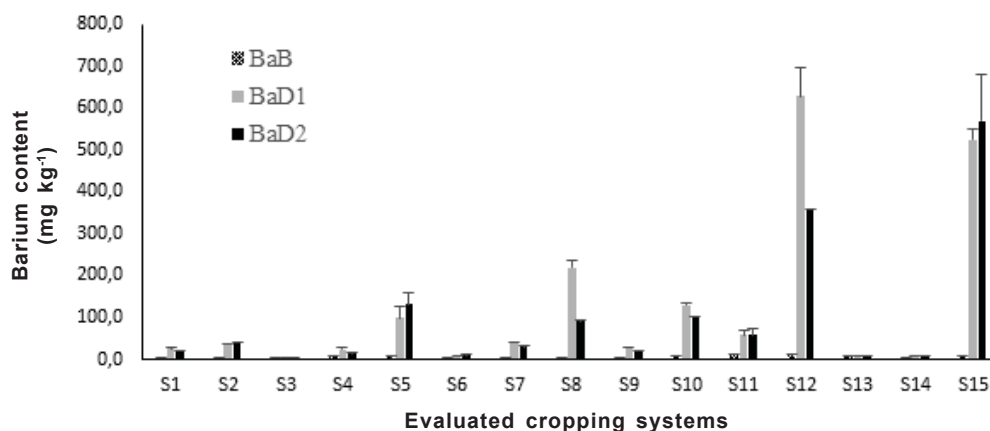


Figure 3. Content of barium ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the cacao beans (BaB) and in two soil depths, BaD1 (0-15 cm), and BaD2 (35-50 cm) in 15 cacao cropping systems in Southeast Bahia, Brazil.

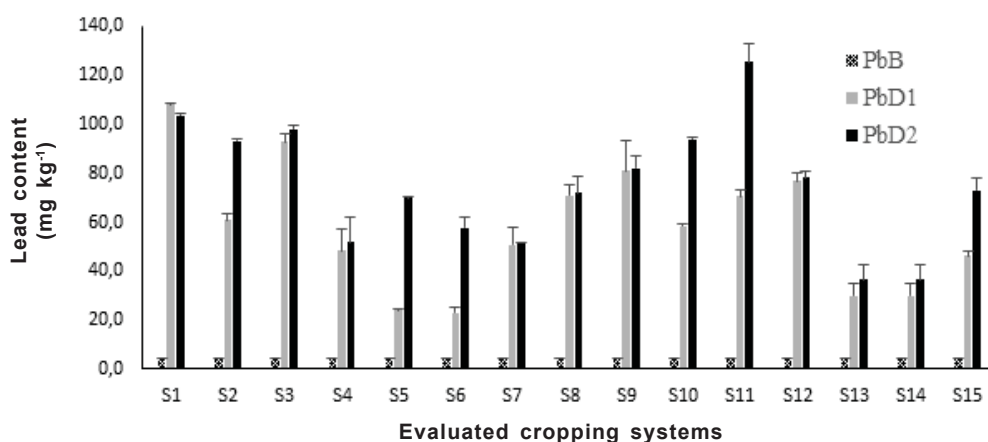


Figure 4. Content of lead ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in the cacao beans (PbB) and in two soil depths, PbD1 (0-15 cm), and PbD2 (35-50 cm) in 15 cacao cropping systems in Southeast Bahia, Brazil.

In general, based on the higher soil heavy metals contents, special attention should be considered with the sites: 1, 2, 3 and 9 (Pb), 11 (Cu, Cd, Pb), 12 (Cd, Ba) and 15 (Ba). Sites 11 and 15, both organically farmed, were situated on the youngest soils and derived from lithology that might be sourcing many mineral elements (desirable or undesirable), and the site 12 had possible effects of high inputs used in adopted conventional agricultural production system (Table 1 and 2).

Most plant species grown in soils contaminated with heavy metals can only limit partially the uptake and translocation of these elements from the root system towards the shoot (Baker, 1981). Cacao tree can absorb heavy metals from soil and accumulate them in seeds (Arévalo-Gardini et al., 2017; Lewis et al., 2018), producing risks to the human consumption of chocolate

and other derived products due to the close relation between chemical composition of the beans and quality of the derived products (Bertoldi et al., 2016).

The site 10 presented the highest content of Cu in the beans ( $27.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Table 5), statistically equal to the sites 7 ( $25.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and 3 ( $25.9 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The smallest Cu content in beans was observed at site 15 ( $12.9 \text{ mg kg}^{-1}$ ). There was no significant correlation observed between the soil Cu content and the Cu content in the beans (Table 6).

The highest content of Cd in beans was found at the site 7 ( $1.35 \text{ mg kg}^{-1}$ ), within the range reported by Chavez et al. (2015) in cacao beans from Ecuador; Ramtahal et al. (2016) in nibs from orchards in Trinidad and Tobago; Gramlich et al. (2018) in cacao beans from Honduras; Arévalo-Gardini et al. (2017) in cacao

Table 6. Linear correlation between the metal contents in cacao beans (B) and in soil (S) in two soil depths (D) in 15 sites in Southeast Bahia, Brazil

D <sub>1</sub> (0-15 cm)						
	Cu <sub>(s)</sub>	Cd <sub>(s)</sub>	Ba <sub>(s)</sub>	Cu <sub>(B)</sub>	Cd <sub>(B)</sub>	Ba <sub>(B)</sub>
Cu <sub>(s)</sub>	1	0.56 *	0.16 <sup>ns</sup>	0.23 <sup>ns</sup>	-0.27 <sup>ns</sup>	-0.03 <sup>ns</sup>
Cd <sub>(s)</sub>		1	0.48 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	-0.32 <sup>ns</sup>	0.49 <sup>ns</sup>
Ba <sub>(s)</sub>			1	-0.54 *	0.32 <sup>ns</sup>	0.59 *
D <sub>2</sub> (35-50 cm)						
	Cu <sub>(s)</sub>	Cd <sub>(s)</sub>	Ba <sub>(s)</sub>	Cu <sub>(B)</sub>	Cd <sub>(B)</sub>	Ba <sub>(B)</sub>
Cu <sub>(s)</sub>	1	0.83 *	-0.05 <sup>ns</sup>	-0.12 <sup>ns</sup>	-0.05 <sup>ns</sup>	0.51 <sup>ns</sup>
Cd <sub>(s)</sub>		1	0.31 <sup>ns</sup>	-0.14 <sup>ns</sup>	-0.06 <sup>ns</sup>	0.63 *
Ba <sub>(s)</sub>			1	-0.61 *	0.44 <sup>ns</sup>	0.56 *

\* significant <sup>ns</sup> not significant.

samples from Peru; and Zarcinas et al. (2004) in cacao beans produced in Malaysia, while the smallest bean Cd content was found in the site 3. As with Cu, there was no significant correlation observed between the soil Cd content and the Cd content in the beans (Table 6). In a study performed in Trinidad and Tobago, a significant ( $P < 0.05$ ) correlation was found between leaf Cd content and soil Cd content, for both soil Cd extractants, DTPA ( $r = 0.66$ ) or Mehlich 3 ( $r = 0.66$ ), but the relationship was not significant when the soil extractant was aqua regia, like the one that was used in the current study, or nitric acid (Lewis et al., 2021). In the Trinidad and Tobago study, DTPA or Mehlich 3 extracted significantly ( $P < 0.05$ ) lower amounts of Cd from the soil compared to nitric acid or aqua regia, suggesting that these last two extractors extract Cd fractions from soil that are not available for absorption by cacao plants (Lewis et al., 2021).

The higher contents of Ba in the beans were found at the sites 12 (11.40 mg kg<sup>-1</sup>) and 11 (11.05 mg kg<sup>-1</sup>) similar to those values reported by Bertoldi et al. (2016). The smallest Ba content was found at the site 3 (2.30 mg kg<sup>-1</sup>) and was well below to the values verified by Bertoldi et al. (2016) in cacao beans. The Ba values found in the current study were much lower than the values reported in Brazil nuts (96 to 1990 mg kg<sup>-1</sup>) (Parekh et al., 2008), and similar to the values reported for cereals (6 mg kg<sup>-1</sup>) (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Positive correlation was observed

between Ba content of soil and beans, and a slightly high significant negative correlation was observed between Ba content in soil and Cu content in beans in both soil depths. Also, the content of Ba in beans presented a positive correlation with the content of Cd in soil but only in the deeper evaluated soil layer (Table 6).

By the adopted analytical method, it was not possible to identify Pb presence in cacao beans, as levels of Pb were lower than detectable levels by the ICP instrument used.

Considering the sites 14 and 15, which were planted with same cacao type-Comum (Forastero) and with similar cropping aspects, but these sites differed in soil types, Hapludox versus Hapludalf, a further comparison was done (Table 7). The cacao beans of Forastero trees grown in a Hapludox (site 14) showed higher Cu contents than those from trees grown in a Hapludalf soil (site 15) (Table 7), possibly since the cacao trees in site 14 were cropped by a conventional method while the trees grown in site 15 were organically farmed. On the other hand, beans from site 15 showed higher content of Cd and Ba, suggesting the effect of the soil age, or the presence of source material close to the surface, on the availability of minerals like Ba, as identified in this study (Table 1, 2 and 3).

In another comparison (Table 8), cacao trees of PH-16 were grown in site 13 and Forastero grown on site 14, both sites had Hapludox soil and Cabruca

Table 7. Content of metals (mg kg<sup>-1</sup>) in Comum cacao beans in two sites in Southeast Bahia, Brazil

Site	Soil	Cu	Cd	Ba	Pb*
14	Hapludox	21.40 A	0.96 B	4.96 B	< 4.3
15	Hapludalf	12.96 B	1.20 A	8.86 A	< 4.3
C.V.%		5.7	3.7	5.6	-

Means followed by the same letters in the column are not statistically different by the Scheffé Test 5%. C.V. = coefficient of variation. \* below the detection content.

Table 8. Content of metals (mg kg<sup>-1</sup>) in cacao beans of different genetic material at the same soil type (Hapludox) in Southeast Bahia, Brazil

Site	Genetic Material	Cu	Cd	Ba	Pb*
13	PH-16	22.05 A	0.90 A	6.50 A	< 4.3
14	Comum cacao	21.40 A	0.95 A	4.95 B	< 4.3
C.V.		7.28	8.74	9.55	-

Means followed by the same letters in the column are not statistically different by the Scheffé Test 5%. C.V. = coefficient of variation. \* below the detection content.



cultivation system (Table 1 and 2). The Ba content of beans of PH-16 were higher than beans of Forastero while Cu and Cd contents were not statistically different. This shows the possible existence of cacao varietal differences in accumulation of heavy metals.

The results showed in this study are from a broad and first evaluation that deserves further and deeper analysis of differences imposed by soil types, cacao varieties and adapted management systems on accumulations of heavy metals by cacao beans.

### Conclusion

The conventional cacao cropping methods usually increase the heavy metal (such as Cu and Ba) content in the top layer of the soil, this could be the result of adapting chemical sprays to control disease, insect and weeds and applications of inorganic fertilizers which contain these heavy elements, and the possible excess will end up on top of the soil surface.

The heavy metal Pb and Cd are usually influenced by the lithology, showing generally higher content in the deeper layer of the soil, however some of the results of this study suggest the effect of anthropogenic action and higher accumulation of these elements in the top layer of the soil. Young soils have higher content of Cu, Cd and Pb through their profile. The cacao clone PH-16 accumulated more Ba in the beans than the beans of Comum 'forastero' cacao.

### Acknowledgements

This paper is part of the project "Linking soil quality and cacao bean quality in Bahia, Brazil". To run fundamental steps of this research, the corresponding author was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) with a Postdoctoral fellowship.

Our thanks to Marshall Elson for excellent prereview of this paper.

### Literature Cited

- ALI, H.; KHAN, E. 2018. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals'- proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry* 100:6-19.
- ARAUJO, Q. R. et al. 2014. Cocoa quality index-a proposal. *Food Control* 46:49-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.003>.
- ARAUJO, Q. R. et al. 2013. Soil Classification and Carbon Storage in Cacao Agroforestry Farming Systems of Bahia, Brazil, *Journal of Sustainable Forestry* 32(6):625-647. DOI: 10.1080/10549811.2013.799037.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. 2019. The ATSDR 2019 Substance Priority List. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
- ARÉVALO-GARDINI, E. et al. 2017. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment* 605:792-800. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.122>.
- BARAÑSKI, M. et al. 2014. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *British Journal of Nutrition* 112(5):794-811. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001366>.
- BAKER, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3:643-654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- BERN, C. R.; TOWNSEND, A. R.; FARMER, G. L. 2005. Unexpected dominance of parent? material strontium in a tropical forest on highly weathered soils. *Ecology* 86(3):626-632. <https://doi.org/10.1890/03-0766>.
- BERTOLDI, D. et al. 2016. Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control* 65:46-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.013>.
- BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. 2008. Cadmium content in phosphate fertilizers marketed in Brazil. *Ciência rural* 38:247-250. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000100041>
- BLASER, P. et al. 2000. Critical examination of trace element enrichments and depletions in soils: As,

- Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn in Swiss forest soils. *Science of the Total Environment* 249(1-3):257-280. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00522-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00522-7).
- CHAVEZ, E. et al. 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*. 533:205–214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.106>
- CPRM - SERVIÇO GEOLÓGICO DO BRASIL. 2004. Carta Geológica do Brasil ao Milionésimo: sistema de informações geográficas-SIG [Geological Map of Brazil 1:1.000.000 scale: geographic information system-GIS]. Brasília: CPRM, 2004. 41 CD Rooms. ISBN 85-7499-009-4. Available at: <http://www.cprm.gov.br/en/>
- DEMIR, A.; PAMUKCU, S.; SHRESTHA, R. A. 2015. Simultaneous removal of Pb, Cd, and Zn from heavily contaminated mine tailing soil using enhanced electrochemical process. *Environmental Engineering Science* 32:416-424.
- DUFFUS, J. H. 2002. “Heavy Metals” – a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* 74:793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
- EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. 2018. Heavy metals and metalloids: Sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 234:431-444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- FABIAN, K.; REIMANN, C.; DE CARITAT, P. 2017. Quantifying Diffuse Contamination: Method and Application to Pb in Soil. *Environmental science & technology* 51:6719-6726. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00741>
- GRAMLICH, A. et al. 2018. Soil cadmium uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment* 612:370-378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.145>.
- HÜBNER, R.; ASTIN, K. B.; HERBERT, R. J. 2010. ‘Heavy metal’ - time to move on from semantics to pragmatics? *Journal of Environmental Monitoring* 12:1511-1514. <https://doi.org/10.1039/C0EM00056F>.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3. ed., CRC Press, Boca Raton.
- KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. 2007. Trace elements from soil to human. Springer-Verlag, Berlin.
- KRAEPIEL, A. M. L. et al. 2015. Natural and anthropogenic processes contributing to metal enrichment in surface soils of central Pennsylvania. *Biogeochemistry* 123(1-2):265-283. <https://doi.org/10.1007/s10533-015-0068-5>.
- LEWIS, C. et al. 2021. Plant metal concentrations in *Theobroma cacao* as affected by soil metal availability in different soil types. *Chemosphere* 262:127749. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127749>.
- LEWIS, C. et al. 2018. Genetic variation in bioaccumulation and partitioning of cadmium in *Theobroma cacao* L. *Science of The Total Environment* 640:696-703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.365>.
- LOCKWOOD, C. L. et al. 2015. Leaching of copper and nickel in soil-water systems contaminated by bauxite residue (red mud) from Ajka, Hungary: the importance of soil organic matter. *Environmental Science and Pollution Research* 22:10800-10810. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4282-4>
- MACHADO, F. B. et al. 2003. Enciclopédia Multimídia de Minerais e Atlas de Rochas. [online]. Atlas de mineiras e de rocha Museu Heinz Ebert – USP. Available at: <http://www.rc.unesp.br/museudpm>
- MADEJÓN, P., 2013. BARIUM. In *Heavy Metals in Soils*, Springer, Dordrecht: 507-514.
- MCGRATH, S. P.; CUNLIFFE, C. H. A. 1985. Simplified method for the extraction of metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *Journal of Science of Food and Agriculture, Barking*, 36:794-798. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360906>.
- MEDINA, J. et al. 2017. Microscopic and spectroscopic characterization of humic substances from a compost amended copper contaminated soil: main features and their potential effects on Cu immobilization. *Environmental Science and Pollution Research* 24:14104-14116. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8981-x>.

- MOTAMAYOR, J. C. et al. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L.). *PloS one*, 3(10):e3311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>
- MOTILAL, L. A.; SREENIVASAN, T. N. 2012. Revisiting 1727: crop failure leads to the birth of Trinitario cacao. *Journal of Crop Improvement* 26(5):599-626. <https://doi.org/10.1080/15427528.2012.663734>
- MOURATO, M. et al. 2015. Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *International journal of molecular sciences* 16:17975-17998. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>
- NICHOLSON, F. A. et al. 2003. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the total environment* 311:205-219. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00139-6)
- PAGE, V.; WEISSKOPF, L.; FELLER, U. 2006. Heavy metals in white lupin: Uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist* 171:329-341. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01756.x>
- PAREKH, P. P. et al. 2008. Concentrations of selenium, barium, and radium in Brazil nuts. *Journal of Food composition and Analysis* 21:332-335. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.12.001>
- RAMTAHAL, G. et al. 2016. Relationships between cadmium in tissues of cacao trees and soils in plantations of Trinidad and Tobago. *Food and Nutrition Sciences* 7:37-43. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2016.71005>
- REBOREDO, F. H. et al. 2018. Heavy metal content of edible plants collected close to an area of intense mining activity (southern Portugal). *Environmental monitoring and assessment* 190, 484. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6844-7>
- REIMANN, C.; FABIAN, K.; FLEM, B. 2019. Cadmium enrichment in topsoil: separating diffuse contamination from biosphere-circulation signals. *Science of The Total Environment* 651:1344-1355. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.272>
- ROBERTS, T. L. 2014. Cadmium and phosphorous fertilizers: the issues and the science. *Procedia Engineering* 83:52-59. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2014.09.012>
- SANTOS, E. S. et al. 2015. Genetic structure and molecular diversity of cacao plants established as local varieties for more than two centuries: the genetic history of cacao plantations in Bahia, Brazil. *PLoS One* 10(12):e0145276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145276>
- SHE, W. et al. 2018. Characterization of cadmium concentration and translocation among ramie cultivars as affected by zinc and iron deficiency. *Acta Physiologiae Plantarum* 40:104. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2670-3>
- STARR, M. et al. 2003. Weathering release of heavy metals from soil in comparison to deposition, litterfall and leaching fluxes in a remote, boreal coniferous forest. *Applied Geochemistry* 18(4):607-613. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00157-9](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00157-9)
- TAHERVAND, S.; JALALI, M. 2016. Sorption, desorption, and speciation of Cd, Ni, and Fe by four calcareous soils as affected by pH. *Environmental monitoring and assessment* 188:322. [Doi.org/10.1007/s10661-016-5313-4](https://doi.org/10.1007/s10661-016-5313-4)
- TURNBULL, C. J.; HADLEY, P. 2020. International Cocoa Germplasm Database (ICGD). [Online Database]. CRA Ltd./ICE Futures Europe / University of Reading, UK. Available at: <http://www.icgd.reading.ac.uk>
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. 1996. Method 3050 B: Acid digestion of sediment, sludges, and soils. CD-ROM. 3050B -1. Revision 2, Washington, D.C. Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf>
- YANG Y. et al. 2018. Can liming reduce cadmium (Cd) accumulation in rice (*Oryza sativa*) in slightly acidic soils? A contradictory dynamic equilibrium between Cd uptake capacity of roots and Cd immobilization in soils. *Chemosphere* 193:547-556. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.061>

YANG, J. Y. et al. 2013. Complex origin of Trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. *Tree genetics & genomes* 9(3):829-840. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0601-4>.

ZARCINAS, B. et al. 2004. Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia. *Environmental Geochemistry and Health* 26:343–357. <https://doi.org/10.1007/s10653-005-4669-0>.





## OCORRÊNCIA DO TRIPES DA PIMENTA (*Scirtothrips dorsalis* Hood, [Thysanoptera: Thripidae]) EM CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

*Kazuiyuki Nakayama*<sup>1</sup>, *Mariana Flores Lindner*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CEPLAC/CEPEC - km 22, Rodovia Ilhéus/Itabuna, 45600-970, Ilhéus, Bahia, Brasil. kazuocplac@gmail.com; <sup>2</sup>Av. Paulo Gama, 110 - Bairro Farroupilha - Porto Alegre, RS. mflindner@hotmail.com

Este trabalho relata a primeira ocorrência do trips da pimenta *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) em cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), no estado da Bahia, Brasil. Revisa aspectos da dispersão global, de algumas características biológicas e da interação dinâmica populacional versus fatores climáticos. Visando o desenvolvimento de sistema de amostragem descreve os principais sintomas do ataque do inseto nas folhas e frutos do cacaueiro e relaciona a dinâmica populacional das espécies de trips com a pluviometria e a temperatura.

**Palavras-chave:** Malvaceae, sintoma, prejuízo, controle, biologia, cacau.

**Occurrence of pepper thrips (*Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae)) on cacao (*Theobroma cacao* L.).** This work reports the first occurrence of the pepper thrips *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) on cacao (*Theobroma cacao* L.), in the state of Bahia, Brazil. It reviews aspects of global dispersion, some biological characteristics and the dynamic interaction of population versus climatic factors. Aiming at developing a sampling system, it describes the main symptoms of insect attack on cacao leaves and fruits and relates the population dynamics of thrips species with rainfall and temperature.

**Key words:** Malvaceae, symptom, injury, control, biology, cocoa.

## Introdução

Introduções de pragas agrícolas quarentenárias no território brasileiro têm aumentado há algumas décadas. Pragas quarentenárias são organismos que apresentam potenciais danos econômicos para os cultivos agrícolas implantados nos territórios onde as pragas estejam ausentes. No Brasil, antes de 1970, era detectada menos de uma praga exótica introduzida por ano, nos anos 90 superou duas pragas quarentenárias por ano e a taxa de introdução se aproximou de quatro na década 2000. Estes incrementos de introduções de pragas exóticas e quarentenárias são atribuídos, principalmente, ao aumento global da área cultivada, ao aumento dos desmatamentos das florestas nativas eliminando as barreiras naturais, ao aumento do comércio de *commodities* entre os países e a intensificação do trânsito internacional de pessoas transportando plantas, partes das plantas, frutos ou sementes infestadas (EMBRAPA, 2022).

A cacauicultura brasileira tem sido muito prejudicada pelas sucessivas introduções de pragas quarentenárias ausentes e presentes. Em 2007, a lista de pragas quarentenárias ausentes no Brasil continha mais de 500 espécies quarentenárias dentre as quais pelo menos trinta pragas exóticas apresentavam riscos de potenciais danos econômicos para o cultivo do cacauero, a nível nacional ou regional, MAPA (2007). Dentre as pragas quarentenárias presentes no Brasil, por ser ausente na região cacauera da Bahia, em 1989, foi introduzida a Vassoura-de-Bruxa, *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycetes: Marasmiaceae), causando crise econômica e social sem precedente, conforme Pereira et al. (1990). Tomando o território brasileiro como referência, até 2021, nas últimas três décadas, adicionalmente, foram introduzidas três pragas quarentenárias ausentes, a cochonilha-rosada, *Maconellicoccus hirsutus* Green 1908, (Hemiptera: Pseudococcidae), segundo Nakayama (2019), a monilíase, *Moniliophthora roreri* ((Cif) Evans 1978)), (Basidiomycetes: Marasmiaceae), segundo MAPA (2021) e o tripses da pimenta, *Scirtothrips dorsalis* Hood 1919, (Thysanoptera: Thripidae), conforme Dias-Pini et al. (2018).

A espécie *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) é conhecida como tripses

da pimenta (Chilli thrips, em inglês), tripses do chá amarelo na Ásia e tripses da páprica na América Central e México (Cermeli, Perozo & Piñango, 2009). Essa espécie é polífaga, atacando espécies de plantas pertencentes a mais de quarenta famílias. É nativa da Ásia tropical, onde ocorre do Paquistão ao Japão e, na direção sul, até a Austrália e Ilhas Salomão, (Seal, Klassen & Kumar, 2010; Kumar et al., 2012; CABI, 2022).

A dispersão do *S. dorsalis* foi intensificada no final do século XX, e, atualmente, pode ser considerada uma praga cosmopolita. Muito invasiva, a espécie foi constatada várias vezes em produtos agrícolas importados, em 1991, na Flórida, América do Norte. Em 2003, a espécie alcançou a região do Caribe. Em 2005, rompeu as estratégias da defesa fitossanitária norte americana e se estabeleceu na Flórida, (Nietschke et al., 2008; Kumar, Seal & Kakkar, 2009; CABI, 2022).

Em 2005, *S. dorsalis* foi registrada na África, Oriente Médio, África do Sul, Israel e Costa do Marfim, (OEPP/EPPO, 2005; Collins, Cannon & MacLeod, 2006). Atualmente, considera-se que o tripses da pimenta tenha colonizado as regiões tropicais e quentes do continente africano, (Klassen et al., 2008, CABI, 2022).

Em 2006, na Venezuela, América do Sul, o tripses da pimenta foi coletado em plantações de videira no município de Mara, estado de Zulia (Quiros et al., 2007) e no algodoeiro, em diversas localidades (Cermeli, Perozo & Piñango, 2009).

No Brasil, *S. dorsalis* foi relatado pela primeira vez em julho de 2018 no Ceará, atacando cajueiro *Anacardium occidentale* Linnaeus 1753, (Anacardiaceae), (Dias-Pini et al., 2018) e, pela primeira vez, na primavera de 2019, foi coletado em cacauero (*Theobroma cacao* L.), em Eunápolis, Bahia.

No contexto desta narrativa, considerando a circunstancial carência de informações técnicas sobre a interação *S. dorsalis* e cacauero, propôs-se este trabalho visando gerar e difundir conhecimentos sobre a sintomatologia do ataque da praga, que certamente contribuirão em habilitar técnicos da extensão rural e cacauicultores, reconhecerem e confirmarem a presença da praga nos cacauais. Também, foi objeto deste trabalho revisar os conhecimentos sobre a bioecologia do tripses da pimenta visto que estas

informações podem melhorar a compreensão e previsão dos potenciais surtos da praga no cultivo do cacauero.

### Material e Métodos

Inspeções em cacauais infestados pelo trips foram realizadas pelo setor de entomologia/Cepec/Ceplac, no período entre setembro de 2019 e abril de 2020, para obter materiais vegetais, frutos, folhas e ramos colonizados pelos jovens e adultos exibindo sintomas dos ataques em distintos estágios da sintomatologia. As plantas e suas partes foram fotografadas no campo. Visando a identificação da espécie e a obtenção de imagens, amostras das colônias com adultos e ninfas do trips foram coletadas e armazenadas em frascos escuros contendo álcool 70°. Os espécimes adultos e jovens foram montados em balsamo sobre laminas e lamínulas. As fotos foram geradas em lupa estereoscópica tri ocular equipada com câmera fotográfica.

### Resultados

#### Descrição do adulto de *Scirtothrips dorsalis*.

O adulto do trips da pimenta é muito pequeno, com menos de dois mm de comprimento, de cor amarelada, com uma faixa longitudinal escura no dorso, gerada pelas bordas das asas anteriores. *S. dorsalis* é um inseto de difícil identificação a olho nu ou lupa de baixa amplificação. Para se identificar o trips é necessário clarear os indivíduos da amostra, montá-los em lâminas (Mound & Palmer, 1981; Cavalleri et al., 2018) e observá-los em um microscópio composto, conforme as Figuras 1A e 1B.

Empregando esta técnica, é possível observar que *S. dorsalis* possui antenas com oito segmentos, sendo os dois primeiros claros e os demais escuros; asas anteriores com franjas lisas, não onduladas; tergitos abdominais com mancha mais escura na margem anterior e, lateralmente, microtríquias; esternitos abdominais recobertos total ou parcialmente por microtríquias (Palmer, Mound & De Haume, 1989; Mound & Palmer, 1981). Uma descrição detalhada da espécie e uma ferramenta de identificação estão disponibilizadas no portal “Os Trips do Brasil”, segundo Cavalleri et al. (2018).

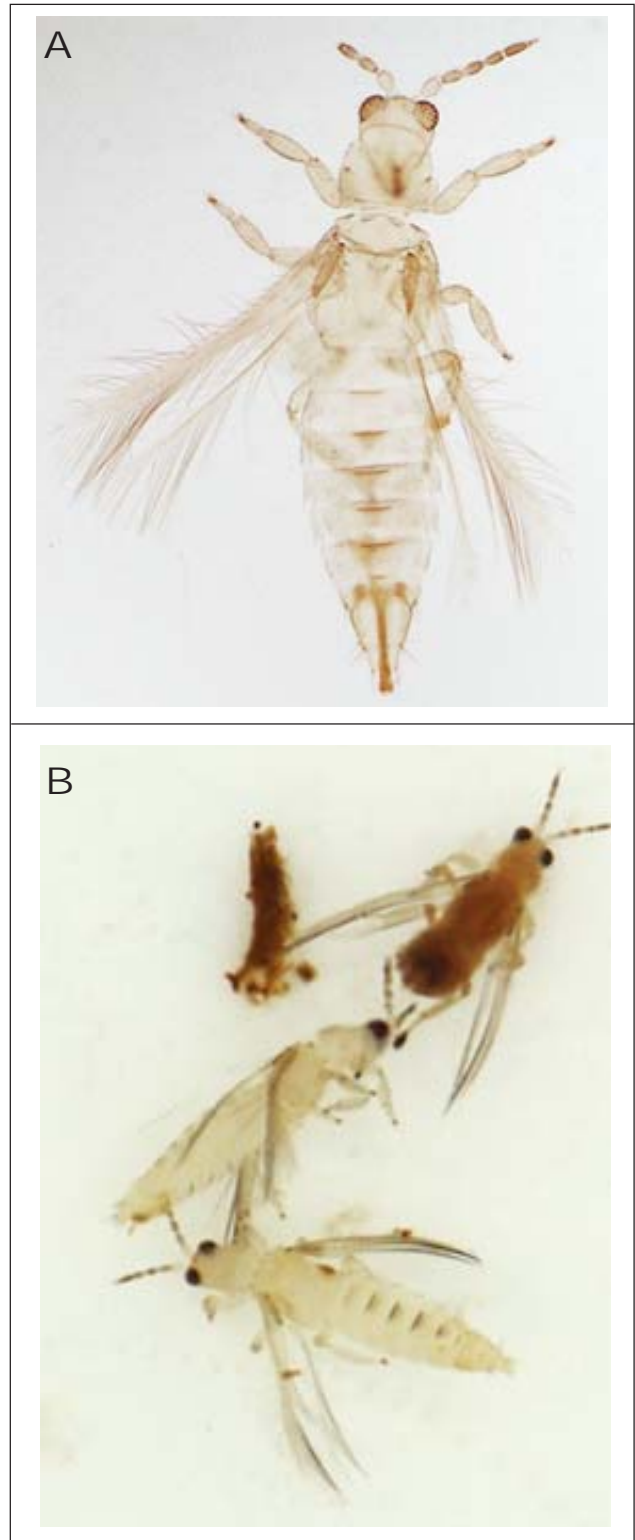


Figura 1 - **A.** O trips *S. dorsalis* em vista dorsal. **B.** O trips *S. dorsalis* em vistas dorsal e latero-ventral. Fotos: Mariana Flores Lindner.

### Biologia e danos econômicos

O ciclo biológico do trips apresenta as fases de: ovo, larva, pupa e adulto. A reprodução desse tisanóptero é sexual e partenogenética (Seal, Klassen & Kumar, 2010). Em geral, os adultos acasalam-se dois a três dias após emergirem da pupa. Decorridos três a cinco dias após a emergência, as fêmeas põem os ovos de modo contínuo, totalizando 40 a 68 ovos por fêmea (Venette & Davis, 2004; GPDD, 2011).

A postura é endofítica e os ovos são inseridos no interior dos tecidos vegetais jovens, não lignificados e tenros. O estágio de ovo dura até sete dias, e as larvas medem menos de um mm de comprimento. Essa espécie se multiplica com muita rapidez. Em condições favoráveis, sob temperatura elevada, suas populações podem dobrar a cada nove dias. Em menos de um mês, a população inicial pode multiplicar em oito vezes (Nietschke et al., 2008; Seal, Klassen & Kumar, 2010; Venette & Davis, 2004).

*Scirtothrips dorsalis* é polífago e coloniza muitos ambientes. As larvas e os adultos alimentam-se de meristemas e outros tecidos vegetais juvenis, incluindo brotos, folhas juvenis, frutos jovens e flores. Os sintomas comuns do ataque do inseto em suas plantas hospedeiras incluem o escurecimento em órgãos das plantas, manchas e cicatrizes (Venette & Davis, 2004; CABI, 2022; Seal, Klassen & Kumar, 2010).

Altas infestações de *S. dorsalis* causam prejuízos como deformação em frutos e desfolhamento severo em várias espécies de plantas (CABI, 2022). Adicionalmente, indivíduos dessa espécie podem transmitir diversas doenças entre plantas, incluindo as causadas pelos vírus “Chilli Leaf Curl Virus”, “Peanut Necrosis Virus”, “Peanut Yellow Spot Virus” e “Tobacco Streak Virus” (Amin et al., 1981; Ananthkrishnan, 1993; Kumar et al., 2012; 2016).

### Sintomas do ataque de *Scirtothrips dorsalis* no cacauero (*Theobroma cacao* L.).

Os adultos e as larvas de *S. dorsalis* colonizam a folha e o fruto do cacauero, em vários estágios de desenvolvimento. Em consequência, a ação herbívora do trips produz distintos sintomas-resposta nas folhas, nas copas e nos frutos.

Nos períodos de lançamentos foliares, o trips coloniza as gemas vegetativas dos ramos em desenvolvimento. Nas gemas vegetativas, o trips ataca

as escamas vegetativas e as folhas em início de crescimento (embrionárias), provocando a necrose e o abortamento das escamas e das folhas embrionárias, conforme Figura 2A.

O ataque às folhas embrionárias do ramo por período prolongado promove a formação de ramos alongados,

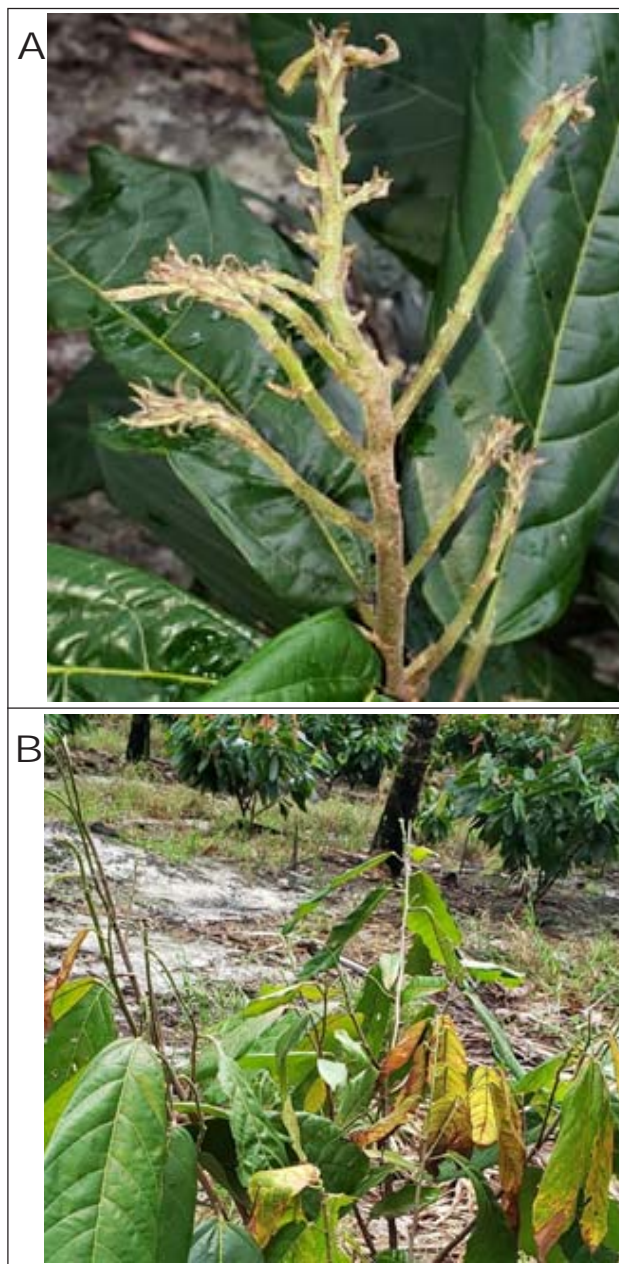


Figura 2 - A. Ramos com gemas vegetativas com escamas e folhas embrionárias ressecadas e necrosadas pelo ataque de *Scirtothrips dorsalis*. B. O abortamento das folhas embrionárias atacadas pelo *Scirtothrips dorsalis* forma ramos longos, desfolhados e de internódios curtos. Fotos: Kazuuyuki Nakayama.



com internódios curtos, intensamente desfolhados, assemelhando a varetas. A copa da planta fica desfolhada e com aparência truncada, conforme Figura 2B. Esta desfolhação tem forte impacto na produção fotossintética porque a planta fica somente com as folhas velhas de menor atividade fisiológica.

O trips ataca mais as folhas jovens em crescimento em função da expansão celular, tenras e pouco lignificadas. Estas folhas imaturas são sitiadas e colonizadas, frequentemente, por altas populações de *S. dorsalis*, como mostram as Figuras 3A, 3B e 3C.

O ataque massivo de *S. dorsalis* em folhas imaturas provoca o encarquilhamento das mesmas. Além disso, o ataque intensivo do trips provoca o enrolamento do limbo foliar em direção à nervura centro-longitudinal da folha. As folhas atacadas adquirem o formato de "charuto", conforme indicam as setas amarelas na

Figura 4A. Rapidamente, as folhas encarquilhadas ficam amarelas, necrosam e caem precocemente (Figura 4B).

Em folhas imaturas, limbo foliar expandido e não lignificado, o trips coloniza e ataca as nervuras e o limbo foliar, como mostram as setas amarelas da Figura 5A. Em folhas maduras, totalmente expandidas e lignificadas, essa espécie coloniza e ataca somente as nervuras principais e secundárias, as quais ficam escuras e necrosadas, como mostram as setas amarelas na Figura 5B.

Em folhas imaturas e com limbo foliar expandido, o trips da pimenta ataca o limbo foliar e as nervuras, que ficam escuras e necrosadas (Figura 6A). As nervuras não atacadas pelo trips permanecem com a coloração verde (Figura 6B). As folhas completamente maduras não são atacadas pelo trips.

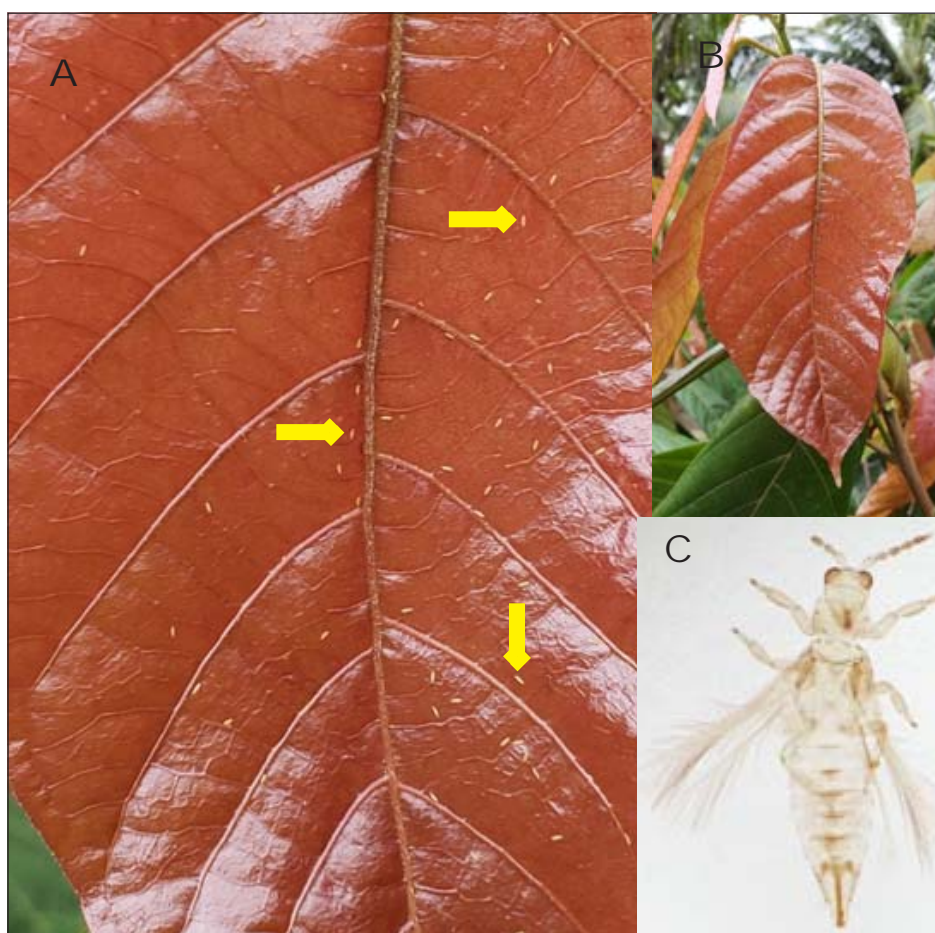


Figura 3 - A. Recorte ampliado da folha da Figura 3B mostrando a face dorsal da folha com alta densidade de adultos (setas amarelas) de *S. dorsalis*, visíveis a olho nu (pontuações alongadas e amareladas). C. Foto de adulto montado em lâmina. Fotos: Kazuuyuki Nakayama.



Figura 4 - **A.** Folhas jovens encarquilhadas e enroladas em forma de charutos (setas amarelas). **B.** Abortamento de folhas juvenis e redução de área foliar causada pelo ataque de *S. dorsalis*. Fotos: Kazuiyuki Nakayama.

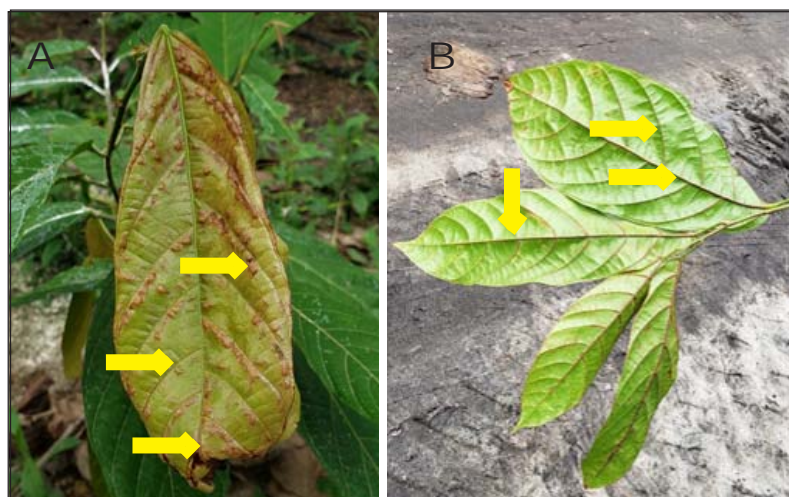


Figura 5 - **A.** Ataque de *S. dorsalis* sobre as nervuras e o limbo foliar de uma folha imatura em crescimento. **B.** Folhas maduras e totalmente expandidas com ataque do tripses exclusivo nas nervuras (necróticas e escurecidas-setas amarelas). Fotos: Kazuiyuki Nakayama.

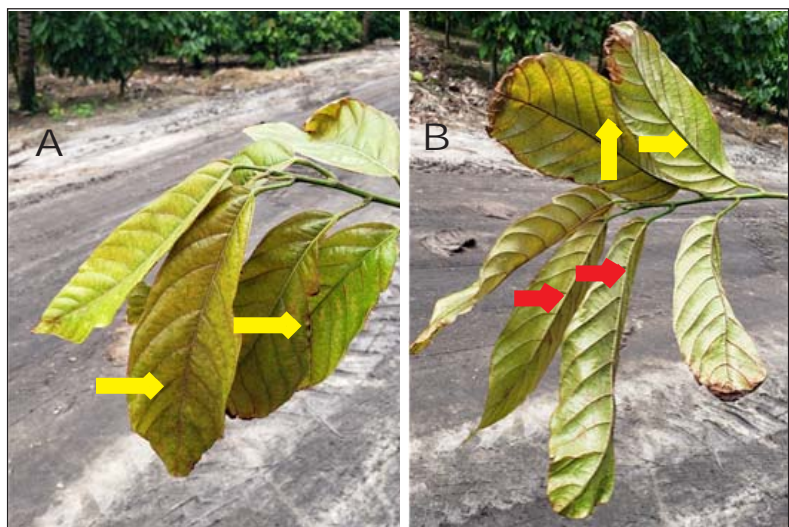


Figura 6 - **A.** Face adaxial de folha imatura e expandida com ataque nas nervuras (escurecimento - seta amarela) e no limbo foliar (necroses amarelecidas - seta amarela). **B.** Face abaxial de folha imatura e expandida (seta vermelha indica nervura verde não atacada). Fotos: Kazuiyuki Nakayama.



Na época de frutificação do cacauero, *S. dorsalis* ataca mais frequentemente, o fruto com casca pouco lignificada e tenra, com idade entre jovem (bilro) até idade de fruto médio (em crescimento, mas com casca, ainda não totalmente lignificada). Nos bilros iniciais e pouco avançados, a praga causa lesões profundas, feridas que, depois de cicatrizadas conferem à casca, uma aparência crestamento, crespa, áspera e descolorida, conforme (Figura 7A).

Em frutos de idade mais adiantada (até 100 dias), *S. dorsalis* ainda provoca o escurecimento da casca,

conferindo uma coloração ferruginosa, conforme (Figura 7B). O escurecimento ferruginoso assemelha-se ao sintoma causado por *Selenothrips rubrocinctus* Giard (Thysanoptera: Thripidae) em frutos de cacau, porém, o tripses do cacauero não produz crestamento, segundo Abreu et al. (1989).

O escurecimento ferruginoso da casca dificulta a identificação do real estado de maturação do fruto. Na colheita, o trabalhador pode ser induzido a colher frutos verdes ou verdolengos, os quais aumentam a frequência de amêndoa seca, do tipo ardósia,

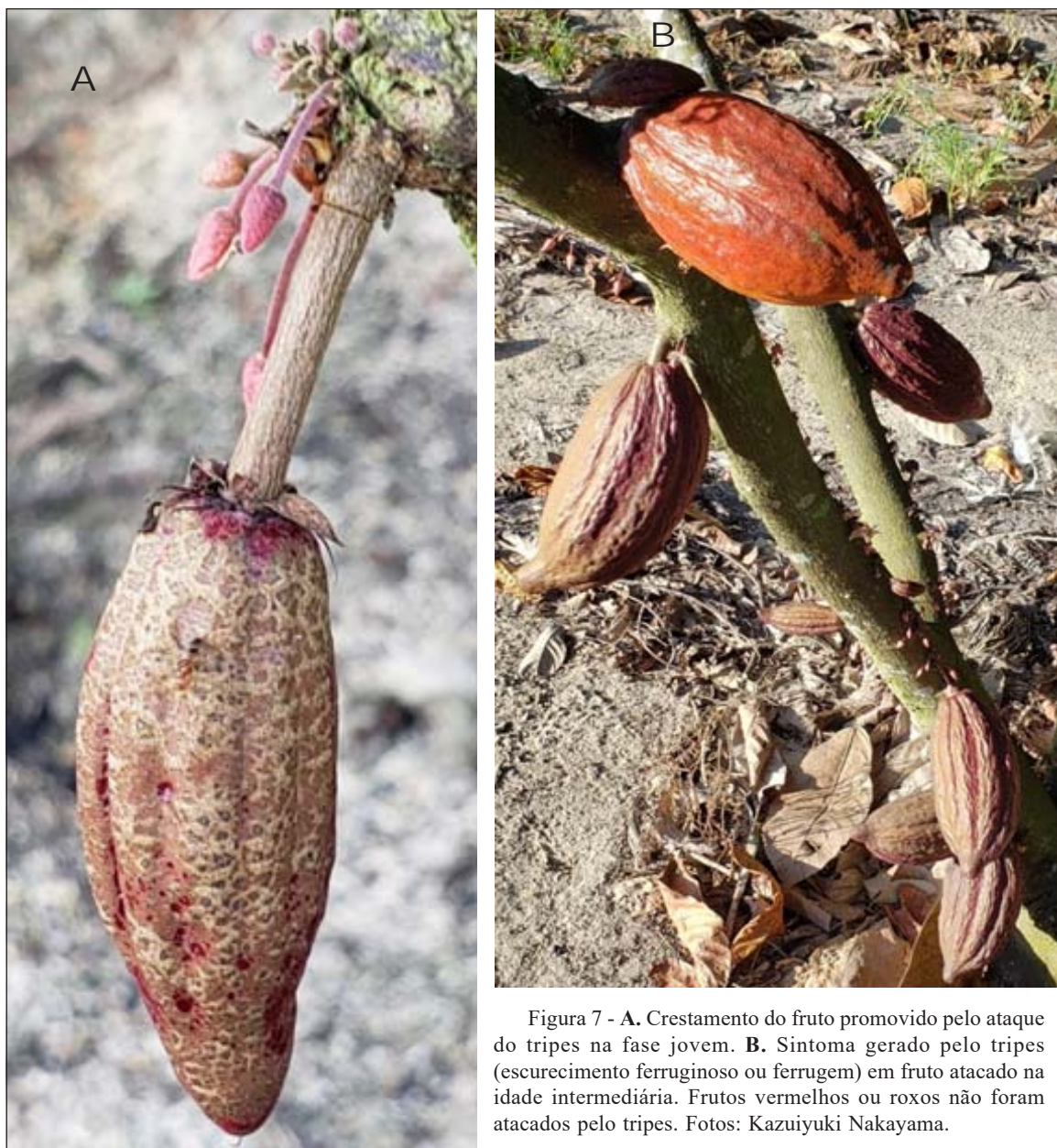


Figura 7 - A. Crestamento do fruto promovido pelo ataque do tripses na fase jovem. B. Sintoma gerado pelo tripses (escurecimento ferruginoso ou ferrugem) em fruto atacado na idade intermediária. Frutos vermelhos ou roxos não foram atacados pelo tripses. Fotos: Kazuiyuki Nakayama.

diminuindo a qualidade do lote de cacau, gerando prejuízo econômico.

### Relato da primeira observação do trips da pimenta - *Scirtothrips dorsalis* em cacauzeiro no município de Eunápolis, Bahia.

Os primeiros sintomas da presença de *S. dorsalis* em cacauzeiro foram percebidos por práticos agrícolas e gestores da Fazenda Alvorada, município de Eunápolis, Bahia, no início da primavera de 2019. O cacau desta fazenda era irrigado por microaspersão e sombreado com coqueiro anão-verde (*Cocos nucifera* L., Arecaceae).

Os cacauzeiros exibiam folhas encarquilhadas, necrosadas e amarelecidas. A partir de outubro de 2019, constatou-se um incremento na frequência de plantas exibindo este novo sintoma de ataque, atingindo sua máxima frequência em fins de novembro de 2019.

A partir de meados de janeiro de 2020, o monitoramento mensal indicava que, nas quadras tratadas e não tratadas com inseticidas, estava ocorrendo redução na frequência de plantas com sintomas, indicando um forte declínio populacional da praga. A frequência do sintoma de ataque nos novos lançamentos foliares alcançou níveis muito baixos, praticamente nulos, ao final de fevereiro de 2020, permitindo que os cacauzeiros emitissem folhas jovens saudáveis.

A pluviometria registrada pela fazenda no período de setembro de 2019 a fevereiro de 2020 encontra-se na Tabela 1. Nela, constata-se que as precipitações nos meses de setembro, outubro e novembro de 2019 foram baixas, sendo a média dos três meses de quase 52 mm, caracterizando o período como estiado. Em contraposição, de dezembro/19 a janeiro/20, a média de chuva foi de 175 mm, sendo pelo menos 3,4 vezes maior do que a do período estiado.

A comparação da evolução da frequência de plantas com sintomas do ataque do trips com a pluviometria do período, sugere uma potencial interação entre ambas. O acompanhamento visual da frequência de

plantas atacadas sugeriu que o incremento populacional do trips coincidiu com o período estiado e que a população decresceu no período que a pluviometria foi incrementada. Isto é, o acompanhamento empírico das plantas com sintomas de ataque sugeriu a hipótese de interação negativa entre pluviometria e população de *S. dorsalis*.

Interação negativa e significativa entre populações de várias espécies de trips e pluviometria é recorrente na literatura. Em cacauzeiro, foi demonstrado que o incremento da pluviometria deprime a população de *S. rubrocinctus*, (Fennah, 1955; Morales et al., 1963), e, que em períodos de baixa pluviometria (estiagem), coincidente com a frutificação e o influxo lançamento de folhas imaturas, favorece o incremento da população dessa espécie de trips, (Smith, 1973). Segundo experimento realizado por Youdeowei (1970) com armadilhas Moerick (bacias d'água) dispostas sob a copa do cacauzeiro, foi demonstrado que o impacto mecânico da chuva provocava o arrastamento dos indivíduos jovens para o solo, provocando a morte dos mesmos.

Há vários estudos da interação fatores climáticos e o trips da pimenta. Na Índia, foram comprovadas correlações positivas e significativas entre população e temperaturas máxima e média, evaporação e horas de sol (Shitole, 2013; Zainab, Sathua & Singh, 2016). Estas pesquisas confirmam que *S. dorsalis* requer ambiente quente para seu pleno desenvolvimento.

Em cultivos de pimenta e pimentão, foram demonstradas correlações negativas e significativas entre população de *S. dorsalis* e as seguintes variáveis climatológicas: umidade relativa (Shitole, 2013; Zainab, Sathua & Singh, 2016) e precipitação (Shitole, 2013; Zainab, Sathua & Singh, 2016; Saini et al., 2017). Correlacionando a população de *S. dorsalis* com os dados climáticos, defasados em duas semanas, Gopal et al. (2018) obtiveram correlações negativas e significativas para pluviometria, número de dias com chuva e evaporação.

## Conclusão

Os estudos sobre a sintomatologia dos ataques do trips no cacauzeiro permitem desenvolver um sistema amostragem do *S. dorsalis*. Os estudos de dinâmica populacional revistos sugerem que o manejo e controle

Tabela 1. Pluviometria mensal, do período de setembro de 2019 até janeiro de 2020, registrada na Fazenda Alvorada, Eunápolis, BA

Meses	Set/19	out/19	nov/19	dez/19	jan/20
Mm	48	17	90	210	140



do *S. dorsalis* deve ser fundamentado num sistema de amostragem integrando coleta de dados climatológicos local, com ênfase na pluviometria, temperatura e monitoramento das fenologias de lançamento foliar e frutificação do cacauero.

### Agradecimentos

Agradecemos aos proprietários da Fazenda Alvorada, Senhores Fernando de Martins e Fernando de Martins Filho, e ao gerente de produção Patrício Izoton pelo fornecimento das informações da pluviometria e liberação do cacauero para levantamentos e coletas fitossanitárias.

### Literatura Citada

- ABREU, J. M. et al. 1989. Manejo de Pragas do Cacauero. CEPLAC/CEPEC. Ilhéus, Bahia. 32p.
- AMIN, P. W.; REDDY, D. V. R.; GHANEKAT, A. M. 1981. Transmission of tomato spotted wilt virus, the causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. Plant Disease 65:663-665.
- ANANTHAKRISHNAN, T. N. 1993. Bionomics of thrips. Annual Review of Entomology 38:71-92.
- CABI. 2022. Invasive Species Compendium report: *Maconellicoccus hirsutus* (Pink Mealybugs hibiscus). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40171>.
- CAVALLERI, A. et al. 2018. Os Tripes do Brasil. <http://www.thysanoptera.com.br/>.
- CERMELI, M.; PEROZO, J.; PIÑANGO, L. 2009. *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera, Thripidae) nuevo insecto plaga del algodón ( *Gossypium hirsutum* L) en Venezuela. Entomotropica 24(2):85-88.
- COLLINS, D. R.; CANNON, R.; MAC LEOD, A. 2006. Chilli thrips - *Scirtothrips dorsalis*. Plant Pest Notice n° 40. Central Science Laboratory. DEFRA. 3p.
- DIAS-PINI, N. S. et al. 2018. *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae): A Newly Introduced Polyphagous Pest in Northeastern Brazil. Neotropical Entomology volume 47:725-728.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PÉQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 2022. Pragas quarentenárias – <https://www.embrapa.br/tema-pragas-quarentenarias/sobre-o-tema>. Acesso em 05/07/2022.
- FENNAH, R. G. 1955. The epidemiology of cacao thrips on cacao in Trinidad. In Imperial College of Tropical Agriculture. A Report on Cacao Research, St. Augustine, Trinidad: 7-26.
- GOPAL, G. V.; LAKSHMI, K. V.; BABU, B. S.; VARMA, P. K. 2018. Seasonal incidence of chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis* hood in relation to weather parameters. Journal of Entomology and Zoology Studies 2018; 6(2):466-471.
- GLOBAL PEST AND DISEASE DATABASE - GPDD. 2011. Report on GPDD Pest ID 1276 *Scirtothrips dorsalis* - Last Full Review, 15 p.
- KLASSEN, W.; SEAL, D. R.; CIOMPERLIK, M. A.; FIESLEMANN, D. A. 2008. The Chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis*: current status in the greater Caribbean region. Proceedings of the Caribbean Food Crops Society 44(1):103-174.
- KUMAR, V. et al. 2016. Thrips Management Program for Horticultural Crops. Pdf download em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN114500.pdf>>
- KUMAR, V.; SEAL, D. R.; KAKKAR, G. 2009. Chilli thrips *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae). Pdf in: <https://edis.ifas.ufl.edu/in833>.
- KUMAR, V. et al. 2012. New Tropical Fruits Hosts of *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) and its relative abundance on them in South Florida. Florida Entomologist 95(1):205-207.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. 2021. Portaria n° 372, de 03 de agosto de 2021, D.O.U. 05/08/2021. Declara o Acre como estado em quarentena para a praga quarentenária ausente *Moniliophthora roreri*.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. 2007. Instrução Normativa n° 52, D.O.U. 21/11/2007. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ANEXO I.

- MORALES, M. E. et al. 1963. Fluctuaciones de algunas poblaciones de insectiles del cacao en el Atlántico. Ministerio de Agricultura e Ganadería, San Jose, Costa Rica. Boletín Técnico nº 44. 19p.
- MOUND, L. Á.; PALMER, J. M. 1981. Identification, distribution and host plants of the pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). Bulletin of Entomology Research 71:467-479.
- NAKAYAMA, K. 2019. Cochonilha rosada (*Maconellicoccus hirsutus*, Green, 1908) ataca cacauero e outros cultivos tropicais. Ilhéus, BA, CEPLAC/CEPEC. Boletim Técnico, nº 212. 32p.
- NIETSCHKE, B. S. et al. 2008. Climatological Potential for *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) establishment in the United States. Florida Entomologist 91(1):79-86.
- OEPP/EPPO. 2005. Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 56:271-273.
- PALMER, J. M.; MOUND, L. A.; DE HAUME, G. J. 1989. Thysanoptera. IIE Guides to Insects of Importance to Man. Inter. Inst. of Entomology. CABI, Wallingford, UK. 73p.
- PEREIRA, J. L. et al. 1990. First occurrence of witches' broom disease em the principal cocoa-growing region of Brasil. Tropical Agriculture 67(2):188-189.
- QUIROS, M. et al. 2007. Situación de *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) en viñedos del Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. In: Congreso Venezolano de Entomología, 20. Memorias. San Cristóbal, 2007. pp.154.
- SAINI, A. et al. 2017. Population dynamics of sucking pests infesting chilli (*Capsicum annum* L.). Journal of Entomology and Zoology Studies, 5(2):250-252.
- SEAL, D. R.; KLASSEN, W.; KUMAR, V. 2010. Biological Parameters of *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) on Selected Hosts. Environmental Entomology 39(5):1389-1398.
- SHITOLE, T. D. 2013. Population dynamics, yield losses and management of thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood infesting chilli. The award of the degree Doctor of Philosophy. Junagadh Agricultural University, Junagadh, Gujarat, India. Apêndices. 105p.
- SMITH, G. E. 1973. Dinâmica populacional do *Selenothrips rubrocinctus* (Giard, 1901) [Thysanoptera: Thripidae], na região cacauera do Espírito Santo, Brasil. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Apêndices. 82p.
- VENETTE, R. C.; DAVIS, E. E. 2004. Chilli thrips/ yellow thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae). Mini Pest Risk Assessment. University of Minnesota, St. Paul, MN, USA. 31p.
- YOUDEOWEI, A. 1970. The seasonal abundance of the cacao trips *Selenothrips rubrocinctus* Giard (Thysanoptera) in a cacao rehabilitation trial in Nigeria. Cacao (IICA) 15(3):14-15.
- ZAINAB, S.; SATHUA, S. K.; SINGH, R. N. 2016. Study of population dynamics and impact of abiotic factors on thrips, *Scirtothrips dorsalis* of chilli, *Capsicum annum* and comparative bio-efficacy of few novel pesticides against it. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology: 9(3):451-456. ●

## POTENTIAL OF ENDOPHYTIC FUNGI OF *Aechmea multiflora* AS GROWTH PROMOTERS OF THE HOST PLANT

*Eliane Santana Rodrigues*<sup>1</sup>, *Aurélio José Antunes de Carvalho*<sup>3</sup>, *Edna Dora Martins Newman Luz*<sup>2</sup>, *Ana Cristina Fermino Soares*<sup>1</sup>, *José Luiz Bezerra*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Recôncavo da Bahia, Postgraduate Program in Agricultural Sciences - PPGCAG, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil; elianesantana@gmail.com; acsoares@ufrb.edu.br; jlulabezerra@hotmail.com.

<sup>2</sup>State University of Santa Cruz, Postgraduate Program in Plant Production - PPGPV, 45662-900, Ilhéus, BA, Brazil; ednadora@yahoo.com.br. <sup>3</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Bahia - IF Baiano, 45320-000, Santa Inês, BA, Brazil; aurelio.carvalho@ifbaiano.edu.br

This study aimed to assess endophytic fungi isolated from *Aechmea multiflora* for their capacity of promoting growth of host plantlets. The experiment was conducted in a greenhouse under a completely randomized experimental design with 11 treatments plus control and 12 repetitions. The treatments consisted of: T1: *Aspergillus* 1; T2: *Aspergillus* 3; T3: *Chaetomium* 1; T4: *Chaetomium* 2; T5: *Lasiodiplodia*; T6: *Mycelia sterilia*; T7: *Polyschema*; T8: *Trichoderma* 12; T9: *Trichoderma* 2; T10: *Trichoderma* 4; T11: *Trichoderma* 5; T12: Control (distilled water). Fifteen agronomic parameters were assessed and were statistically analyzed, with the means of the treatments clustered by Scott-Knott test (5%). The endophytic fungi inoculated impacted plant and stem length, stem diameter, fresh mass of the leaf, stem, root, and total fresh mass, and dry mass of the stem and root in relation to control. They did not influence, however, the yield of variables such as number of leaves, basal and median D leaf width, root length, leaf dry mass, and total dry mass. The strains “*Aspergillus* 1”, “*Aspergillus* 3,” “*Mycelia sterilia*,” “*Chaetomium* 1,” and “*Chaetomium* 2” positively contributed to nearly all parameters analyzed that were statistically significant.

**Key words:** Bromeliaceae, endophytism, growth promotion.

**Potencial de fungos endofíticos de *Aechmea multiflora* como promotores de crescimento da planta hospedeira.** Neste trabalho objetivou-se avaliar fungos endofíticos isolados de *Aechmea multiflora* quanto a sua capacidade de promover crescimento de mudas do hospedeiro. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob delineamento experimental inteiramente casualizado, com 11 tratamentos mais controle e 12 repetições. Os tratamentos consistiram em: T1: *Aspergillus* 1; T2: *Aspergillus* 3; T3: *Chaetomium* 1; T4: *Chaetomium* 2; T5: *Lasiodiplodia*; T6: *Mycelia sterilia*; T7: *Polyschema*; T8: *Trichoderma* 12; T9: *Trichoderma* 2; T10: *Trichoderma* 4; T11: *Trichoderma* 5; T12: Controle (água destilada). Foram avaliados quinze parâmetros agrônômicos que foram estatisticamente analisados e as médias dos tratamentos agrupadas pelo teste de Scott-Knott (5%). Os fungos endofíticos inoculados interferiram no comprimento da planta, do caule, diâmetro do caule, massa fresca da folha, do caule, da raiz, total, massa seca do caule e da raiz em relação ao controle. Mas não influenciaram o rendimento de variáveis como número de folhas, largura basal e mediana da folha D, comprimento da raiz, massa seca da folha e massa seca total. As cepas “*Aspergillus* 1”, “*Aspergillus* 3”, “*Mycelia sterilia*”, “*Chaetomium* 1” e “*Chaetomium* 2” contribuíram positivamente para quase todos os parâmetros analisados que foram estatisticamente significativos.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae, endofitismo, promoção de crescimento.

## Introduction

In recent decades, the use of biological approaches to improve agricultural production has gained special attention among environmentalists and agronomists due to greater awareness on environmental conservation (Ahemad and Kibret, 2014). The use of microorganisms to increase the productivity of plant species may be a sustainable, low-cost possibility (Graças et al., 2015), thus minimizing the use of chemical inputs and easing soil and water pollution, which makes it a major tool for environmental remediation (Khan et al., 2015).

Microbial endophytes colonize the internal and healthy tissues of the host plant without causing symptomatic damage, competing for space in the same ecological niches as microbial pathogens (Hassan, 2017). Endophyte-host interactions, according to environmental conditions, may range from mutualism to antagonism depending on the nature of the biocommunication between the host plant, the microorganism, and environmental conditions (Schulz and Boyle, 2005).

Endophytes occupy the same ecological niche as most pathogens, so they are believed to use the same strategy for colonization of host tissue, through successful penetration of the plant's outer protective layers, mechanical fractures of these tissues or the synthesis of enzymes resulting in digestion of the cuticular and epidermal layers (Petrini, Stone and Carroll, 1982).

For Wang et al. (2007), the colonization of endophytic microorganisms in the host plant can also occur through the penetration of plant organs through natural openings such as stomata and/or hydathodes and through secondary roots. Infection can also occur vertically, through the seeds of the host, systematically infecting the plant after seed germination and thus being able to inhabit the plant tissue throughout its life (Chapla, Biasetto and Araújo, 2013; Dutta et al., 2014).

Studies aiming at clarifying the role of microbial endophytic communities in increasing plant sanity and as growth promoters have been developed (Vurukonda, Giovanardi and Stefani, 2018). Those studies have shown that endophytes are able to improve biomass production and the formation of extra-radicular hyphae for nutrient absorption, stimulate root growth, alter plant

metabolism to promote nutrient absorption, promote the growth of the host plant in a direct way through the synthesis of phytohormones, such as indole-acetic acid (Johnston-Monje et al., 2019), gibberellins (Khan et al., 2011), and cytokinins (Arkhipova et al., 2007), thus improving solubilization of phosphate (Spagnoletti et al. (2017), potassium, and zinc (Colla et al., 2014), and enabling greater efficiency in nitrogen fixation (Yang et al., 2015).

Some endophytic microorganisms are able to increase host resistance to abiotic and biotic stresses such as pests and diseases, possibly contributing indirectly to the growth and development of the host plant (Sudha et al., 2016). In recent decades, studies have reported the production of several bioactive compounds with antimicrobial, insecticide, and cytotoxic properties (Khan et al., 2015).

A beneficial interaction of the microorganism with the plant requires efficient colonization of endophytes in the host plant, comprising a series of phenomena such as fixation, entry, motility, transmission, and multiplication of endophyte populations in the host plant (Kumar et al., 2020). The process of the microorganism entering into the host tissue comprises the secretion of different signaling compounds by endophytes, while the perception of the microorganism on the cellular surface of the plant sets off defense responses to slow down or block microbial growth (Araújo et al., 2020).

Endophytic fungi of ornamental plants, such as bromeliads, are still relatively little investigated. Studies involving the microorganisms associated with *Aechmea multiflora* L.B. Sm and their benefits for the production of plantlets are non-existent. Therefore, the present study aimed to assess the behavior of endophytic fungi isolated from *A. multiflora* for their capacity of promoting growth of host plantlets.

## Materials and Methods

The experiment was conducted between January and December at the Cruz das Almas - BA campus of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). The municipality of Cruz das Almas is located at 12°40'0"S and 39°06'0"W at 200 m altitude, with climate Aw to Am, tropical hot and humid according to the Köppen classification. The mean annual temperature is 24.5 °C with mean annual rainfall around 1,224 mm.



The seeds used came from healthy ripe fruits of *A. multiflora* collected in the municipality of Milagres - BA, "12°52'14" South Latitude and 39°51'4" West Longitude. The seeds extracted from the fruit were washed in running water over a fine-mesh sieve and then placed onto absorbent paper to dry in a well-ventilated shaded place (Figure 1). To obtain the seedlings, the seeds were disinfested in 1% hypochlorite solution and seeded in plastic tubes containing commercial substrate for bromeliads Vitaplan® and kept in a greenhouse.

After 37 days, period during which it was possible to observe the development of the first three definitive leaves on the seedlings and they were transferred to acrylic containers with approximately 400 mL capacity containing 180 mL of a formulation of Vitaplan®, pine bark, and earthworm humus at a 2:1:1 proportion. The substrate was chosen considering an adequate supply of organic matter in order to allow good aeration and drainage of irrigation. The containers were kept on shelves in a growing room with controlled photoperiod of 12 h at room temperature ( $25 \pm 2$  °C).

The experimental design employed was fully randomized with 12 treatments and 12 repetitions, consisting of one plant, the experimental unit, for a total of 144 experimental units. Eleven endophytic strains were selected from the 65 isolated from the aerial part and root system of *A. multiflora*, belonging to the genera: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Lasiodiplodia*, *Chaetomium*, *Polyschema*, and *Mycelia sterilia*.

The treatments were laid out as follows: T1- *Aspergillus* 1; T2- *Aspergillus* 3; T3- *Chaetomium*

1; T4- *Chaetomium* 2; T5- *Lasiodiplodia*; T6- *Mycelia sterilia*; T7- *Polyschema*; T8- *Trichoderma* 12; T9- *Trichoderma* 2; T10- *Trichoderma* 4; T11- *Trichoderma* 5; T12 - Control (distilled water).

All isolates were seeded in 9 cm Petri dishes containing PDA (Potato-Dextrose-Agar) culture medium and incubated at 28 °C for a period long enough for the development of spores (varying from 2 to 5 weeks). After incubation, the inoculum was prepared with suspension of spores for the isolates of *Aspergillus*, *Trichoderma*, and *Chaetomium*.

To each dish containing the colonies, 15 mL sterile distilled water and two drops of Tween 20® were added and the colonies were scraped using a Drigalski spatula. The spore concentration of the suspension was adjusted to the final desired concentration ( $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>) by counting spores in the Neubauer chamber using an optical microscope, with dilution of the suspension when needed.

For the isolates that did not produce spores in enough quantity, such as *Lasiodiplodia*, *Polyschema*, and *Mycelia sterilia*, mycelial suspensions were performed. The mycelian suspension consisted of grinding the mycelium produced by the colonies with the same amount of sterile distilled water used in the spore suspension.

The first inoculation was carried out 30 days after the first transplant and consisted of spraying the entire extension of the plantlets with fungal suspensions with an application of 0.5 mL of the suspension in each plantlet (Figure 2). The control treatment was sprayed with 0.5 mL distilled water. After inoculation, the

containers returned to the growing room and were placed on shelves with controlled photoperiod of 12 h at room temperature ( $25 \pm 2$  °C) for 65 days.

After the 65-day period, the plantlets were taken to a greenhouse and transplanted into vases of approximately 180 mL capacity with holes in the bottom for water drainage (Figure 3). The substrate used was formulated with

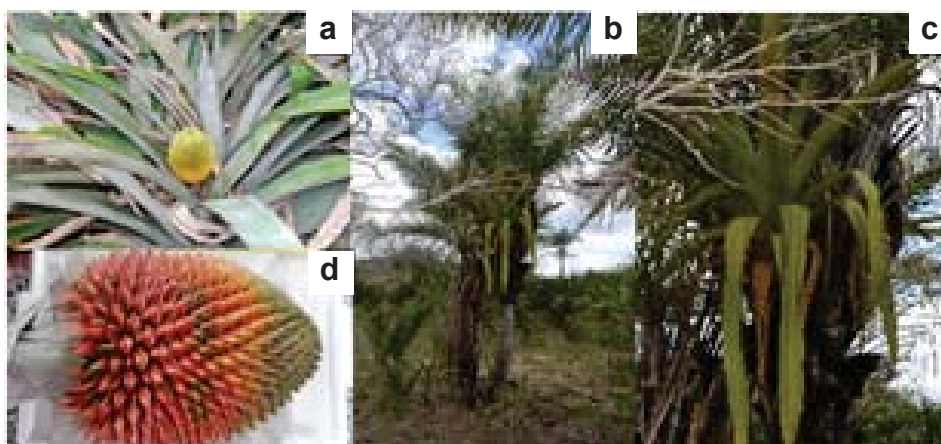


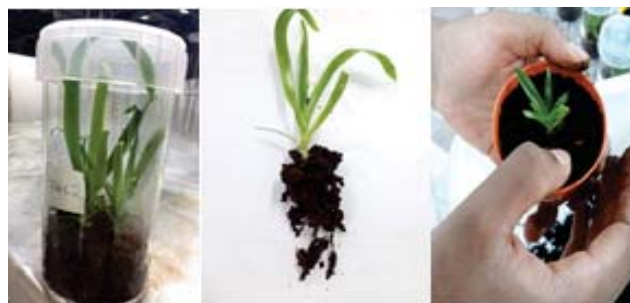
Figure 1. (a,b) -Inflorescence of *Aechmea multiflora*; (c,d)-*Aechmea multiflora* under Licurizeiro (*Syagrus coronata*), in Comunidade Jatobá-BA. Source: Own collection





Source: Own collection

Figure 2. Inoculation performed 30 days after the first transplant (0.5 mL of suspension in each seedling).



Source: Own collection

Figure 3. 65 days after the first inoculation: transplanting to pots.

Vitaplan<sup>®</sup>, pine bark, and earthworm humus at 2:1:1 proportion. Initially, a humid chamber was assembled with plastic canvas for acclimatization of the plantlets.

The second inoculation took place 90 days after the second transplant and consisted of spraying each plant with 6.0 mL of the fungal suspension corresponding to each isolate used as treatment, with the same amount of distilled water used for the control treatment.

At 206 days after the second transplant, the plantlets were assessed for morphological characteristics. Plant length was determined using a graded ruler (cm) considering the interval between the insertion point of the D leaf in the stem and the extremity of the foliar limb. The number of leaves per plant was determined through counting from the basal leaf until the last open leaf, disregarding the ones in senescence process. The basal and median widths of the D leaf were measured with a graded ruler (cm), the width of the base of the

D leaf, where the foliar limb began; the median width considered the median distance between the base of the leaf and the peak of the foliar limb of the D leaf.

Stem length and diameter were determined using calipers (cm) after all leaves were plucked. Root length was measured as the distance from the crown to the extremity of the main root. Fresh masses of leaves, stem, and root were obtained by immediate weighing using a precision electronic scale (g). The total fresh mass was inferred from the sum of the fresh mass of the entire aerial part and fresh mass of the root system of the plant, expressed in g. To determine the dry masses of leaf, stem, and root, the plant organs were stored in paper bags and placed in a forced air oven at 65 °C until constant weight. After that, they were weighed using a precision electronic scale (g). Total dry mass was inferred from the sum of the dry mass of the entire aerial part and dry mass of the root system of the plant, expressed in g.

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the software R-Studio. The means were compared by Scott-Knott test at 5% significance when the value of the F-test in the ANOVA was significant.

## Results and Discussion

Considering the treatments in general, the following variables were significant at 5% probability: plant and stem length; stem diameter; fresh masses of leaves, stem, root, and total fresh mass; dry mass of stem, root, and total dry mass (Tables 1 and 2).

Plant length was significantly influenced by the treatments applied (Table 3). The highest value (23.34 cm) corresponded to the plants inoculated with the suspension of the endophytic “*Aspergillus 1*” while the lowest (18.75 cm) corresponded to those that received distilled water as control treatment. Only two treatments did not differ from the control: *Polyschema* and *Trichoderma 5*. The other nine endophytes tested were effective for this variable and did not differ among themselves. Bilal et al. (2018) also observed that a strain, identified as *Aspergillus fumigatus* TS1, positively influenced the length of the aerial part of plantlets of mutant Waito-C rice, besides contributing to root development and biomass production, which was attributed to the production of some phytohormones.

Table 1. Summary of the analyses of variance of the number of leaves (NL), length (LEN), basal width (BASWID), and median width (MEDWID) of the D leaf, stem length (SL), stem diameter (SD), and root length (RL) of *Aechmea multiflora* plantlets as a function of the endophytic fungi inoculated

SV	DF	Mean Square						
		NL	LEN	BASWID	MEDWID	SL	SD	RL
Treatment	11	3.4242 <sup>ns</sup>	21.8530*	0.53954 <sup>ns</sup>	0.21917 <sup>ns</sup>	0.148273*	0.070152*	13.3855 <sup>ns</sup>
Residue	108	2.1278	7.8279	0.24856	0.13143	0.047463	0.033815	8.5842
CV (%)	-	8.07	13.01	14.34	13.01	19.9	13.34	17.48

\* Significant effect according to F-test at 5% probability level; n.s. - non-significant

Table 2. Summary of the analyses of variance of the leaf fresh mass (LFM), stem fresh mass (SFM), root fresh mass (RFM), total fresh mass (TFM), leaf dry mass (LDM), stem dry mass (SDM), root dry mass (RDM), and total dry mass (TDM) of *Aechmea multiflora* plantlets as a function of the endophytic fungi inoculated

SV	DF	Mean Square							
		LFM	SFM	RFM	TFM	LDM	SDM	RDM	TDM
Treatment	11	169.37*	0.66191*	1.8550*	211.674*	0.36997 <sup>ns</sup>	0.0074763*	0.0315299*	0.62955 <sup>ns</sup>
Residue	108	3,885.8	0.12487	0.2372	40.547	0.25838	0.0009416	0.0044024	0.29186
CV (%)	-	19.95	21.13	16.87	18.39	18.73	17.93	14.9	16.22

\* Significant effect according to F-test at 5% probability level; n.s. - non-significant

Table 3. Result of the Scott-Knott Test, at a 5% probability level, between the inoculated treatments, for each of the variables: number of leaves (NF), length (COMP), basal width (LARBAS) and, median width (LARMED) of leaf D, stem length (CC), stem diameter (DC), root length (CR), leaf fresh mass (MFF), stem fresh mass (MFC), root fresh mass (MFR), total fresh mass (MFT), leaf dry mass (MSF), stem dry mass (MSC), root dry mass (MSR) and total dry mass (MST) of *Aechmea multiflora* seedlings

Fungi	COMP (cm)	CC(cm)	DC(cm)	MFF(g)	MFC(g)	MFR(g)	MFT(g)	MSC(g)	MSR(g)
<i>Aspergillus 01</i>	23.34 a	1.17 a	1.46 a	35.11 a	1.99 a	3.29 a	40.39 a	0.19 a	0.52 a
<i>Aspergillus 03</i>	23.27 a	1.22 a	1.43 a	32.78 a	1.83 a	3.59 a	38.22 a	0.18 a	0.50 a
<i>Mycelia sterilia</i>	22.33 a	1.16 a	1.45 a	33.54 a	1.76 a	2.97 b	38.28 a	0.19 a	0.44 a
<i>Chaetomium 01</i>	22.68 a	1.28 a	1.53 a	31.97 a	2.09 a	2.98 b	37.06 a	0.19 a	0.47 a
<i>Chaetomium 02</i>	21.66 a	1.01 b	1.42 a	33.25 a	1.65 a	2.50 c	37.42 a	0.18 a	0.41 b
Controle	18.75 b	0.99 b	1.23 b	20.70 b	1.26 b	2.29 c	24.26 b	0.12 b	0.34 b
<i>Lasiodiplodia</i>	21.51 a	0.98 b	1.33 b	31.36 a	1.44 b	2.88 b	35.68 a	0.17 a	0.47 a
<i>Polyschema</i>	20.34 b	1.14 a	1.37 b	24.67 b	1.55 b	2.04 c	28.26 b	0.15 b	0.38 b
<i>Trichoderma 012</i>	21.00 a	1.04 b	1.33 b	30.67 a	1.48 b	2.95 b	35.10 a	0.14 b	0.37 b
<i>Trichoderma 02</i>	22.37 a	0.93 b	1.34 b	29.07 a	1.68 a	3.22 a	33.99 a	0.14 b	0.49 a
<i>Trichoderma 04</i>	21.66 a	1.25 a	1.37 b	30.38 a	1.90 a	3.03 b	35.32 a	0.20 a	0.45 a
<i>Trichoderma 05</i>	19.16 b	0.97 b	1.28 b	27.31 b	1.37 b	2.86 b	31.56 b	0.13 b	0.44 a
Média	21,50	1,09	1,37	30,06	1,66	2,88	34,62	0,16	0,44

\* Means followed by the same letters and in the same column do not differ statistically from each other, by the Scott Knott Test, at the 5% probability level.

The production of plant and biochemical hormones by microorganisms depends on a series of conditions such as pH, temperature, incubation period, types of microorganism, growth dynamics, and internal physiology (Khan et al., 2012). In this study, in addition to the strains “*Aspergillus 1*” e “*Aspergillus 3*”,

*Mycelia sterilia*, “*Chaetomium 1*”, “*Chaetomium 2*”, “*Lasiodiplodia*”, “*Trichoderma 2*”, “*Trichoderma 4*”, “*Trichoderma 12*” promoted growth of the aerial part of *A. multiflora* in a similar manner. The length corresponds to the distance between the base of the plant and the apex of the D leaf.

The mean stem diameter was 1.37 cm and was positively influenced only by the fungi “*Chaetomium 1*”, “*Chaetomium 2*”, “*Aspergillus 1*”, “*Aspergillus 3*” and *Mycelia sterilia*. However, for the variable stem length, “*Polyschema*” and “*Trichoderma 4*” were also determinant. Stem diameter is a relevant quality parameter for plantlets given its importance in supporting the aerial part of the plant. Plants with small diameter may have difficulty in remaining erect after planted in the field, possibly suffering with deformations or even death (Lima et al., 2020). The least efficient treatments to increase stem diameter were “*Polyschema*”, “*Trichoderma 4*”, “*Trichoderma 2*”, “*Trichoderma 5*”, and “*Lasiodiplodia*”, which behaved in a similar manner as control.

According to Table 2, the highest values of fresh mass of leaf corresponded to plants that received the treatments “*Aspergillus 1*”, “*Chaetomium 1*”, “*Chaetomium 2*”, “*Aspergillus 3*”, *Mycelia sterilia*, “*Lasiodiplodia*”, “*Trichoderma 4*”, “*Trichoderma 12*”, and “*Trichoderma 2*”, which did not differ statistically.

Total fresh mass ranged from 40.39 to 24.26 g per plant and, similarly to leaf fresh mass, the best results were found for the plantlets inoculated with “*Aspergillus 1*”, “*Chaetomium 1*”, “*Chaetomium 2*”, “*Aspergillus 3*”, *Mycelia sterilia*, “*Lasiodiplodia*”, “*Trichoderma 4*”, “*Trichoderma 12*”, and “*Trichoderma 2*”, which also did not differ statistically, but were significantly different in the treatments Control, “*Polyschema*”, and “*Trichoderma 5*”, which had inferior gains of total fresh mass.

Regarding the root fresh mass, the plantlets inoculate with “*Aspergillus 1*”, “*Aspergillus 3*”, and “*Trichoderma 2*” with 3.29, 3.59, and 3.22 g, respectively, showed significantly better responses than the witness.

For the contents of leaf dry mass and total plant dry mass, no statistical difference was found between the treatments with the endophytes and the witness, with the plants having, on average, 2.70 g of leaf dry mass and 3.32 g of total plant dry mass. Hence, the treatments applied did not influence organic matter accumulation in the plant. The highest value of FMS was obtained with *Chaetomium 1* (2.09 cm), which did not significantly differ from *Aspergillus 1*, *Aspergillus 3*, *Mycelia sterilia*, *Chaetomium 2*, *Trichoderma 2*, or *Trichoderma 4*, except for

treatments Control, *Lasiodiplodia*, *Polyschema*, *Trichoderma 12*, and *Trichoderma 5*, which showed low values.

For the variable RDM, the highest variable was found for treatment “*Aspergillus 1*”, which did not statistically differ from treatments *Aspergillus 3*, *Mycelia sterilia*, *Chaetomium 1*, *Lasiodiplodia*, *Trichoderma 2*, *Trichoderma 4*, or *Trichoderma 5*, differing only from treatments *Chaetomium 2*, Control, *Polyschema*, and *Trichoderma 12*.

Treatment *Trichoderma 4* led to a higher increase in stem dry mass (0.20 g), however, it did not statistically differ from treatments “*Aspergillus 1*”, *Aspergillus 3*, *Mycelia sterilia*, *Chaetomium 1*, *Chaetomium 2*, *Lasiodiplodia*, or *Trichoderma 5*. Treatments Control, *Polyschema*, *Trichoderma 12*, *Trichoderma 2*, and *Trichoderma 5* reached the lowest averages (0.12; 0.15; 0.14; 0.14; 0.13 g, respectively) for this characteristic.

The control treatment, which had no fungal inoculation, showed inferior performance, with the lowest averages for the six variables studied (LEN, SD, FML, DML, DMS, and DMR), which suggests the plantlets developed better in the presence of endophytes. Treatments *Aspergillus 1*, *Aspergillus 3*, *Mycelia sterilia*, *Chaetomium 1*, and *Chaetomium 2* stood out for the efficiency in improving several variables.

According to Salvatore; Andolfi and Nicoletti (2020), there is a fine line between pathogenicity and endophytism, seen as many pathogens have a latent stage in their life cycles during which they are asymptomatic to the host. The duration of this stage is variable and depends on changes in susceptibility of the host induced by environmental stresses.

Although many records of the genus *Lasiodiplodia* as a phytopathogenic are found, it is also acknowledged in other hosts for its capacity of colonizing plant tissues with no apparent symptom (Cardoso et al., 2009). The results found in this study show that the treatment applied, composed of the mycelial suspension of *Lasiodiplodia*, positively contributed to growth parameters such as length, leaf fresh mass, total fresh mass, stem dry mass, and root dry mass, obtaining higher mean values compared to the control treatment.

In this study, the treatments with *Trichoderma* were not uniform regarding the agronomic parameters

assessed, unlike the results obtained by Aguiar et al. (2013), who showed that *Trichoderma* spp. increased the fresh mass of the aerial part of bean plants.

In plantlets of *Camellia sinensis*, *T. asperellum* TC01 promoted an increase in shoot height, stem diameter, fresh weight of the shoot, fresh weight of the root, dry mass of the shoot, and dry mass of the root 45 days after inoculation in a greenhouse (Shang, Liu and Xu, 2020).

The data obtained show that the inoculation with the endophytic “*Aspergillus 1*” positively influenced the variables length, leaf fresh mass, total fresh mass, and root dry mass, which exhibited significant differences in relation to the control treatment (CON), thus showing that the association with the fungus favored nutrient absorption. Araújo et al. (2020), when assessing the growth-promoting potential of *Aspergillus niger* in coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets, also obtained significant increases in length and root dry mass. Similar results were obtained by Abdel-Motaal et al. (2020) when assessing the growth-promoting potential of the endophyte *Aspergillus flavus* in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), with the inoculation with *A. flavus* significantly increasing plant length compared to the control. Soybean plants inoculated with a new strain of *A. fumigatus* significantly increased the length and fresh biomass of the aerial part through the production of gibberellins (Khan et al., 2011).

According to Hung and Rutgers (2016), fungi of the genus *Aspergillus* have the potential of promoting the growth of plants via a broad range of mechanisms, such as helping in phosphate absorption, production of biologically active compounds such as auxins, gibberellins, and other compounds similar to phytohormones, besides a series of secondary metabolites.

It was observed that treatment C1, corresponding to the endophytic fungus “*Chaetomium 1*,” contributed to stem length and diameter and to an increase in fresh mass also of the stem (FMS). Khan et al. (2012) observed that the endophyte *Chaetomium globosum*, isolated from the roots of pepper plants (*Capsicum annuum* L.), significantly promoted growth of the aerial part, chlorophyll content, and biomass of rice plantlets. According to Schulz and Boyle (2005), plants treated with endophytes are constantly healthier than those

without the endophyte-host symbiosis. That can be attributed to the endophyte secreting phytohormones such as gibberellins and IAA (Khan et al., 2012).

## Conclusions

The endophytic strains “*Aspergillus 1*”, “*Aspergillus 3*”, “*Mycelia sterilia*”, “*Chaetomium 1*” and “*Chaetomium 2*” presented the best results in terms of promoting growth of the bromeliad *A. multiflora*, given their positive contribution to all parameters evaluated and statistically significant.

## Literature Cited

- ABDEL-MOTAAL, F. et al. 2020. Early blight suppression and plant growth promotion potential of the endophyte *Aspergillus flavus* in tomato plant. *Annals of Agricultural Sciences* 65(2):117-123. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2020.07.001>
- AGUIAR, A. R. et al. 2013. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. Carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ciência e Natura* 34(2\*):47-58. Disponível em <https://www.redalyc.org/pdf/4675/467547684002>. Acesso em 21 Abr. 2021.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science* 26(1):1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- ARAÚJO, V. C. et al. 2020. Enhanced growth in nursery of coffee seedlings inoculated with the rhizosphere fungus *Aspergillus niger* for field transplantation. *Rhizosphere* 15:100236.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. 2007. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil* 292(1):305-315. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9233-5>
- BILAL, L. et al. 2018. Plant growth promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis* 76(2):117-127. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4>
- CARDOSO, J. E. et al. 2009. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro



- e sua transmissão por propágulos. *Summa Phytopathologica* 35(4):262-266. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000400002>
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. 2013. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de química*, 421-437. <https://orcid.org/0000-0001-7616-9652>
- COLLA, G. et al. 2014. Co inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95(8):1706-1715. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- DUTTA, D. et al. 2014. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 57(5):621-629.
- GRAÇAS, J. P. et al. 2015. Microrganismos estimulantes na agricultura. Piracicaba, SP, ESALQ. 56 (Série Produtor Rural, 59).
- HASSAN, S. E. 2017. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of advanced research*, 8(6):687-695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>
- HUNG, R.; RUTGERS, S. L. 2016. Applications of *Aspergillus* in plant growth promotion. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, p.223-227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00018-X>
- JOHNSTON-MONJE, D. et al. 2019. Paying the rent: how endophytic microorganisms help plant hosts obtain nutrients. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00253-6>
- KHAN, A. L. et al. 2011. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process biochemistry* 46(2):440-447.
- KHAN, A. L. et al. 2012. Role of endophyte *Chaetomium globosum* lk4 in growth of *Capsicum annuum* by production of gibberellins and indole acetic acid. *Pakistan Journal of Botany* 44(5):1601-1607.
- KHAN, A. L. et al. 2015. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1):62-74.
- KUMAR, A. et al. 2020. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In: *Microbial Endophytes*. Woodhead Publishing, p.1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00001-6>
- PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, 60(6):789-796. <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1139/b82-102>
- LIMA, A. F. L. de, et al. 2020. Diferentes substratos na formação de mudas de biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.] Bail) em Humaitá, AM. *Scientia Plena*, 16(7):01-08. <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2020.070202>
- SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A.; NICOLETTI, R. 2020. The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture* 10(10):488. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100488>
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6):661-686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- SHANG, J.; LIU, B.; XU, Z. 2020. Efficacy of *Trichoderma asperellum* TC01 against anthracnose and growth promotion of *Camellia sinensis* seedlings. *Biological Control* 143:104205. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104205>
- SPAGNOLETTI, F. N. et al. 2017. Dark septate endophytes present different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. *Applied Soil Ecology* 111:25-32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.010>
- SUDHA, V. et al. 2016. Biological properties of endophytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.59. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>
- VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. 2018. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. *Revista internacional de ciências moleculares* 19(4):952.
- YANG, B. et al. 2015. Fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* affects nitrogen transformation processes and related microorganisms in the rice rhizosphere. *Frontiers in microbiology* 6:982. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00982>
- WANG, B. et al. 2007. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. *Mycological Research* 111(3):347-354.



## LEVANTAMENTO DE FUNGOS POLIPOROIDES DA CAATINGA E MATA ATLÂNTICA DA BAHIA

*Cristiane Duarte dos Santos<sup>1\*</sup>, Eliane Leal Candeias<sup>1</sup>, Julielton Silva Santos<sup>1</sup>, Ana Cristina Fermino Soares<sup>1</sup>, Alessandra Nasser Caiafa<sup>1</sup>, José Luiz Bezerra<sup>1,2,3</sup>*

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, 44.380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, km 16, 45662-900, Ilhéus, BA, Brasil.

\*Autor para correspondência: [agrocristiane@yahoo.com.br](mailto:agrocristiane@yahoo.com.br)

A Caatinga e a Mata Atlântica são dois biomas com uma elevada diversidade biológica, reunindo um expressivo número de táxons raros e endêmicos com importância ecológica, cultural e econômica. Quanto aos fungos poliporoides a Caatinga é menos explorada que a Mata Atlântica. A maioria dos trabalhos, até o presente estudo, sobre fungos poliporoides no Brasil foram realizados na Mata Atlântica. Oito coletas, quatro em cada bioma nos anos 2014/2015, foram realizadas, resultando em 196 espécimes coletadas, 161 táxons estudados e 61 espécies identificadas, distribuídas em oito famílias (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Meruliaceae, Mycenaceae, Polyporaceae, Schizophyllaceae e Stereaceae), tendo o gênero *Ganoderma* P. Karst. o maior número de espécies nos dois biomas, com alta similaridade entre eles e uma maior diversidade e abundância no bioma Mata Atlântica.

**Palavras-chave:** Basidiomicetos, Ganodermataceae, diversidade.

**Survey of polyporoid fungi from the Caatinga and Atlantic Forest of Bahia.** The Caatinga and the Atlantic Forest are two biomes with a high biological diversity, bringing together an expressive number of rare and endemic individuals with ecological, cultural and economic importance. As for the polyporoid fungi the Caatinga is less explored than the Atlantic Forest. Most of the studies up to the present study on polyporoid fungi in Brazil were carried out in the Atlantic Forest. Eight collections were carried out, four in each biome in the years 2014/2015. They yielded 196 specimens, 61 species, eight families (Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Meruliaceae, Mycenaceae, Polyporaceae, Schizophyllaceae and Stereaceae). The genus *Ganoderma* presented the highest number of species in both biomes, with high similarity between the biomes and greater diversity and abundance in the Atlantic Forest biome.

**Key words:** Basidiomycetes, Ganodermataceae, diversity

## Introdução

A Caatinga é um bioma formado por uma combinação de florestas secas e vegetação arbustiva cercada por florestas úmidas e de cerrados (Prado, 2003). Esse bioma abrange aproximadamente 70% da região nordeste e parte do norte de Minas Gerais, representando cerca de 11% do território nacional (Ramos e Braga, 2005). Segundo Giuliatti et al. (2004, 2005) a Caatinga é um dos maiores patrimônios biológicos do Brasil, reunindo um expressivo número de táxons raros e endêmicos com importância ecológica, cultural e econômica. Segundo Queiroz, Rapini & Giuliatti (2006) ao longo dos anos foi feita uma interpretação errônea ao afirmar que a Caatinga possuía baixa diversidade biológica. Em relação aos fungos muitas espécies do grupo poliporoides foram identificadas em revisões de coleções de basidiomicetos em diversos herbários e espécimes coletados em diferentes áreas do bioma Caatinga, por exemplo, *Lentinus crinitus* (Lloyd), *Gloeophyllum striatum* (Sw.) Murrill, *Phylloporia chrysites* (Berk.), *Ganoderma australe* (Fr.) Pat., *G. stiptatum* (Murrill) Murrill, *Favolus tenuiculus* P. Beauv., *Fomes fasciatus* (Sw.) Cooke, *Pycnoporus sanguineus*, *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryvardeen e *Corilopsis floccosa* (Jungh.) Ryvardeen (Maia e Gibertoni, 2002; Góes-Neto e Baseia, 2006; Drechsler-Santos et al. (2008, 2009, 2010, 2012, 2016). Os resultados dos trabalhos desses autores citados anteriormente vêm sugerir a grande diversidade de fungos poliporoides na Caatinga, que ainda é pouco explorada micologicamente, quando comparada a outros biomas como a Mata Atlântica. O bioma Mata Atlântica é considerado altamente prioritário para a conservação da biodiversidade mundial. Possui uma cobertura vegetal de aproximadamente 1.315.460 km<sup>2</sup> distribuídas em 17 estados, envolvendo diferentes tipos de vegetações como florestas ombrófilas densas, abertas e mistas, florestas estacionais decíduas e semidecíduas, campos de altitude, mangues e restingas (Fundação SOS Mata Atlântica, 2013). Segundo Maia et al. (2015), Mata Atlântica é o bioma brasileiro como maior diversidade e abundância de fungos poliporales até o momento. De toda diversidade de Basidiomycota encontrada na Mata Atlântica, uma parcela significativa pertence ao grupo dos poliporoides, especificamente

para as duas principais ordens desse grupo, Polyporales e Hymenochaetales (Gugliotta et al., 2016; Maia et al., 2015). A maioria dos trabalhos até o presente, sobre fungos poliporoides no Brasil foram realizados na Mata Atlântica por Gibertoni, Santos e Cavalcante (2007), Baltazar & Gibertoni (2009), Baltazar et al. (2012), Motato-Vásquez, Pires & Gugliotta (2014), Pires, Motato-Vásquez & Gugliotta (2015), esses trabalhos corroboram com as observações feitas ao longo dos anos, que a Mata Atlântica é o bioma mais estudado e explorado no que tange aos fungos poliporoides. No entanto são necessários mais estudos para afirmar de fato que o bioma Mata Atlântica é o mais diverso em fungos poliporoides, uma vez que biomas como a Caatinga ainda é subamostrado se comparado à Mata Atlântica. Essa conclusão só será possível quando a Caatinga for tão explorada cientificamente quanto a Mata Atlântica.

## Material e Métodos

**Área de Estudo:** Os materiais estudados foram coletados em uma região da Caatinga e outra na região de Mata Atlântica, com quatro coletas em cada área. Na Caatinga as coletas foram realizadas no Parque Estadual Sete Passagens (11°23'52.43" S 40°33'01.21" O), no município de Miguel Calmon-Bahia, duas no período seco de 2014/2015 e duas no período chuvoso de 2015. Na Mata Atlântica as coletas foram feitas em uma reserva particular chamada de Riacho do Fojo (13°18'05.58" S 39°31'25.75" O) no município de Mutuípe-Bahia, duas no período seco de 2015 e duas no período chuvoso de 2015.

**Coleta e Análise de Dados:** Em cada área de estudo as coletas foram realizadas da mesma maneira, coletando basidiomas próximo das trilhas por uma hora, fazendo fotografias dos fungos no local de coleta e acondicionando-os individualmente em sacos de papel com informações do substrato encontrado, estágio de decomposição do substrato, se foi encontrado em planta viva e por último codificando cada amostra. Os materiais foram levados para Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, onde foram mantidos por tempo necessário à sua secagem em estufa entre 40 a 50 °C, ficando uma subamostra de cada material

para identificação e as demais foram depositadas no herbário da UFRB. As análises macroscópicas consistiram na observação da cor, forma e tamanho dos basidiomas, quantificando o número de poros por mm no himenóforo e as reações com KOH 3%. A caracterização microscópica foi realizada por meio de cortes a mão livre de fragmentos dos basidiomas e subsequente montagem em lâminas com floxina 1% + KOH 3%; KOH 3%; e reagente de Melzer para verificação das reações dextrinoide e amiloide. As fotomicrografias foram obtidas em um microscópio ótico (Leica® DM750) e fotografadas com câmera Leica® ICC50HD. Os desenhos foram realizados com câmera lúcida, copiados em tinta nanquim e digitalizados. Após a caracterização macroscópica e microscópica, a identificação e classificação morfológica foi feita mediante consulta à literatura especializada de Ryvarden & Johansen (1980), Ryvarden (1991, 2004). Para o cálculo da frequência (F) foi usado a fórmula:  $F = (n \times 100) / N$ , onde  $n$  é o número de espécimes de uma espécie de fungo e  $N$  é o número total de espécimes encontrados. Foi estabelecido as seguintes classes de frequência:  $0,5 < F \leq 1,5\%$  = rara;  $1,5 < F \leq 5\%$  = ocasional;  $5 < F \leq 10\%$  = frequente;  $F > 10\%$  = abundante Lindblad (2000), Hattori (2005), Soares et al. (2014). A similaridade entre os dois biomas foi calculada usando os índices de Jaccard e Bray & Curtis no programa Fitopac 2.1 Shepherd (2010), enquanto que a diversidade foi medida pelo índice de Shannon-Wiener e Equabilidade (Evenness) ambos calculados no Species Diversity & Richness (Versão 4) Seaby & Henderson (2006).

## Resultados e Discussão

Foram coletados 196 espécimes de fungos poliporoides, classificando até o menor nível categórico 161 desses, com a identificação de 61 espécies distribuídas nas famílias Fomitopsidaceae, Ganodermataceae, Hymenochaetaceae, Meruliaceae, Mycenaceae, Polyporaceae, Schizophyllaceae e Steraceae. A família com maior número de representantes tanto para a Caatinga como para a Mata Atlântica foi a Polyporaceae com 19 e 11 espécies respectivamente. As famílias com menor representantes para a Caatinga foram Fomitopsidaceae, Mycenaceae e Steraceae com uma

espécie cada, já na Mata Atlântica as famílias com menor número de representantes foram Mycenaceae e Schizophyllaceae também com uma espécie cada. Quanto à riqueza no bioma Caatinga foi encontrado um total de 34 espécies dos quais 21 foram exclusivas para esse bioma, enquanto que na Mata Atlântica foram encontradas 40 espécies sendo 27 exclusivas para o mesmo e 13 espécies foram comuns para os dois biomas, tendo *Ganoderma* o gênero com maior número de espécies, três na Caatinga e cinco na Mata Atlântica. Apenas três espécies foram classificadas como abundante, *Pyrofomes* sp., *Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat e *Funalia caperata* (Berk.) Zmitr. & Malysheva, a primeira encontrada no bioma Caatinga e as outras na Mata Atlântica. Quanto à frequência foram encontradas cinco espécies *P. gilvus*, *F. caperata* e *Trulla polyporoides* (Ryvarden & Iturr.) Miettinen & Ryvarden na Caatinga e *Rigidoporus lineatus* (Pers.) Ryvarden e *Stereum ostrea* (Blume & T. Nees) Fr. na Mata Atlântica, as demais espécies foram classificadas como ocasionais e raras (Tabelas 1 e 2).

A similaridade entre os dois biomas usando o índice de Bray Curtis chegou a 65 %, enquanto que usando o índice de Jaccard foi de 21 %. Drechsler-Santos et al. (2010), estudando duas áreas de Caatinga em Pernambuco encontraram similaridades de 82,3 % e 60 % nos índices de Bray Curtis e Jaccard respectivamente, índices esses altos pois se trata de duas áreas no mesmo bioma. Gibertoni et al. (2007) estudando áreas de Mata Atlântica encontraram similaridade a partir de 40 % usando o índice de Jaccard em 51 pares de reservas. Outro estudo na Mata Atlântica em floresta costeira e montana foi observado uma similaridade que variou de 14 a 58 % usando o índice de Jaccard, nesses estudos os autores chamam atenção que a vegetação de floresta montana no período seco se assemelhou a vegetação da Caatinga, Gibertoni et al. (2015). Esse último resultado encontrado se aproxima mais dos observado no presente estudo. Quanto à diversidade dos biomas, foram encontrados um  $H'$  3.391 na Mata Atlântica e  $H'$  3.232 na Caatinga. Drechsler-Santos et al., 2010, estudando duas áreas de Caatinga no estado de Pernambuco encontraram ( $H'$  2,712;  $H'$  2.191). A Caatinga possui um grande potencial de diversidade de fungos poliporoides. Ao longo dos anos muitos estudos vem sendo realizados e uma expressiva

Tabela 1. Famílias e espécies de fungos poliporoides (Agaricomycetes) identificadas para a Caatinga da Bahia por frequência relativa e classe de frequência

Família/Espécies	Frequência (%)	Classe de Frequência
<b>Fomitopsidaceae Jülich</b>		
<i>Daedalea ryvarideniana</i> Drechsler-Santos & Robledo	2,44	Ocasional
<b>Ganodermataceae Donk</b>		
<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	1,22	Rara
<i>Ganoderma perzonatum</i> Murrill	2,44	Ocasional
<i>Ganoderma stipitatum</i> (Murrill) Murrill	1,22	Rara
<b>Hymenochaetaceae Donk</b>		
<i>Fomitiporia</i> sp. Murrill	1,22	Rara
<i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat.	9,76	Frequente
<i>Fuscoporia</i> sp. Murrill	2,44	Ocasional
<i>Fuscoporia torulosa</i> (Pers.) T. Wagner & M. Fisch.	3,66	Ocasional
<i>Hymenochaete</i> sp. Lév.	1,22	Rara
<i>Phellinotus neoaridus</i> Drechsler-Santos & Robledo	1,22	Rara
<i>Phellinus anchietanus</i> Decock & Ryvariden	2,44	Ocasional
<b>Meruliaceae P. Karst.</b>		
<i>Irpex</i> sp. Fr.	1,22	Rara
<i>Junghuhnia nitida</i> (Pers.) Ryvariden	1,22	Rara
<b>Mycenaceae Roze</b>		
<i>Panellus pusillus</i> (Pers. ex Lév.) Burds. & O.K. Mill.	1,22	Rara
<b>Polyporaceae Fr. ex Corda</b>		
<i>Dichomitus</i> sp.	1,22	Rara
<i>Favolus grammocephalus</i> Lloyd	1,22	Rara
<i>Fomes fascitus</i> (Sw.) Cooke	3,66	Ocasional
<i>Funalia caperata</i> (Berk.) Zmitr. & Malysheva	6,10	Frequente
<i>Funalia floccosa</i> (Jung.) Zmitr. & Malysheva	1,22	Rara
<i>Hexagonia hydroides</i> (Sw.) M. Fidalgo	2,44	Ocasional
<i>Lenzites stereoides</i> (Fr.) Ryvariden	1,22	Rara
<i>Loweporus tephroporus</i> (Mont.) Ryvariden	1,22	Rara
<i>Neofavolus mikawae</i> (Lloyd) Sotome & T. Hatt	3,66	Ocasional
<i>Peremiporia</i> sp.	1,22	Rara
<i>Polyporus dictyoporus</i> Mont.	2,44	Ocasional
<i>Polyporus</i> sp.	1,22	Rara
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill	3,66	Ocasional
<i>Pyrofomes</i> sp.	12,20	Abundante
<i>Trametes variegata</i> (Berk.) Zmitr., Wasser & Ezhov	1,22	Rara
<i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel	2,44	Ocasional
<i>Trichaptum sector</i> (Ehrenb.) Kreisel	3,66	Ocasional
<i>Trichaptum</i> sp.	3,66	Ocasional
<i>Trulla polyporoides</i> (Ryvariden & Iturr.) Miettinen & Ryvariden	8,54	Frequente
<b>Stereaceae Pilát</b>		
<i>Stereum</i> sp.	4,88	Ocasional

Tabela 2. Famílias e espécies de fungos poliporoides (Agaricomycetes) identificadas para a Mata Atlântica da Bahia com a frequência relativa e classe de frequência

Família/Espécies	Frequência (%)	Classe de Frequência
<b>Fomitopsidaceae Jülich</b>		
<i>Neoantrodia variiformis</i> (Peck) Audet	1,27	Rara
<i>Rhodofomitopsis feei</i> (Fr.) B.K. Cui, M.L. Han & Y.C. Dai, in Han, Chen, Shen, Song, Vlasák, Dai & Cui	2,53	Ocasional
<i>Fomitopsis ostreiformis</i> (Berk.) T. Hatt.	1,27	Rara
<i>Laetiporus pratigiensis</i> C.D. Santos & J. L. Bezerra	1,27	Rara
<b>Ganodermataceae Donk</b>		
<i>Amauroderma praetervisum</i> (Pat.) Torrend	1,27	Rara
<i>Amauroderma</i> sp.	1,27	Rara
<i>Amauroderma sprucei</i> (Pat.) Torrend	1,27	Rara
<i>Ganoderma australe</i> (Fr.) Pat.	3,80	Ocasional
<i>Ganoderma destructans</i> M.P.A. Coetzee, Marinc. & M.J. Wingf.	1,27	Rara
<i>Ganoderma gibbosum</i> (Cooke) Pat.	3,80	Ocasional
<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	1,27	Rara
<i>Ganoderma multiplicatum</i> (Mont.) Pat.	1,27	Rara
<i>Ganoderma stipitatum</i> (Murrill) Murrill	1,27	Rara
<i>Ganoderma</i> sp.	2,53	Ocasional
<b>Hymenochaetaceae Donk</b>		
<i>Fuscoporia callimorpha</i> (Lév.) Groposo, Log.-Leite & Góes-Neto	1,27	Rara
<i>Fuscoporia torulosa</i> (Pers.) T. Wagner & M. Fisch.	1,27	Rara
<i>Fuscoporia</i> sp.	1,27	Rara
<i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat.	10,13	Abundante
<i>Phellinus nilgheriensis</i> (Mont.) G. Cunn.	1,27	Rara
<i>Phylloporia ribis</i> (Schumach.) Ryvar den	1,27	Rara
<b>Meruliaceae P. Karst.</b>		
<i>Flavodon flavus</i> (Klotzsch) Ryvar den	1,27	Rara
<i>Gelatoporia dichroa</i> (Fr.) Ginns	1,27	Rara
<i>Gloeoporus pannocinctus</i> (Romell) J. Erikss.	1,27	Rara
<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryvar den	6,33	Frequente
<i>Rigidoporus</i> sp.	2,53	Ocasional
<b>Mycenaceae Roze</b>		
<i>Panellus pusillus</i> (Pers. ex Lév.) Burds. & O.K. Mill.	2,53	Ocasional
<b>Polyporaceae Fr. ex Corda</b>		
<i>Echinochaete ruficeps</i> (Berk. & Broome) Ryvar den	1,27	Rara
<i>Fibroporia citrina</i> (Bernicchia & Ryvar den) Bernicchia & Ryvar den	2,53	Ocasional
<i>Fomes</i> sp.	1,27	Rara



Continuação Tabela 2.

<i>Funalia caperata</i> (Berk.) Zmitr. & Malysheva	11,39	Abundante
<i>Funalia floccosa</i> (Jungh.) Zmitr. & Malysheva	3,80	Ocasional
<i>Lentinus berteroi</i> Bouriquet	1,27	Rara
<i>Lenzites stereoides</i> (Fr.) Ryvardeen	1,27	Rara
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murrill	1,27	Rara
<i>Trametes pavonia</i> (Berk.) Fr.	1,27	Rara
<i>Trametes villosa</i> (Sw.) Kreisel	3,80	Ocasional
<i>Trichaptum sector</i> (Ehrenb.) Kreisel	3,80	Ocasional
<b>Schizophyllaceae Quél.</b>		
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	1,27	Rara
<b>Stereaceae Pilát</b>		
<i>Stereum ostrea</i> (Blume & T. Nees) Fr.	6,33	Frequente
<i>Stereum</i> sp.	2,53	Ocasional

quantidade de novas espécies e novos registros vem sendo encontradas nesse bioma, Prado (2005), Silva, Santos e Tabarelli (2005), Drechsler-Santos et al. (2009, 2010, 2013, 2016), Baltazar et al. (2012). A diversidade maior para a Mata Atlântica observada nesse trabalho corrobora com os resultados de Maia et al. (2015), que trazem a Mata Atlântica com maior diversidade que a Caatinga. Muitos são os trabalhos desde o início dos estudos dos fungos polipodoides no Brasil até os dias de hoje encontrando novas espécies, e novos hospedeiros na Mata Atlântica, contribuindo assim para maior conhecimento desse bioma no que diz respeito aos fungos poliporoides, Fidalgo (1970), Berkeley (1842), Hennings (1902, 1904a,b), Patouillard (1907), Gibertoni et al. (2007), Baltazar et al. (2012), Maia et al. (2015), Pires et al. (2017).

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Zozilene N. S. Teles e Carolina Y. S. Martins, técnicas do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, pelo apoio recebido durante a pesquisa. Eles também agradecem a professora Lidyanne Y. S. Aona, curadora do Herbário do Recôncavo da Bahia - HURB, por toda a atenção e agilidade no processamento das amostras depositadas e às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESB pelo suporte financeiro.

### Literatura Citada

- BALTAZAR, J. M. et al. 2012. Contribution to the knowledge of polypores (*Agaricomycetes*) from the Atlantic Forest and Caatinga, with new records from Brazil. *Mycosphere Online - Journal of Fungal Biology* 3:267-280.
- BALTAZAR, J. M.; GIBERTONI, T. B. A. 2009. Checklist of the aphyllorphoroid fungi (Basidiomycota) recorded from the Brazilian Atlantic Forest. *Mycotaxon* 109:439-442.
- BERKELEY, M. J. 1842. Notice of some fungi collected by C. Darwin Esq. in South America and the Islands of the Pacific. *Annals and Magazine of Natural History, including Zoology, Botany, and Geology* 9(60):443-448.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2010. Ecological aspects of Hymenochaetaceae in an área of Caatinga (semi-arid) in Northeast Brazil. *Fungal Diversity* 42(1):71-78.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2016. *Phellinotus*, a new neotropical genus in the Hymenochaetaceae (Basidiomycota, Hymenochaetales). *Phytotaxa* 261(3):218-239.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2012. One Neotropical *Daedalea* species: *Daedalea ryvardeenica* sp. nov. *Kurtziana* 37(1):65-72.

- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2009. A re-evaluation of the lignocellulolytic Agaricomycetes from the Brazilian semi-arid region. *Mycotaxon* 108:241-244.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2013. New records of Auriculariales, Hymenochaetales and Polyporales (Fungi: Agaricomycetes) for the Caatinga Biome. *Check List* 9(4):800-805.
- DRECHSLER-SANTOS, E. R. et al. 2008. Revision of the Herbarium URM I. Agaricomycetes from the semi-arid region of Brazil. *Mycotaxon* 104:9-18.
- FIDALGO, O. 1970. Adições à história da micologia brasileira I. A coleta mais antiga. *Rickia* 5:1-3.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. 2013. Relatório anual 2013. São Paulo, SP, Fundação SOS. pp.67.
- GIBERTONI, T. B.; SANTOS, P. J. P.; CAVALCANTI, M. A. Q. 2007. Ecological aspects of Aphyllophorales in the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil. *Fungal Diversity* 25:49-67.
- GIBERTONI, T. B. et al. 2015. Distribution of poroid fungi (Basidiomycota) in the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation*. pp.2227-2237.
- GIULIETTI, A. M. et al. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: Silva, J.m.c.; Tabarelli, M.; Fonseca, M. T.; Lins, L. V. 2004. (Orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília, DF, Ministério do Meio Ambiente. pp.47-90.
- GIULIETTI, A. M. et al. 2005. Biodiversidade e conservação de plantas no Brasil. *Megadiversidade* 1:52-69.
- GÓES-NETO, A.; BASEIA, I. G. 2006. Filo Basidiomycota. In: Gusmão, L.F.P., Maia, L.C. 2006. (eds.) Diversidade e Caracterização dos Fungos do Semi-Árido Brasileiro. Recife, PE, Associação Plantas do Nordeste, v. II. pp.141-160.
- GUGLIOTTA, A. M. et al. 2016. Polyporales in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- HATTORI, T. 2005. Diversity of wood-inhabiting polypores in temperate forest with different vegetation types in Japan. *Fungal Diversity* 18:73-88.
- HENNINGS, P. 1902. Fungi S. Paulenses II a cl. Puttemans collecti. *Hedwigia* 41:295-311.
- HENNINGS, P. 1904a. Fungi fluminenses a cl. E. Ule collecti. *Hedwigia* 43:78-95.
- HENNINGS, P. 1904b. Fungi S. Paulenses III a cl. Puttemans collecti. *Hedwigia* 43:197-209.
- LINDBLAD, I. 2000. Host specificity of some wood-inhabiting fungi in a tropical forest. *Mycologia* 92(3):399-405.
- MAIA L. C. et al. 2015. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia*. 66(4):1033-1045.
- MAIA, L. C.; GIBERTONI, T. B. 2002. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: Sampaio, E. V. S. B.; Giulietti, A. M.; Virgínio, J.; Gamarrarójas, C. F. L. (eds.) Vegetação e Flora da Caatinga. Recife, Associação Plantas do Nordeste/APNE e Centro Nordestino de Informações sobre Plantas/CNIP. pp.163-176.
- MOTATO-VÁSQUEZ, V.; PIRES, R. M.; GUGLIOTTA, A. M. 2014. Polypores from an Atlantic rainforest area in southeast Brazil: pileate species. *Brazilian Journal of Botany* 37(3):1-16.
- PATOUILLARD, N. 1907. Basidiomycètes nouveaux du Brésil recueillis par F. Noack. 1907. *Annales Mycologici Editi in Notitiam Scientiae Mycologicae Universalis* 5(4):364-366.
- PIRES, R. M. et al. 2017. Polyporales and similar poroid genera (Basidiomycota) from Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. *Hoehnea*. 44(1):145-157.
- PIRES, R. M., MOTATO-VÁSQUEZ, V.; GUGLIOTTA, A. M. 2015. *Fuscoporia atlantica* sp. nov., a new polypore from the Brazilian Atlantic Rainforest. *Mycotaxon* 130:843-855.
- PRADO D. E. 2005. As Caatingas da América do Sul. In: Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (eds) *Ecologia e Conservação da Caatinga*, 2nd edn. Editora Universitária UFPE, Recife. pp.3-73.
- PRADO, D. E. 2003. As Caatingas da América do Sul. In: Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (Orgs.) *Ecologia e Conservação da Caatinga*.

- Prefacio de Marcus Luiz Barroso Barros. Recife, PE, Universidade da UFPE. pp.03-74.
- QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. 2006. Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, DF. pp.142.
- RAMOS, A. B.; BRAGA, D. V. V. 2005. Caatinga, conhecer para preservar. Brasília, DF, Departamento do Meio Ambiente. 306p.
- RYVARDEN, L. 2004. Neotropical polypores. Part 1: introduction, ganodermataceae & hymenochaetaceae. Synopsis Fungorum 19. Fungiflora, Oslo.
- RYVARDEN, L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and taxonomy. Synopsis Fungorum 5. Oslo, Fungiflora. p.363.
- RYVARDEN, L.; JOHANSEN, I. A. 1980. Preliminary flora of East Africa. Fungiflora: Oslo. p.636.
- SILVA, R. A.; SANTOS, A. M. M.; TABARELLI, M. 2005. Riqueza e Diversidade de Plantas Lenhosas em cinco Unidades de Paisagem da Caatinga. In: Leal, I.R., Tabarelli, M., Silva, J.M.C. (eds). Ecologia e Conservação da Caatinga, 2ed. Editora Universitária UFPE, Recife, PE. pp.337-365.
- SEABY, R. M.; HENDERSON, P. A. 2006. Species Diversity and Richness Version 4. Pisces Conservation Ltd., Lymington, England.
- SHEPHERD, G. J. FITOPAC. 2010. Versão 2.1. Campinas, SP, Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- SOARES, A. M. S. et al. 2014. Riqueza de fungos poliporoides (Agaricomycetes, Basidiomycota) em uma floresta ombrófila densa no Amapá, Amazônia brasileira. Bol. Mus. Biol. Mello Leitão (N. sér.) 35:5-18.



## REAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS A *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Nematoda)

*Rodrigo Souza Santos*<sup>1\*</sup>, *Paulo Roberto Pala Martinelli*<sup>2</sup>, *Miguel Fernando Calderoni*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Acre, Rod. BR 364, km 14, CP 321, 69900-970, Rio Branco, AC, Brasil. \*rodrigo.s.santos@embrapa.br

<sup>2</sup>Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior - ITES, Praça Dr. Horácio Ramalho, 159, Centro, Taquaritinga, SP, Brasil.  
prpmartinelli@yahoo.com.br; calderoni1981@hotmail.com

Planta medicinal é qualquer planta que produza princípios ativos que possam ser utilizados com finalidade terapêutica. Essas plantas podem ser atacadas por pragas e doenças que comprometem suas propriedades curativas e a produção. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de boldo (*Plectranthus barbatus*), menta (*Mentha spicata*), penicilina (*Alternanthera brasiliana*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e citronela (*Cymbopogon nardus*) a *Meloidogyne javanica*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no campo experimental do Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior (ITES), Taquaritinga, SP, a partir de mudas transplantadas para vasos de 5 L contendo substrato esterilizado. Realizou-se a inoculação nas mudas após 20 dias do transplante com 640 ovos + juvenis de segundo estágio (J2) por planta. Decorridos 90 dias após a inoculação, as raízes foram processadas para extração dos ovos e determinação do fator de reprodução (FR) do nematoide. Todas as plantas medicinais avaliadas foram resistentes (FR < 1) a *M. javanica*, podendo ser utilizadas em rotação de culturas em áreas com ocorrência desse nematoide.

**Palavras-chave:** Heteroderidae, hospedabilidade, nematoide-das-galhas, parasitismo.

**Reaction of medicinal plants to *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (Nematoda).** Medicinal plant is any plant that produces active principles that can be used for therapeutic purposes. These plants can be attacked by pests and diseases that compromise healing properties and production. In this sense, the aim of the present work was to evaluate the reaction of boldo (*Plectranthus barbatus*), mint (*Mentha spicata*), penicillin (*Alternanthera brasiliana*), peppermint (*Mentha piperita*), and citronella (*Cymbopogon nardus*) to *Meloidogyne javanica*. The experiment was carried out in a greenhouse in the experimental field of Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior (ITES), municipality of Taquaritinga, São Paulo state, Brazil, using seedlings transplanted into 5 L pots containing sterilized substrate. The seedlings were inoculated 20 days after transplanting with 640 eggs + second stage juveniles (J2) per plant. After 90 days after inoculation, the roots were processed to extract the eggs, and determine the nematode reproduction factor (RF). All medicinal plants evaluated were resistant (RF < 1) to *M. javanica*, and can be used in crop rotation in areas with occurrence of this nematode.

**Key words:** Heteroderidae, host suitability, root-knot nematode, parasitism.



## Introdução

Uma planta medicinal pode ser definida como sendo qualquer espécie vegetal que possua, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias (princípios ativos) usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos (WHO, 1998; Veiga Júnior e Pinto, 2005; Anvisa, 2021).

As plantas medicinais são produtoras de óleos voláteis ou essenciais, e estão presentes no cotidiano das pessoas, sendo empregadas visando a cura de enfermidades, em rituais religiosos e na aromaterapia (Lima et al., 2016; Nascimento e Prade, 2020). Ademais, essas plantas ou as substâncias voláteis delas extraídas, têm sido usadas como flavorizantes, aromatizantes e terapêuticos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Anvisa, 2021). Pesquisas indicam aumento regular no mercado de produtos naturais, apresentando uma média anual de crescimento estimada em 22% nos setores industriais de perfumaria, aromatizantes para produtos alimentícios, bem como em setores de processamento de óleos essenciais (Verlet, 1992).

Os fitonematoides pertencem ao Filo Nematoda, tido como o grupo de invertebrados mais abundantes e diversificados do planeta (Cares e Huang, 2000; Oliveira et al., 2018). Dentre as muitas espécies de fitonematoides, destacam-se os pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, os quais são conhecidos popularmente por “nematoides-das-galhas”. Espécies de *Meloidogyne* são consideradas importantes patógenos agrícolas devido a sua ampla distribuição geográfica, polifagia e diferenças biológicas ligadas ao parasitismo entre populações da mesma espécie (Ferraz e Santos, 1985; Carneiro e Almeida, 2001; Oliveira et al., 2018).

Os sintomas do ataque desses fitoparasitos são tumores (galhas), as quais resultam na hiperplasia e hipertrofia dos tecidos radiculares que bloqueiam a absorção de água e nutrientes do solo e constituem-se em drenos metabólicos. Além de murchas, as plantas infestadas tornam-se raquíticas e amareladas, sintomas que se confundem com os de severa deficiência mineral (Camacho et al., 1995; Charchar, 1999; 2001; Oliveira et al., 2018).

Karl, Souza e Mattos (1997) enfatizam que a escassez de informações fitossanitárias é um grande

desafio para o cultivo de plantas medicinais em escala comercial, especialmente no que tange aos nematoides associados às espécies de interesse comercial.

Alguns extratos aquosos de plantas medicinais tais como a lombrigueira (*Spigelia anthelmia* L., Loganiaceae), o agrião-do-brejo (*Eclipta alba* L. ex B.D. Jacks., Asteraceae) e o mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L., Amaranthaceae), apresentaram atividade nematicida acima de 70% sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (Martins e Santos, 2016). No entanto, em estudo realizado por Gardiano (2006) em que foram testados extratos de plantas como arruda (*Ruta graveolens* L., Rutaceae), nim (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae) e boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews, Lamiaceae), não foi verificado efeito no controle de *M. javanica*.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hospedabilidade e resistência de cinco espécies de plantas medicinais a *M. javanica*, no município de Taquaritinga, SP, em condições semi-campo (casa de vegetação).

## Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação localizada no campo experimental do Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior (ITES) (21°25'0,1"S; 48°30'0,7"O), no período de maio a julho de 2012.

Mudas de boldo, menta (*Menta spicata* L., Lamiaceae), penicilina (*Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, Amaranthaceae), hortelã-pimenta (*Menta piperita* L., Lamiaceae) e citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, Poaceae) foram retiradas da coleção do Banco de Germoplasma do ITES e propagadas em abril de 2012. As mudas de cada uma das espécies foram transplantadas para vasos de 5 L de capacidade contendo uma mistura esterilizada de substrato orgânico e areia na proporção de 2:1.

A população inicial de *M. javanica* foi obtida do Laboratório de Nematologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP) e multiplicada em raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) cultivar Santa Clara, cujas plantas foram mantidas em vasos no campo experimental do ITES. O inóculo foi preparado pela

técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). A contagem de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) foi realizada em câmara de contagem de Peters, com o auxílio de microscópio fotônico.

Realizou-se a inoculação nas mudas com suspensão contendo 640 ovos + juvenis de segundo estágio (J2) por planta, 20 dias após o transplante. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições, constituídas por um vaso cada, sendo o tomateiro cv. Santa Clara a testemunha positiva (com comprovada suscetibilidade a *M. javanica*). As plantas foram mantidas em bancada suspensa (Figura 1), realizando-se irrigações diárias e, decorridos 90 dias após a inoculação, foram realizadas as avaliações.

Para as avaliações, as raízes foram coletadas e levadas ao laboratório, onde procedeu-se a lavagem e processamento das mesmas visando à extração dos nematoides, seguindo a metodologia de Boneti e Ferraz (1981). A contagem do número de galhas foi efetuada sob microscópio fotônico, com utilização da câmara de contagem de Peters (Southey, 1986). Em seguida, foi calculado o Fator de Reprodução ( $FR = n^{\circ}$  de ovos e J2 final/  $n^{\circ}$  de ovos e J2 inicial), sendo plantas com  $FR < 1$  consideradas resistentes (não são hospedeiras favoráveis), enquanto as que exibem  $FR > 1$  são consideradas suscetíveis (hospedeiras favoráveis) (Oostenbrink, 1966).



Figura 1. Plantas medicinais plantadas em vasos de 5 L, dispostas em bancada no interior de casa de vegetação localizada no Instituto Taquaritinguense de Ensino Superior (ITES), Taquaritinga, SP.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ( $p \leq 0,01$ ) e as médias foram transformadas em raiz quadrada de  $X + 100$  e testadas pelo teste de Duncan a 1% e 5% de probabilidade, com utilização do software Assistat 7.7 (Silva & Azevedo, 2016).

## Resultados e Discussão

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, nota-se que, com exceção do tomateiro (testemunha), as cinco plantas medicinais estudadas foram resistentes a *M. javanica*, apresentando  $FR < 1$ . Observa-se ainda na Tabela 1 que a citronela, a menta, a penicilina e a hortelã-pimenta apresentaram alguns nematoides vivos nas raízes, mas em número muito baixo. Costa Manso, Mattos e Tenente (1985) avaliaram a suscetibilidade de vinte e três plantas medicinais a *M. javanica* sob condições de casa-de-vegetação. A avaliação foi feita com base na escala de Índice de Infestação proposta por Taylor & Sasser (1978). Neste estudo, os autores consideraram que três dessas plantas, entre elas a camomila (*Matricaria chamomilla* L., Asteraceae), foram altamente suscetíveis, enquanto seis foram imunes ao nematoide e, as demais resistentes. Observou-se então, que a maioria das plantas medicinais estudadas foram resistentes a *M. javanica*.

Estudando a reprodução de *M. javanica* em plantas de ocorrência espontânea, algumas com propriedades medicinais, Asmus e Andrade (1997) constataram que essa espécie de nematoide se reproduziu bem em plantas de picão-preto (*Bidens pilosa* L., Asteraceae) e maria-pretinha (*Solanum americanum* Mill., Solanaceae), enquanto guanxuma (*Sida rhombifolia* L., Malvaceae) se mostrou resistente, com fator de reprodução inferior a 1,0.

As plantas de citronela produzem o princípio ativo conhecido por citronelol, o qual é utilizado como aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana local e possuir propriedade acaricida (Mattos et al., 2000). Em hortelã-pimenta, são encontrados os componentes citronelol, eugenol, geraniol e linalol, todos com propriedades nematicidas (Oka et al., 2000). Estes autores também observaram alta taxa de mortalidade de J2 de *M. javanica* sob exposição aos óleos essenciais de orégano, tomilho e hortelã-pimenta.

Tabela 1 - Espécies de plantas medicinais inoculadas com *Meloidogyne javanica* para avaliação da hospedabilidade e resistência

Tratamentos	População de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas medicinais			
	População Inicial (Ovos + J2)	População Final	Fator de Reprodução	Reação
Citronela	640	24,00 b	0,03 b	R
Penicilina	640	72,00 b	0,11 b	R
Boldo	640	0,00 b	0,00 b	R
Hortelã-pimenta	640	8,00 b	0,01 b	R
Menta	640	24,00 b	0,03 b	R
Tomateiro cv. Santa Clara (testemunha)	640	8.768,00 a	13,54 a	S
Teste F (tratamentos)	-	21,07**	21,07**	-
CV (%)	-	109,74	2,62	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (5%). \*Significativo a 5% de probabilidade; \*\*significativo a 1% de probabilidade. R = Resistente; S = Suscetível.

Não houve multiplicação de *M. javanica* no boldo e a hortelã-pimenta e mente apresentaram FR de 0,01 e 0,03, respectivamente (Tabela 1). Essas três plantas medicinais demonstram que possuem algum tipo de resistência (química e/ou física) ao nematoide. Deschamps et al. (2006) encontraram *Meloidogyne* spp. em 66% das amostras de solo avaliadas em áreas de cultivo de menta, sendo *Meloidogyne hapla* (Treub) Chitwood, encontrado parasitando tanto plantas de menta quanto de hortelã-pimenta, enquanto *M. javanica* e *M. incognita* estavam associadas em população mista na rizosfera de hortelã-pimenta. No estado do Paraná, *M. javanica* e *M. incognita* já haviam sido encontradas parasitando estas duas espécies de plantas medicinais (Costa Manso et al., 1994). Em estudos anteriores, espécies de menta já foram consideradas resistentes a *M. incognita* (Baida, 2011; Martins, 2018), *M. incognita* raças 2 e 3 (Walker, 1995; Moreira et al., 2017), *M. javanica* (Stroze, 2013; Martins, 2018) e *Meloidogyne enterolobii* Yang. & Eisenback (Martins, 2018), indicando que espécies desse gênero produzem compostos secundários com ação nematicida.

Além de espécies de *Meloidogyne*, Deschamps et al. (2006) encontraram *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filipjev & Schuurmans Stekhoven parasitando as plantas de *Mentha arvensis* L. e *M. piperita* com população superior a 1.500 espécimes por 10 gramas de raízes. Segundo esses autores, este foi o primeiro relato deste nematoide ocorrendo nestas plantas.

A penicilina reagiu como resistente a *M. javanica* com FR = 0,11. Entretanto, há registro de *P. brachyurus* parasitando plantas de penicilina no estado de São Paulo (Zem & Lordello, 1976). Isto demonstra a necessidade de testes de patogenicidade por outras espécies de fitonematoides em plantas medicinais, visto que as respostas são diferentes conforme o nematoide em análise.

No presente estudo, as plantas de boldo foram imunes a *M. javanica* com FR = 0. Entretanto, algumas literaturas apontam o boldo como suscetível a *M. incognita* raça 2, *M.*

*javanica* e *M. paranaensis* (Maciel e Ferraz, 1996; Mônaco et al., 2011), enquanto Martins (2018) classificou o boldo como resistente a *M. javanica* e *M. incognita*. Globbo-Neto e Lopes (2007) mencionam que a sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade de água, pressão atmosférica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes no solo, além da idade e fase de desenvolvimento da planta são fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários pelas plantas medicinais.

Muitos trabalhos publicados sobre a reprodução de *Meloidogyne* spp. em plantas medicinais apresentam resultados contrastantes, mesmo quando se trata da mesma espécie botânica avaliada. Como hipóteses para explicar esse fato, podemos citar diferenças nas metodologias utilizadas nos estudos, especialmente no que tange à densidade de inóculo utilizada, no intervalo entre inoculação e avaliação, nas condições de cultivo, na origem das plantas medicinais utilizadas e nas populações dos nematoides (Anjos, 2019).

Segundo Martins (2018), estudos de hospedabilidade a nematoides visam selecionar espécies que podem ser utilizadas como fonte de genes de resistência para melhoramento genético e como alternativa de cultivo em sistemas de rotação de culturas, objetivando a redução das populações em campo.

As plantas medicinais estudadas demonstraram não serem boas hospedeiras para a reprodução de *M. javanica* em condições de semi-campo. No entanto, novos estudos são recomendados a fim de confirmar

a resistência dessas espécies de plantas medicinais a *M. javanica* e a outras espécies de fitonematóides, em condições de campo.

### Conclusões

As espécies de plantas medicinais testadas, boldo (*Plectranthus barbatus* Andrews, Lamiaceae), menta (*Mentha spicata* L., Lamiaceae), penicilina (*Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, Amaranthaceae), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) e citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, Poaceae) foram resistentes a *M. javanica* em condições de casa de vegetação.

### Agradecimentos

À Ma. Luciana Maira de Sales Pereira (Instituto Federal do Acre - IFAC, Rio Branco, AC) pela revisão do *Abstract* e do corpo do texto.

### Literatura Citada

- ANJOS, R. L. dos. 2019. Reação de espécies vegetais de uso medicinal aos nematoides *Meloidogyne enterolobii* e *Meloidogyne paranaensis*. Dissertação Mestrado. Brasília, DF, UnB. 46p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. 2021. Formulário de fitoterápicos: farmacopeia brasileira. 2ª ed. Brasília, DF, Anvisa. 223p.
- ASMUS, G. L.; ANDRADE, P. J. M. 1997. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em algumas plantas daninhas de ocorrência frequente na região oeste do Brasil. Dourados, MS, Embrapa Agropecuária Oeste. (Comunicado Técnico, 19). 3p.
- BAIDA, F. C. et al. 2011. Medicinal plants' hosting ability for nematode *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. *Nematropica* 41:150-153.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:553.
- CAMACHO, R. et al. 1995. Avaliação do estado nutricional do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em solução nutritiva, com variação no fornecimento de N, P e K. *Scientia Agricola (Brasil)* 52(3):422-425.
- CARES, J. C.; HUANG, S. P. 2000. Taxonomia atual de fitonematóides: chave sistemática simplificada para gêneros – Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas (Brasil) 8:185-223.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira (Brasil)* 25(1):35-44.
- CHARCHAR, J. M. 2001. Métodos simplificados em Nematologia. Brasília, DF, Embrapa Hortaliças (Circular Técnica, 23). 12p.
- CHARCHAR, J. M. 1999. Nematóides em hortaliças. Brasília, DF, Embrapa Hortaliças (Circular Técnica, 18). 12p.
- COSTA MANSO, E. S. B. G. et al. 1994. Catálogo de nematoides fitoparasitos encontrados associados a diferentes tipos de plantas no Brasil. Brasília, DF, Embrapa. 488p.
- COSTA MANSO, E. S. B. G.; MATTOS, J. K. A.; TENENTE, R. C. V. 1985. Suscetibilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira (Brasil)* 9:25-26.
- DESCHAMPS, C. et al. 2006. Nematoides associados a cultura da menta no estado do Paraná. *Nematologia Brasileira* 30(3):303-306.
- FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. 1985. Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos. Revisão Anual de Patologia de Plantas (Brasil) 8:283-314.
- GARDIANO, C. G. 2006. A atividade nematicida de extratos aquosos e tinturas vegetais sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Dissertação Mestrado. Viçosa, UFV. 79p.
- GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova (Brasil)* 30(2):374-381.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.



- KARL, A. C.; SOUZA, R. M.; MATTOS, J. K. A. 1997. Patogenicidade de *Meloidogyne javanica* em quatro espécies de plantas medicinais. Horticultura Brasileira 15(2):118-121.
- LIMA, C. A. B. et al. 2016. O uso das plantas medicinais e o papel da fé no cuidado familiar. Revista Gaúcha de Enfermagem (Brasil) 37:e68285.
- MACIEL, S. L.; FERRAZ, L. C. C. B. 1996. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. Scientia Agricola (Brasil) 53(2-3):232-236.
- MARTINS, C. S. R. 2018. Hospedabilidade de plantas medicinais aos nematoides das galhas. Dissertação Mestrado. Recife, PE, UFRPE. 104p.
- MARTINS, M. da C. B.; SANTOS, C. D. G. 2016. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. Revista Ciência Agronômica (Brasil) 47(1):135-142.
- MATTOS S. H. et al. 2000. Estudos sobre a época de corte e espaçamento de alecrim-pimenta. Horticultura Brasileira 18:996-997.
- MÔNACO, A. P. D. A. et al. 2011. Hospedabilidade de plantas medicinais a *Meloidogyne paranaensis*. Nematologia Brasileira 35:46-49.
- MOREIRA, F. J. C. et al. 2017. Hospedabilidade de plantas ornamentais e medicinais ao nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável (Brasil) 12:701-711.
- NASCIMENTO, A.; PRADE, A. C. K. 2020. Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais. (Especial cuidado integral na Covid-19, nº 2, Aromaterapia). Recife, PE, Fiocruz. 33p.
- OLIVEIRA, C. M. G. et al. 2018. Nematoides. In: Brandão Filho, J. U. T.; Freitas, P. S. L.; Berian, L. O. S.; Goto, R. (Orgs.). Hortaliças-fruto [online]. Maringá, PR, EDUEM. pp.315-338.
- OOSTENBRINK, R. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Landbouwhogeschool Wageningen, 66 – Part IV. Wageningen, H. Veenman & Zonen. 48p.
- OKA, Y.; NACAR, S. et al. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. Phytopathology 90:710-715.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. 2016. The Assisat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. African Journal of Agricultural Research 11(39):3733-3740.
- SOUTHEY, J. F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 6<sup>th</sup> ed. California, H. M. Stationery Office. 202p.
- STROZE, C. T. 2013. Resistência de plantas medicinais a *Meloidogyne javanica* e *M. paranaensis*. Dissertação Mestrado. Londrina, PR, UEL. 62p.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Raleigh: North Carolina State University Graphics. 111p.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. 2005. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova (Brasil) 28(3):519-528.
- VERLET, N. 1992. The world herbs and essential oils economy - analysis of the medium-term development. Acta Horticulturae 306:474-481.
- WALKER, J. T. 1995. Garden herbs as hosts for southern root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, race 3]. HortScience, 30:292-293.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 1998. Programme on Traditional Medicine. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, WHO. 45p.
- ZEM, A. C.; LORDELLO, L. G. E. 1976. Nematóides associados a plantas invasoras. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiros (Brasil) 33:597-315.

## INFESTAÇÃO DE *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (HEMIPTERA: TINGIDAE) EM OITO CLONES DE SERINGUEIRA EM ITIQUIRA, MT

*Rodrigo Souza Santos\** e *Romeu de Carvalho Andrade Neto*

Embrapa Acre, Rodovia BR 364 km 14, CP 321, 69900-970, Rio Branco, AC. \*rodrigo.s.santos@embrapa.br

Dentre os insetos-praga associados à seringueira no Brasil, o tingídeo *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) se destaca como uma das mais importantes, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. Adultos e ninfas sugam a seiva nas folhas das plantas infestadas e, dependendo do nível populacional da praga, podem ocasionar perdas de até 30% na produção de látex. Este estudo objetivou verificar a infestação de ninfas e adultos de *L. heveae*, em oito clones de seringueiras (GT1, PB 235, PB 217, RRIM 600, RRIM 527, PR 228, PR 255 e IAN 873), no município de Itiquira, MT. No período de julho de 2003 a dezembro de 2005, semanalmente eram vistoriadas três folhas maduras, no terço inferior da copa de quatro árvores por clone, contabilizando o número de ninfas e adultos nas mesmas. Pelos resultados obtidos neste estudo conclui-se que: 1. Há diferenças no ataque de ninfas e adultos de *L. heveae* nos diferentes clones e entre os anos; 2. Os clones e PR 228 e PB 235 são os mais suscetíveis ao ataque de *L. heveae* nas condições edafoclimáticas da região, quando comparados aos demais; 3. O nível populacional de ninfas e adultos de *L. heveae* atinge seus picos entre os meses de setembro a outubro.

**Palavras-chave:** *Hevea brasiliensis*, Heteroptera, heveicultura, percevejo-de-renda.

**Infestation of *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) in eight rubber tree clones in Itiquira, Mato Grosso state, Brazil.** Among the insect-pests associated with rubber trees in Brazil, the tingid *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae) stands out as one of the most important, especially in the Center-West and Southeast regions of Brazil. Adults and nymphs suck the sap from the leaves of infested plants and, depending on the pest population level, can cause losses of up to 30% in latex production. This study aimed to verify the infestation of nymphs and adults of *L. heveae*, in eight rubber trees clones (GT1, PB 235, PB 217, RRIM 600, RRIM 527, PR 228, PR 255, and IAN 873), in the municipality of Itiquira, Mato Grosso state, Brazil. From July 2003 to December 2005, three mature leaves were inspected weekly, in the lower third of the canopy of four trees per clone, counting the number of nymphs and adults in them. From the results obtained in this study, it can be concluded that: 1. There are differences in the attack of nymphs and adults of *L. heveae* in different clones and between years; 2. The clones PR 228 and PB 235 are the most susceptible to the attack of *L. heveae* in the edaphoclimatic conditions of the region, when compared to the others; 3. The population level of nymphs and adults of *L. heveae* reaches its peak between the months of September to October.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, Heteroptera, heveiculture, rubber tree lacebug.

## Introdução

O gênero *Heveae* pertence à família Euphorbiaceae que abriga outros gêneros importantes de culturas tropicais, tais como *Manihot* (mandioca) e *Ricinus* (mamona). A classificação atual desse gênero abriga 11 espécies, dentre as quais se destaca *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Dr. de Juss.) Müell. Arg., a qual possui a maior capacidade reprodutiva, maior variabilidade genética e maior produção de látex (Costa, 2001; Gonçalves et al., 2002; Francisco, Bueno e Baptistella, 2004; Tropicos..., 2015).

A seringueira é uma árvore nativa da bacia hidrográfica amazônica, também ocorrendo na Bolívia, Brasil e Peru. No Brasil, a área de ocorrência natural dessa espécie encontra-se nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Mato Grosso, Pará e Rondônia (Gonçalves et al., 2013). De acordo com dados do IBGE (2020), os maiores produtores nacionais de borracha natural são, nessa ordem: São Paulo, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Mato Grosso do Sul.

Socioeconomicamente os seringais são importantes, pois permitem a geração de renda para os produtores, indústrias de beneficiamento, pneumáticos e artefatos, mercado de insumos e máquinas, além de ocuparem mão-de-obra no setor primário, desde a fase de coleta de sementes até a etapa de exploração e transporte da borracha natural para a usina (Gonçalves et al., 2013).

O plantio de culturas em monocultivos simplifica a biodiversidade e favorece a adaptação e manutenção de insetos herbívoros e fitófagos na área (Altieri & Nicholls, 2004). Segundo Gonçalves et al. (2013), as seringueiras cultivadas no Brasil são prevalentemente compostas por clones, os quais são geneticamente idênticos à planta matriz, favorecendo o estabelecimento e manutenção de insetos-praga. Estes, em altos níveis populacionais, podem interferir no nível de enfolhamento das plantas e, conseqüentemente, na produção de látex. Assim, com o aumento da área plantada e a adoção da monocultura em áreas extensivas, a incidência de pragas tornou-se comum. Dentre os insetos-praga associados à cultura da seringueira no Brasil, destaca-se o percevejo-de-renda, *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae), cujas ninfas e adultos sugam a seiva das folhas, diminuindo sua capacidade fotossintética e reduzindo a produção de látex em até 30% (Tanzini e Lara, 1998).

Estudos referentes ao percevejo-de-renda em seringais de cultivo na região de Itiquira, MT, têm sido realizados se baseando no estágio de ovo da praga (Santos e Freitas, 2008; Santos e Silva, 2013; Santos, 2014a). Assim, pesquisas sobre infestações de ninfas e adultos de *L. heveae* entre clones de seringueira são escassos no Brasil e podem indicar graus de resistência dos clones ao ataque dessa praga, cujos resultados podem ser úteis em programas de melhoramento genético da seringueira no país.

Painter (1968) define a resistência de plantas a insetos como a soma relativa de qualidades hereditárias possuídas pela planta a qual influencia no grau de dano que determinada espécie de inseto causa, sendo uma condição genética. Assim, para a recomendação de um material genético (clone), devem ser considerados vários aspectos, tendo como principais o crescimento, produção de látex, borracha de alta qualidade, resistência da madeira, resistência à quebra pelo vento, produção de sementes e resistência genética a doenças e pragas (Paz et al., 1982; Gonçalves et al., 2013).

Nesse contexto, esse estudo visou verificar o nível de infestação de ninfas e adultos de *L. heveae* entre oito clones de seringueiras, no município de Itiquira, MT.

## Material e Métodos

O estudo foi conduzido entre julho de 2003 a dezembro de 2005 na fazenda da empresa Plantações Edouard Michelin Ltda., localizada no município de Itiquira, MT (17°22'23"S, 54°44'23"O), em talhão de seringueira denominado Campo de Clones em Grande Escala (CCGE), cultivado em sistema policlonal.

Para o estudo da infestação de *L. heveae* foram escolhidas aleatoriamente quatro plantas adultas por clone de GT1, PB 235, PB 217, RRIM 600, RRIM 527, PR 228, PR 255 e IAN 873. Foram realizadas 136 amostragens durante o período de julho de 2003 a dezembro de 2005, correspondente a três anos agrícolas (do enfolhamento até a senescência natural das árvores). Todas as árvores foram cultivadas em regime tradicional de monocultivo, com espaçamento de 2,5 m entre árvores e 8 m entre linhas, altura aproximada de 12 m e idade entre 11 e 12 anos. As árvores receberam pulverizações esporádicas com produtos fitossanitários (Monocrotophós, Metamidophós, Monocrotophós + *Sporothrix*

*insectorum* ou Methomyl + *Paecilomyces* sp.) visando ao controle de *L. heveae*. Quando necessário, as aplicações foram realizadas no foco da infestação quando o inseto atingiu o nível de controle definido pela empresa e não em todo o talhão. Não foram realizadas coletas em plantas recém pulverizadas.

Semanalmente, foram vistoriadas em campo três folhas maduras e completamente expandidas (estádio D) (Miguel et al., 2011) em quatro árvores/clone, escolhidas de forma aleatória (12 folhas/amostragem = 36 folíolos/amostragem), sendo observadas as faces abaxial e adaxial, à procura de ninfas e adultos de *L. heveae*, cujo número de insetos foi anotado em planilha de campo. Segundo Santos (2020b), *L. heveae* tem preferência por ovipositar em folíolos maduros em detrimento aos de idade intermediária (estádio C) e novos (estádio B).

As folhas estavam posicionadas em galhos localizados no terço inferior da copa das árvores, pois ninfas e adultos de *L. heveae* se distribuem uniformemente nos diferentes estratos (inferior, médio e superior) da planta, não comprometendo a amostragem vertical (Cividanes, Fonseca e Santos, 2004).

O experimento foi instalado em blocos casualizados com três repetições, considerando a distribuição de tratamentos em esquema de parcelas subdivididas no tempo, sendo os clones representativos das parcelas e os anos representativos das subparcelas. Uma vez não satisfeitas às hipóteses da análise de variância, os dados foram submetidos à transformação [Log10 de Y - Log10 (Y + 1)]. Para comparação de médias, procedeu-se à análise de variância aplicando o teste de Scott-Knott para os clones e de Tukey para os anos, ambos a 5% de significância.

**Resultados e Discussão**

Durante o período do estudo foram analisados 39.168 folíolos (todos os clones), sendo contabilizadas 42.641 ninfas (2003 – 15.891; 2004 – 17.099 e 2005 – 9.651 ninfas) e 29.709 adultos (2003 – 11.680; 2004 – 11.212 e 2005 – 6.817 adultos) de *L. heveae*, uma média de aproximadamente 1,1 ninfa e 0,7 adulto por folíolo. O clone que

apresentou o maior número de ninfas foi o PB 235 (8.259 ninfas) e o que apresentou o menor número foi o GT 1 (4.131 ninfas). Com relação ao número de adultos, o clone que apresentou maior quantidade foi o PR 255 (4.687 adultos), enquanto o RRIM 600 (2.986 adultos) apresentou o menor número de adultos.

O número médio da relação de adultos/ninfas permaneceu praticamente constante entre os anos de 2003 a 2005, somente com exceção dos clones PR 228 e PB 235 que apresentaram maiores médias no ano de 2005 em detrimento dos demais clones. Somente para PR 228 e PB 235 não houve diferença estatística no número médio de adultos/ninfas, para os demais clones houve diminuição dessa relação no ano de 2005 (Tabela 1).

Características físicas presentes nos diferentes clones podem influenciar (positiva ou negativamente), na alimentação e oviposição de *L. heveae*, o que explicaria a diferença de infestação entre eles. Apesar de não ter sido um parâmetro mensurado, por observação visual e tátil é perceptível que há diferenças na espessura das folhas entre os clones estudados, embora haja necessidade da realização de análises (e.g. microscopia eletrônica de varredura) para realizar tais mensurações. Algumas plantas modificam características estruturais como tricomas, espinhos, espessura da parede celular, deposição de sílica, formação de cristais inorgânicos entre outros, na tentativa de impedir a ação de insetos fitófagos e herbívoros (Lucas et al., 2000). Estruturas aéreas da

Tabela 1. Relação média de adultos/ninfas de *Leptopharsa heveae* em oito clones de seringueiras entre os anos de 2003 a 2005, em Itiquira, MT

Clones	2003	σ	2004	σ	2005	σ
RRIM 600	2,7 a AB	± 0,8	3,1 a A	± 0,6	1,4 b B	± 0,4
IAN 873	3,7 a A	± 1,1	3,3 a A	± 0,5	1,2 b B	± 0,6
PB 217	3,3 a A	± 2,0	3,1 a A	± 0,9	1,4 b B	± 0,5
RRIM 527	3,2 a A	± 0,2	3,8 a A	± 0,4	1,7 b B	± 0,4
GT 1	2,9 a AB	± 0,6	3,4 a A	± 0,9	1,8 b B	± 0,5
PR 228	4,3 a A	± 0,5	3,2 a A	± 0,4	3,6 a A	± 0,6
PB 235	4,5 a A	± 0,9	4,2 a A	± 0,4	4,3 a A	± 1,8
PR 255	3,5 a A	± 0,5	4,5 a A	± 1,1	1,3 b B	± 0,2
CV(%) parcela	25,1					
CV(%) subparcela	28,4					

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna para clones e maiúscula na linha para anos, não diferem estatisticamente pelos testes de Scott Knott e de Tukey a 5% de probabilidade, respectivamente. σ = desvio padrão das médias.



planta, principalmente as folhas, podem ter as paredes de suas células epidérmicas cobertas por diversas substâncias, como cutina, cera, lignina e mucilagem (Esau, 1974; Cutter, 2002; Silva, Alquini e Cavallet, 2005; Alquini et al., 2022), as quais dificultam a alimentação dos insetos.

A fitoquímica da planta também exerce influência sobre insetos que se alimentam dos tecidos ou os sugares de seiva. Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas em razão de um estresse biótico ou abiótico, os compostos fenólicos agem como uma defesa natural das plantas contra herbívoros e patógenos, tendo sido encontrada correlação entre a concentração dessas substâncias e a resistência da planta (Levin, 1973; Santos, 2014b; Santos, 2020a). Segundo Santos (2014b), pequenas variações na concentração de fenóis totais são suficientes para o aumento ou diminuição da defesa química de clones de seringueira contra o ataque de *L. heveae*.

Em estudo prévio na mesma área, com os mesmos clones, Santos e Silva (2014) verificaram que, para o ano de 2003, o pico populacional de ninfas ocorreu no mês de setembro para todos os clones. No ano de 2004, o pico populacional de ninfas ocorreu no mês de setembro para os clones PB 217, RRIM 527, RRIM 600 e PR 228 e no mês de outubro para os clones GT 1, PB 235, PR 255 e IAN 873. No ano de 2005, o pico populacional de ninfas ocorreu no mês de agosto para os clones PB 235, PB 217 e PR 228, no mês de setembro para os clones RRIM 600, no mês de outubro

para os clones RRIM 527, PR 255 e IAN 873 e no mês de novembro para o clone GT 1. A dinâmica populacional dos insetos está intimamente relacionada com a sazonalidade dos elementos meteorológicos (e.g. temperatura, insolação, umidade relativa e pluviosidade), os quais podem afetar o ciclo biológico dos mesmos (e.g. oviposição, alimentação, crescimento, desenvolvimento e migração) (Hopkins & Memmott, 2003). Indiretamente, variações climáticas podem influenciar na atividade dos inimigos naturais e alterar a qualidade dos recursos alimentares para o inseto, por alterações fisiológicas

e bioquímicas de sua planta hospedeira (Hopkins & Memmott, 2003).

Em 2003, os clones IAN 873, PR 228 e PB 235 apresentaram os maiores números médios de ninfas; em 2004 não houve diferença estatística entre os clones e, em 2005, os clones PR 228 e PB 235 foram os que apresentaram as maiores médias de ninfas. Para os clones RRIM 600, IAN 873, PB 217, RRIM 527 e PR 255, houve diminuição do número médio de ninfas no ano de 2005 (Tabela 2).

No que tange aos adultos, para o ano de 2003 o pico populacional ocorreu em outubro para os clones PB 235, PB 217, RRIM 527, RRIM 600, PR 228, PR 255 e IAN 873 e em novembro para o GTI. No ano de 2004, o pico populacional de adultos ocorreu em outubro para todos os clones. No ano de 2005, o pico populacional de adultos ocorreu em julho para os clones GT1, PB 217, RRIM 527, PR 255 e IAN 873; em setembro para o clone PB 235 e, em outubro para os clones RRIM 600 e PR 228.

Em 2003, os clones PR 228, PB 235 e PR 255 apresentaram o maior número médio de adultos; em 2004 foram os clones PR 255 e GT1 e, em 2005, PR 228 e PB 235. Com exceção do clone PR 228, houve diferença significativa do número médio de adultos para os clones em detrimento dos anos, com uma diminuição no ano de 2005 (Tabela 3).

Segundo Santos e Freitas (2008), no ano de 2005 o pico médio mensal de ovos de *L. heveae* por folíolo para os clones RRIM 600, PR 255, PB 235 e PB 217

Tabela 2. Número médio de ninfas de *Leptopharsa heveae* em oito clones de seringueiras entre os anos de 2003 a 2005, em Itiquira, MT

Clones	2003	$\sigma$	2004	$\sigma$	2005	$\sigma$
RRIM 600	2,5 b A	± 0,2	2,66 a A	± 0,1	2,2 b B	± 0,2
IAN 873	2,7 a A	± 0,2	2,70 a A	± 0,1	2,0 c B	± 0,2
PB 217	2,6 b A	± 0,3	2,62 a A	± 0,1	2,3 b B	± 0,3
RRIM 527	2,6 b A	± 0,1	2,76 a A	± 0,1	2,3 b B	± 0,2
GT 1	2,8 b A	± 0,1	2,60 a A	± 0,2	2,3 b A	± 0,2
PR 228	2,8 a A	± 0,1	2,63 a A	± 0,0	2,7 a A	± 0,1
PB 235	2,8 a A	± 0,1	2,81 a A	± 0,0	2,8 a A	± 0,2
PR 255	2,5 b A	± 0,2	2,77 a A	± 0,1	2,1 c B	± 0,1
CV(%) parcela			5,1			
CV(%) subparcela			6,7			

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna para clones e maiúscula na linha para anos, não diferem estatisticamente pelos testes de Scott Knott e de Tukey a 5% de probabilidade, respectivamente.  $\sigma$  = desvio padrão das médias.

Tabela 3. Número médio de adultos de *Leptopharsa heveae* em oito clones de seringueiras entre os anos de 2003 a 2005, em Itiquira, MT

Clones	2003	$\sigma$	2004	$\sigma$	2005	$\sigma$
RRIM 600	311,0 b A	± 85,4	259,2 b A	± 50,5	140,5 b B	± 11,8
IAN 873	301,2 b A	± 63,7	270,2 b AB	± 51,9	161,0 b B	± 88,5
PB 217	297,2 b A	± 64,9	304,2 b A	± 109,8	146,7 b B	± 27,7
RRIM 527	356,0 b A	± 42,1	315,7 b A	± 23,9	163,0 b B	± 28,2
GT 1	337,7 b A	± 72,9	369,5 a A	± 65,7	194,7 b B	± 26,9
PR 228	389,0 a A	± 45,7	320,7 b A	± 70,6	315,2 a A	± 22,8
PB 235	440,7 a A	± 53,7	333,5 b AB	± 67,6	280,7 a B	± 61,9
PR 255	486,7 a A	± 44,1	455,7 a A	± 155,9	191,0 b B	± 48,5
CV(%) parcela	20,1					
CV(%) subparcela	22,4					

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna para clones e maiúscula na linha para anos, não diferem estatisticamente pelos testes de Scott Knott e de Tukey a 5% de probabilidade, respectivamente.  $\sigma$  = desvio padrão das médias.

se deu no mês de novembro em plantio policlonal de seringueira, em Itiquira, MT. Dessa forma, conforme a conclusão da pesquisa realizada por Santos (2015), o controle de *L. heveae* deve ser realizado entre os meses de agosto e setembro, antecipando o pico populacional de ninfas e adultos na região de Itiquira, MT.

Além das condições meteorológicas, diferenças no tempo de senescência e enfolhamento dos clones e a frequência de aplicação de produtos fitossanitários no talhão são fatores que podem contribuir na dinâmica populacional de ninfas e adultos de *L. heveae* entre os diferentes clones estudados e entre os anos. Ademais, a atuação de inimigos naturais, especialmente o parasitoide de ovos *Erythmelus tingitiphagus* (Soares) (Hymenoptera: Mymaridae), cuja taxa de parasitismo pode atingir até 20,6% em condições naturais (Santos e Freitas, 2008) também pode influenciar na infestação de *L. heveae* entre clones. O ano agrícola de 2003 foi o que apresentou o maior número médio de ninfas/mês (2.648) e o ano de 2005 foi o que apresentou o menor número médio (804). A mesma relação foi verificada para os adultos, com maior média para 2003 (1.946 adultos/mês) e a menor em 2005 (568 adultos/mês).

O clone RRIM 600 é um dos clones mais cultivados em seringueiras comerciais no Sudeste e Centro-Oeste do país e, neste estudo foi verificado que, embora não tenha apresentado as menores médias de ninfas entre os clones estudados, apresentou uma das menores médias de adultos de *L. heveae* durante os três anos agrícolas. Ademais, Santos e Freitas (2008) verificaram que, em comparação aos clones PR 255, PB 235, PB

217 e GT1, o RRIM 600 apresentou a maior taxa de ocorrência (24,3%) e de parasitismo (20,6%) por *E. tingitiphagus*.

Os programas de melhoramento genético da seringueira no Brasil têm avaliado novos clones de seringueira, com ênfase em vigor, produção, crescimento do caule durante a sangria, espessura e regeneração da casca, tolerância à queda pelo vento, à seca do painel e resistência às principais doenças das regiões produtoras (Gonçalves e Marques, 2014). No entanto, a avaliação de resistência a insetos e ácaros ainda é um dos

parâmetros que deve ser incorporado nesses programas de melhoramento (Silva et al., 2011).

São recomendados estudos que analisem as características químicas e físicas das folhas dos clones de seringueira (e.g. anatomia foliar, espessura das folhas, deposição de substâncias na superfície cuticular, caracterização dos compostos fenólicos, concentração de ácido jasmônico, etc), a fim da tipificação fisiológica dos clones mais cultivados. Essas informações serão úteis em programas de melhoramento genético da seringueira, especialmente no que tange aos graus de resistência ao ataque de *L. heveae*.

## Conclusões

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões: 1. Há diferenças no ataque de ninfas e adultos de *L. heveae* nos diferentes clones e entre os anos; 2. Os clones e PR 228 e PB 235 são os mais suscetíveis ao ataque de *L. heveae* nas condições edafoclimáticas da região, quando comparados aos demais; 3. O nível populacional de ninfas e adultos de *L. heveae* atinge seus picos entre os meses de setembro a outubro.

## Literatura Citada

- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. 2004. Biodiversity and pest management in agroecosystems. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Food Products Press. 236p.
- ALQUINI, Y. et al. 2022. In: Appezato da Gloria, B.; Carmello-Guerreiro, S. M. (eds.). Anatomia vegetal. 4<sup>a</sup> ed. Viçosa, MG, UFV. 422p.

- CIVIDANES, F. J.; FONSECA F. S.; SANTOS, T. M. 2004. Distribuição de *Leptopharsa heveae* em seringal do Estado de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(10):1053-1056.
- COSTA, R. B. 2001. Melhoramento e conservação genética aplicados ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea* sp.). *Revista Internacional do Desenvolvimento Local (Brasil)* 1(2):51-58.
- CUTTER, E. G. 2002. Anatomia Vegetal. Parte I: células e tecidos. 2ª ed. São Paulo, Roca. 320p.
- ESAU, K. 1974. Anatomia de plantas com sementes. São Paulo, Edgard Blücher. 312p.
- FRANCISCO, V. L. F. S.; BUENO, C. R. F.; BAPTISTELLA, C. S. L. 2004. A cultura da seringueira no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas (Brasil)* 34(9):31-42.
- GONÇALVES, R. C.; SÁ, C. P. de; DUARTE, A. A. F.; BAYMA, M. M. A. 2013. Manual de Heveicultura para a região Sudeste do Estado do Acre. Rio Branco, AC, Embrapa Acre. (Documentos, 128). 152p.
- GONÇALVES, P. S. et al. 2002. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do planalto de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37(2):131-138.
- GONÇALVES, P. S.; MARQUES, J. R. B. 2014. Clones de seringueira: influência dos fatores ambientais na produção e recomendação para o plantio. In: Alvarenga, A. P.; Carmo, C. A. F. S. (eds.). *Seringueira*. 2ª ed. Viçosa, MG, EPAMIG. pp.179-247.
- HOPKINS, G. W.; MEMMOTT, J. 2003. Seasonality of a tropical leaf-mining moth: leaf availability versus enemy-free space. *Ecological Entomology* 28(6):687-693.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2020. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Produção agrícola municipal. 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>> Acesso em: 18 ago. 2022.
- LEVIN, D. A. 1973. The role of trichomes in plant defense. *The Quarterly Review of Biology* 48(1):3-15.
- LUCAS, P. W.; TURNER, I. M.; DOMINY, N. J.; YAMASHITA, N. 2000. Mechanical defenses to herbivory. *Annals of Botany* 86(5):913-920.
- MIGUEL, A. A. et al. 2011. Estimativa da área foliar de seringueira usando o método das dimensões. *Revista Agrarian (Brasil)* 4(13):165-171.
- PAINTER, R. H. 1968. *Insect resistance in crop plants*. New York, MacMillan. 520p.
- PAZ, F. C. A. et al. 1982. Comportamento de clones de seringueira em Rio Branco - AC. Rio Branco, AC, Embrapa Acre. *Pesquisa em Andamento*, 24. 3p.
- SANTOS, D. Y. A. C. dos. (Org.). 2020a. *Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários de plantas*. Curitiba, Appris Editora. 401p.
- SANTOS, R. S. 2020b. Influência da idade da folha de *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) na oviposição e parasitismo de ovos de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae). *Agrotropica (Brasil)* 32(2):111-118.
- SANTOS, R. S. 2015. Dinâmica populacional de adultos de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae) em clone de seringueira, em Itiquira, MT. In: Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação - CONNEPI, 10, 2015. Anais... Rio Branco, AC, IFAC/CONIF. 7p.
- SANTOS, R. S. 2014a. Parasitismo de ovos de *Leptopharsa heveae* Drake & Poor por *Erythmelus tingitiphagus* (Soares) em plantios de seringueira com aplicação de produtos fitossanitários. *Revista Ceres (Brasil)* 61(3):350-355.
- SANTOS, R. S. 2014b. Quantificação de fenóis totais em cinco clones de seringueira, *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). In: Reunião Anual da SBPC, 66, 2014. Anais... Rio Branco, AC, SBPC. 2p.
- SANTOS, R. S.; SILVA, J. M. da. 2014. Dinâmica populacional de ninfas de *Leptopharsa heveae* (Hemiptera: Tingidae) em oito clones de seringueira, em Itiquira, MT. In: Reunião Anual da SBPC, 66, 2014. Anais... Rio Branco, AC, SBPC. 2p.
- SANTOS, R. S.; SILVA, J. M. da. 2013. Dinâmica populacional do parasitoide de ovos *Erythmelus tingitiphagus* (Hymenoptera: Mymaridae) em clone de seringueira, em Itiquira, MT. *Revista Árvore (Brasil)* 37(2):237-244.
- SANTOS, R. S.; FREITAS, S. de. 2008. Parasitismo de *Erythmelus tingitiphagus* (Soares) (Hymenoptera: Mymaridae) em ovos de *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemiptera: Tingidae), em plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.). *Neotropical Entomology (Brasil)* 37(5):571-576.
- SILVA, H. A. S. et al. 2011. Clones de seringueira com resistência a ácaros. *Bragantia (Brasil)* 70(2):383-388.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. 2005. Interações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. *Acta Botanica Brasílica (Brasil)* 19(1):183-194.
- TANZINI, M. R.; LARA, F. M. 1998. Biologia do percevejo-de-renda-da-seringueira *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Heteroptera: Tingidae). *Ecosistema (Brasil)* 23:65-67.
- TROPICOS MISSOURI BOTANICAL GARDEN. 2015. Disponível em: <<http://tropicos.org>> Acesso em: 18 ago. 2022.

## DOENÇAS EM CACAUEIRO E CUPUAÇUZEIRO NO ACRE

*Amauri Siviero<sup>1</sup>, Paulo Eduardo Franca de Macedo<sup>1</sup>, Giovanna Teixeira Sandoval Moreira<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Embrapa Acre, Rodovia BR-364 km 14, Caixa Postal 321, 69900-970, Rio Branco, AC. amauri.siviero@embrapa.br; paulo.macedo@embrapa.br. <sup>2</sup>Kansas State University, Department of Plant Pathology, 4024 Throckmorton Center, 1712 Claflin Road, Manhattan, EUA. giomor.gt@gmail.com

Objetivou-se neste trabalho relatar a ocorrência de doenças do cacau e cupuaçuzeiro no Acre. Foram realizadas 36 expedições de campo em 20 municípios entre 2018 e 2021. Amostras de ramos e frutos suspeitos foram analisadas no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre. Foram identificados os fungos: *Moniliophthora perniciosa* (vassoura-de-bruxa), *Phytophthora* spp. (podridão-parda), *Botryodiplodia theobromae* (morte descendente), *Colletotrichum* spp. (antracnose), *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Monalonium annulipes* e *Phomopsis* spp. A vassoura de bruxa, podridão parda e a morte descendente estão amplamente difundidas no Acre. A monilíase causada por *Moniliophthora roreri* foi relatada pela primeira vez no Brasil, no Acre no município de Cruzeiro do Sul.

**Palavras-chave:** *Theobromae cacao*, *Theobroma grandiflorum*, Amazônia, patógenos, *Moniliophthora* spp.

**Cocoa and Cupuassu diseases in State of Acre, Brazil.** The objective of this work was to report the occurrence of cocoa tree and cupuaçu tree diseases in Acre. 36 field expeditions were carried out in 20 municipalities between 2018 and 2021. Samples of suspected branches and fruits were analyzed at the Phytopathology Laboratory of Embrapa Acre. The following fungi were identified: *Moniliophthora perniciosa* (witches' broom), *Phytophthora* spp. (black pod), *Botryodiplodia theobromae* (die back), *Colletotrichum* spp. (anthracnose), *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Monalonium annulipes*, and *Phomopsis* spp. Witches' broom, black pod and die back are widespread in Acre. Moniliasis caused by *Moniliophthora roreri* was reported for the first time in Brazil, in Acre and in the municipality of Cruzeiro do Sul.

**Key words:** *Theobromae cacao*, *Theobroma grandiflorum*, Amazon, phytopathogens, *Moniliophthora* spp.



O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) nativo da Amazônia tem diversos usos econômicos, sendo o mais atrativo deles a produção de chocolate com alto reconhecimento no mercado mundial. O chocolate obtido a partir de amêndoas produzidas de cacauzeiro nativo da Amazônia pode atingir as melhores classificações de qualidade, devido às características do ambiente que o tornam especial no sabor e no aroma sendo um produto com potencial de geração de renda para comunidades tradicionais da Amazônia.

O chocolate obtido a partir do cacauzeiro nativo da Amazônia é um dos produtos florestais não madeireiros mais promissor, pois, existe um mercado em expansão desse produto mundialmente, que aprecia o sabor e aroma do fruto nativo. É cada vez mais crescente a demanda do mercado pela amêndoa de cacau de qualidade e com características diferenciadas de sabor e aroma, que surgem de acordo com as especificidades do local de ocorrência e da forma de beneficiamento. No Acre, observa-se uma maior densidade de cacauzeiros nativos próximos aos cursos d'água, algo que é característico da espécie (Rodrigues et al., 2011).

Além do cacauzeiro, o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) aparece como a segunda mais importante espécie econômica do gênero *Theobroma*. O cupuaçuzeiro também é uma fruteira nativa da Amazônia e a espécie está em processo de domesticação. Atualmente ainda pode ser encontrada em áreas de vegetação primária.

O cupuaçuzeiro predomina nos cultivos de fundo de quintal na Amazônia e em experiências como componente de sistemas agroflorestais emergentes e se expande de acordo com a demanda de mercado. A gordura das sementes do cupuaçu tem recebido atenção por apresentar propriedades comestíveis análogas ao chocolate, além das características hidratantes e emolientes utilizadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentar. Da polpa do fruto são produzidas geleias, licores, compotas, doces, biscoitos e sorvetes.

As áreas de cultivo de cacauzeiro e cupuaçuzeiro no Acre são compostas por pequenos plantios com baixos índices de adoção de tecnologias. A maioria das plantas é encontrada em quintais agroflorestais sendo manejadas por agricultores familiares. Os pomares comerciais apresentam reduzido número de plantas e não recebem as práticas culturais como podas,

adubação, controle fitossanitário e práticas de conservação pós-colheita. Todos estes fatores são pontos que comprometem a produtividade destes dois cultivos no Acre.

Dentre os fatores que podem comprometer o estabelecimento e produtividade dos sistemas de produção de cacau e cupuaçu na Amazônia destaca-se a ocorrência de doenças. A principal doença na Amazônia é a vassoura de bruxa causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. Além da vassoura de bruxa, outras doenças podem afetar estas culturas no Acre.

Uma ameaça ao sucesso dos cultivos do cacauzeiro e cupuaçuzeiro no Acre é o risco da entrada e dispersão da monilíase causada pelo fungo *Moniliophthora roreri* que infecta os frutos. Diante da falta de estudos que relatem as principais doenças desses cultivos, bem como da necessidade de levantamentos da praga quarentenária *Moniliophthora roreri*, este trabalho teve como objetivo reportar a ocorrência das principais doenças nas plantas destes dois cultivos no Acre.

No ano de 2018 foi celebrado um Termo de Execução Descentralizado (TED monilíase) entre a Divisão de Sanidade Vegetal do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Embrapa Acre. Dentre as ações do TED monilíase constava a realização de expedições em municípios do Acre para levantamento das doenças do gênero *Theobroma*.

A partir de maio de 2018 até meados de 2020, no estado do Acre, foram realizadas 36 expedições científicas de campo, através de visitas técnicas em propriedades de agricultores familiares, onde ocorriam o cultivo de plantas de cacauzeiro (*T. cacao*), cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*), cacauí (*Theobroma speciosum*), cupuí (*Theobroma subincanum*) e mocambo (*Theobroma bicolor*).

As coordenadas geográficas das áreas visitadas foram obtidas com auxílio de GPS e os pontos processados e transformados em um mapa utilizando o software QGIS 3.10.0. As visitas nos municípios tiveram apoio das Secretarias Municipais de Agricultura e de técnicos do Instituto de Defesa Agroflorestal do Acre. Foram visitadas áreas em 20 dos 22 municípios do Acre em plantações comerciais, quintais urbanos, quintais agroflorestais e plantas nativas de cacauzeiro, cupuaçuzeiro e espécies silvestres.

Em meados de 2018 foi estabelecida a primeira Unidade de Referência Tecnológica de Monitoramento de Cacau e Cupuaçu (URTMCC) no Acre em uma propriedade situada em Assis Brasil. Esta localidade situa-se a dez quilômetros da divisa do Peru, por isso serviu como unidade sentinela para averiguação da possível entrada da monilíase no Acre, haja vista que no país vizinho esta doença quarentenária foi relatada em 1988 (Hernandes et al., 1990).

Esta região de fronteira internacional é uma divisa onde há trânsito intenso de pessoas entre Brasil e o Peru. A unidade de referência abriga um plantio abandonado com aproximadamente 2500 cacauzeiros instalados em 1982 com clones fornecidos pela unidade de Rondônia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Na divisa entre os estados do Acre e Rondônia foi instalada a segunda URTMCC situada em Acrelândia. Esta unidade localizada numa propriedade rural com três hectares de cacauzeiro em produção com oito anos de idade, constitui mais um ponto de monitoramento das doenças. Em Xapuri, em meados de 2018 foi instalada a terceira URTMCC reforçando o monitoramento na divisa do Acre com a Bolívia. Nesta área ocorre um plantio de 800 plantas de cacauzeiro e cupuaçuzeiro estabelecidas em 1996 em regime de consórcio agroflorestal com seringueira e outras espécies frutíferas.

As inspeções fitossanitárias nas URTMCC ocorreram de três em três meses e durante as expedições de campo e inspeções fitossanitárias foram coletadas folhas, ramos e frutos com sintomas de doenças. O material botânico foi levado para diagnóstico no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre. Amostras de ramos e frutos foram acondicionadas em câmara úmida em temperatura ambiente por até 07 dias para detecção de fungos fitopatogênicos.

Isolamentos indiretos também foram realizados através de cortes de fragmentos de 0,5 cm x 0,5 cm da interface entre tecido sadio e tecido doente. Posteriormente os fragmentos foram imersos em álcool 70% por um minuto e embebidos em solução de hidróxido de sódio a 2% por três minutos e passados em 01 lavagem em água destilada estéril. Em seguida os fragmentos foram secos em papel estéril e colocados em placas de Petri contendo meio BDA com 50 ppm de cloranfenicol.

As placas foram mantidas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. Diariamente observou-se o crescimento de colônias fúngicas. Das estruturas reprodutivas, entre 07 e 14 dias de incubação, foi realizada a montagem de lâminas. Estas foram observadas em microscópio e através da observação das estruturas reprodutivas e com o auxílio de chaves taxonômicas procedeu-se a identificação dos gêneros e/ou espécies fitopatogênicas presentes.

Foram coletadas amostras nos municípios de Acrelândia, Assis Brasil, Brasiléia, Bujari, Capixaba, Cruzeiro do Sul, Epitaciolândia, Feijó, Mâncio Lima, Manoel Urbano, Marechal Thaumaturgo, Plácido de Castro, Porto Acre, Rio Branco, Rodrigues Alves, Santa Rosa do Purus, Sena Madureira, Senador Guiomard, Tarauacá e Xapuri. Os principais pontos de coleta de frutos com doenças fúngicas foram plotados em mapa conforme demonstrado na Figura 1.

Em campo a principal doença observada em *Theobroma* spp. foi a vassoura da bruxa causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. A doença acomete principalmente flores, frutos e os meristemas de ramos. Ao afetar pontos de crescimento provoca o superbrotamento de lançamentos foliares, com aumento de gemas laterais e engrossamento dos tecidos em crescimento, essas alterações originam o sintoma, que dá o nome a doença de vassoura de bruxa. Foi constatado em campo que a poda fitossanitária, principal medida de manejo para convivência com essa doença, é pouco ou mesmo não adotada pelos produtores, fato que aumenta a proliferação do fungo e perdas de produção.

O principal sintoma em frutos observado em campo foi a podridão seca. A esse sintoma de podridão seca, após realização de câmara úmida e isolamentos indiretos em laboratório, foram constatados predominantemente os fungos fitopatogênicos *Lasiodiplodia* spp. e *Colletotrichum* spp. O fungo *Lasiodiplodia* sp. está associado à morte descendente o cancro do caule em plantas de cacauzeiro no Brasil (Bonfim et al., 2019), e, neste levantamento foi encontrado associado ao sintoma de podridão seca nos frutos.

As principais características que permitiram a identificação desse patógeno em laboratório foram a presença de picnídios escuros, com conídios que quando imaturos são unicelulares, próximo de hialinos, com

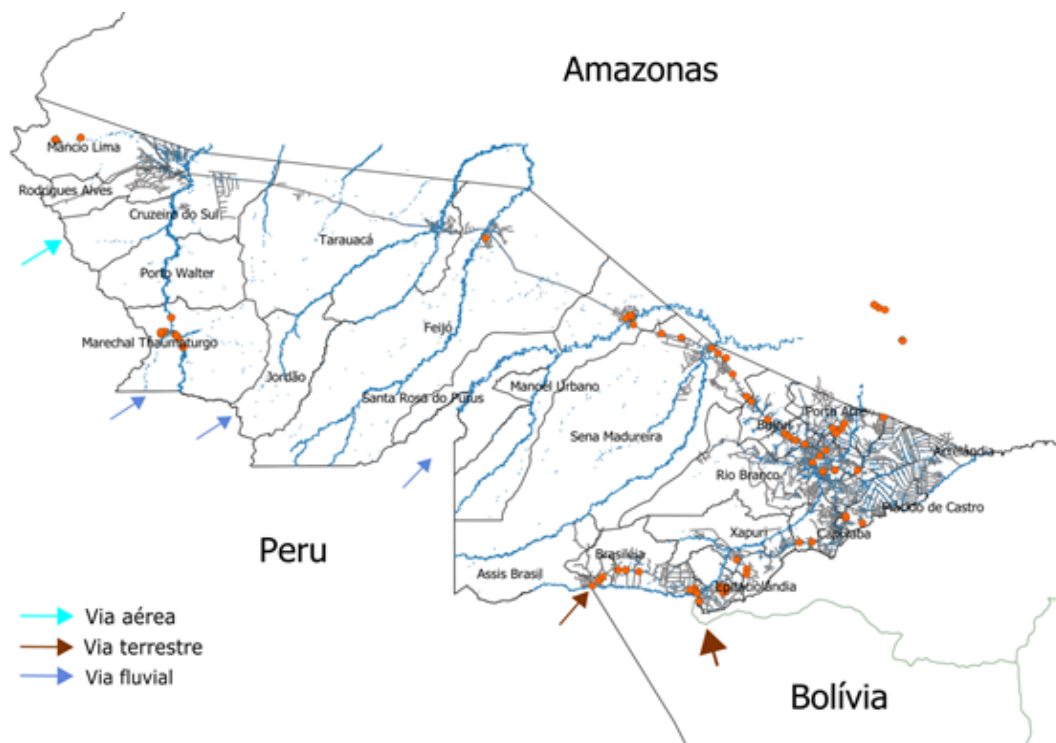


Figura 1. Mapa das áreas visitadas e as vias de risco da entrada de *Moniliophthora roreri* no Brasil através do Acre.

citoplasma granuloso, quando maduros esses conídios se tornam escuros, bicelular, ovalados e com estrias longitudinais.

Nos frutos com sintomas de podridão seca mantidos em câmara úmida, a detecção de *Colletotrichum* spp. foi possível com auxílio de lupa e observação de massa mucilaginosa alaranjada. Após confecção de lâminas e observação ao microscópio verificou-se a presença de acérvulos com setas escuras, com produção de conídios hialinos, não septados e cilíndricos. O mesmo padrão foi observado do material submetido a isolamento indireto. É possível que exista mais de uma espécie associada ao sintoma.

Também foram identificados nos isolamentos de frutos com podridão seca os fungos: *Acremonium* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Phomopsis* spp., (Tabela 1). Sabe-se que esses gêneros encontrados associados ao sintoma de podridão seca possuem potencial fitopatogênico, entretanto não foram realizados testes de patogenicidades para os mesmos. O sintoma de podridão seca predominou em frutos velhos não colhidos.

Tanto em frutos de *T. grandiflorum* como também de *T. cacao* foi observado a ocorrência de podridão

parda causada por *Phytophthora* spp. Em frutos no campo os sintomas iniciam com lesões pequenas de 1 a 2 mm de diâmetro de cor castanha, posteriormente essas lesões crescem tornando-se elípticas. Em condições de alta umidade é possível encontrar sobre as lesões uma camada esbranquiçada constituída de sinais do patógeno.

Tabela 1. Fungos isolados de frutos de *Theobroma* spp. no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Acre, coletados em campo de 2018 a 2021

Hospedeiro	Fungos
Cacaueiro - <i>Theobroma cacao</i>	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Lasiodiplodia</i> spp., <i>Monalonium annulipes</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.
Cupuaçuzeiro - <i>Theobroma grandiflorum</i>	<i>Acremonium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Lasiodiplodia</i> spp., <i>Moniliophthora perniciosa</i> , <i>Phytophthora</i> spp.
Cupuí - <i>Theobroma subincanum</i>	<i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Fusarium</i> spp.
Cacaui - <i>Theobroma speciosum</i>	<i>Colletotrichum</i> spp.

Em laboratório, após câmara úmida, foi possível a observação das estruturas reprodutiva e vegetativas. A principal característica vegetativa observada foi a presença de micélio cenocítico. Como estruturas reprodutivas foram observados esporângios contendo esporangiósporos.

A vassoura de bruxa, podridão parda e a podridão seca dos frutos estão amplamente difundidas no Acre. Estes são os primeiros relatos das doenças em levantamentos fitopatológicos em plantas do gênero *Theobroma* realizados em todas as regiões do Acre.

### **Ocorrência de *Moniliophthora roreri*, causador da monilíase do cacauzeiro no Acre.**

Em junho de 2021, em área urbana do município de Cruzeiro do Sul, AC, um morador local informou ao Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Acre - IDAF que por sua vez comunicou o fato à Superintendência Federal da Agricultura do Acre - SFA vinculada ao Ministério de Agricultura e Pecuária - MAPA a ocorrência de plantas de cacauzeiro e cupuaçuzeiro com frutos apresentando sinais e sintomas típicos da monilíase do cacauzeiro. Após inspeção de campo realizou-se a coleta de amostras e remessa de material visando à identificação do fungo. As análises micromorfológicas e moleculares foram realizadas no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Goiânia (LFDA/GO) conforme Instrução Normativa e Plano de Contingência específica vigente para a monilíase do cacauzeiro (Brasil, 2021a).

As análises moleculares foram realizadas pela técnica de amplificação da sequência do gene ITS do patógeno. A extração do DNA foi realizada com o DNeasy® mericon Food Kit (Qiagen) e as amplificações foram realizadas com os pares de iniciadores:

ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') /

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') a 0,2µM (<http://www.q-bank.eu/Fungi/LocalFiles/Latest/DNA%20Barcoding%20Fungi%20ITS.pdf>).

A reação de PCR para os pares de iniciadores foi realizada no termociclador Veriti 96 well (Life Technologies do Brasil), programado para um ciclo de 95°C por 15 minutos, 40 ciclos de: 94°C por 45 segundos; 52°C, por 30 segundos; e 72°C por 90 segundos, com extensão final de 72°C por 6 min.

O produto de PCR foi purificado por reação enzimática com o kit ExoSAP (USB Corporation). O sequenciamento foi realizado com o analisador de DNA ABI Prism 3500 DNA Analyzer (Life Technologies do Brasil). Cada sequência gerada no arquivo ABI pelo Genetic Analyser 3500 foi salva uma unidade de comparação útil (FASTA) para pesquisa em uma base de dados de padrões autenticados. O critério de aceitação adotado foi à obtenção de uma sequência bi-direcional, com menos de 2% de bases ambíguas no contig, ou uma única leitura com pelo menos 98% de bases de alta qualidade.

As análises de pós-sequenciamento foram realizadas em conformidade com o especificado, utilizando o Sequencing Analysis Software 6 (Applied Biosystems). As sequências tratadas foram comparadas com as sequências validadas depositadas no The National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Bold Systems (Ratnasingha; Hebert, 2007) e o índice de similaridade encontrado com a espécie *Moniliophthora roreri* foi 100% em ambas as bases de dados, confirmando a identificação da espécie, e o primeiro foco de *Moniliophthora roreri* no Brasil.

De imediato o MAPA através da portaria 372/2021 de 03 de agosto de 2021 declarou o estado do Acre como área sob quarentena até então ausente de *M. roreri* ficando proibido o trânsito de materiais vegetais das espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* e outros hospedeiros de *M. roreri* provenientes do estado do Acre para as demais unidades da federação, até que sejam concluídos os trabalhos de delimitação da área foco de ocorrência (Brasil, 2021b). Posteriormente, em 04 de agosto de 2021 foi publicada a portaria nº 249/2021 que declarou estado de emergência fitossanitária relativo ao risco iminente de introdução da praga quarentenária ausente *M. roreri* nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia (Brasil, 2021c).

Em campo iniciou-se então o trabalho de ações de erradicação da monilíase no Acre sob o comando da Coordenação de Proteção de Plantas do Departamento de Sanidade Vegetal do MAPA aplicando as ações previstas na Instrução Normativa nº 112/2020 de 11 de dezembro de 2020, que instituiu o Plano Nacional de Prevenção e Vigilância de *Moniliophthora roreri* - PNPV/Monilíase (Brasil, 2021a). Este foi o primeiro relato da doença monilíase do cacauzeiro no Brasil.



### Literatura Citada

- BONFIM, B. S. A.; et al. 2019. Species of *Lasiodiplodia* causing dieback and stem canker on cocoa in Brazil. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 49. Recife, PE. Anais... p234.
- BRASIL. 2021a. Instrução Normativa Nº 112, de 11 de dezembro de 2020. Institui o Plano Nacional de Prevenção e Vigilância de *Moniliophthora roreri* - PNPV/Monilíase. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção 1, 04/01/2021, Brasília, DF.
- BRASIL. 2021b. Portaria nº 372, de 3 de agosto de 2021. Declara o estado do Acre como área sob quarentena para a praga quarentenária ausente *Moniliophthora roreri*. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção 1, 05/08/2021, Brasília, DF.
- BRASIL. 2021c. Portaria nº 249, de 4 de agosto de 2021. Declara estado de emergência fitossanitária relativo ao risco iminente de introdução da praga quarentenária ausente *Moniliophthora roreri* nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção 1, 06/08/2021, Brasília, DF.
- HERNANDES, T. A.; et al. 1990. La moniliasis del cacao en el Peru. *Agrotropica* 2(1):56-58.
- RATNASINGHAM, S., HEBERT, P. D. N. 2007. The barcode of life data system ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular and Ecology Notes* (7):355-364.
- RODRIGUES, E.; et al. 2011. Manejo Florestal Comunitário: Cacao nativo do Purus. 1. ed. Rio Branco, Acre, Editora Andiroba. 220p.

## **POLÍTICA EDITORIAL**

A Revista Agrotrópica foi criada em 1971, sendo originalmente conhecida como Revista Theobroma. Por ter um caráter interdisciplinar, constitui-se num veículo para comunicação científica em várias áreas como: Biodiversidade, Ciências Agrárias, Ambientais, Veterinária, Zootecnia, Tecnologia de Alimentos, Geografia, Geociências, Socioeconomia, etc. A revista é publicada quadrimestralmente e está destinada a divulgação de trabalhos originais que têm contribuição real para o desenvolvimento agroecológico, ambiental e socioeconômico das Regiões Tropicais Úmidas.

A Revista Agrotrópica publica não apenas artigos científicos, como também notas científicas, revisões bibliográficas relevantes e de natureza crítica, todos em três idiomas: Português, Inglês e Espanhol. Publica também cartas endereçadas ao Editor sobre trabalhos publicados.

Os Autores são os responsáveis exclusivos pelo conteúdo do trabalho, todavia, o Editor, com a assessoria científica do Conselho Editorial da Revista, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações que considerarem necessárias.

Editor Chefe

## **EDITORIAL POLICY**

The Agrotrópica Journal was created in 1971, being formerly known as Theobroma Journal. As having an interdisciplinary character, it constitutes in a vehicle for scientific communication in various areas as: Biodiversity, Agricultural Sciences, Environmental Science, Veterinary, Animal Science, Food Technology, Geography, Geosciences, Socioeconomics, etc. The journal is published every four months and is destined to dissemination of original scientific works that have real contributions to the development agroecological, environmental and socioeconomic of the tropical rain regions.

The Agrotrópica Journal publishes not only scientific papers, but also scientific notes, relevant bibliographical reviews and of critical nature, all in three idioms: Portuguese, English and Spanish. It also publishes letters to the editor about published works.

The authors are solely responsible for the content of the work, however, the Editor, with the scientific accessory of the Editorial Board, reserves the right of suggesting or requesting the changes that seem to be necessary.

Editor-in-Chief





Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

